

LEYZA PALOSCHI DE OLIVEIRA

**“PRODUÇÃO DE INOCULANTE, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE FUNGOS
ECTOMICORRÍZICOS EM MUDAS DE *PINUS TAEDA* L.”**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina. Orientadora: Prof^a Dr^a Vetúria Lopes de Oliveira. Co-orientador: Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho.

Florianópolis

2004

**“Produção de inoculante, seleção e aplicação
de fungos ectomicorrízicos em mudas de
Pinus taeda L”**

POR

LEYZA PALOSCHI DE OLIVEIRA

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da
Comissão Examinadora.**

Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Vetúria Lopes de Oliveira
MIP/CCB/UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Viana
BOT/CCB/UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Zaida Inês Antonioli
Depto de Solos/CCR/UFSC

Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho
MIP/CCB/UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Célia Regina Monte Barardi– MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Setembro de 2004.

AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Vetúria Lopes de Oliveira e ao Professor Dr. Germano Nunes Silva Filho, pela orientação, confiança, presença constante e amizade;
- À Universidade do Contestado – Campus de Caçador, pela oportunidade de realização do Curso;
- À EPAGRI – Estação Experimental de Caçador por ceder a casa de vegetação;
- Aos Professores e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC pelo acesso ao conhecimento;
- À Capes pela Bolsa de Auxílio de Capacitação de Docentes;
- À Frame Madeiras Especiais Ltda. pelo fornecimento de sementes;
- Aos Engenheiros Agrônomos Geraldo Reinério Busato e Nelton Luiz Baú pelas sugestões, incentivo e apoio;
- Aos meus amigos Elsa, Luiz, Márcio, Pedro, Luciano, Mítia, Huayna, Jonas pelo companheirismo;
- Aos meus tios Loacyr (*in memoriam*) e Nilse Fin, pelo lar que sempre me acolheu;
- Aos familiares Ary, Myres e Cláudio pela presença e apoio;
- Ao Sergio pela fortaleza de todas as horas, aos filhos Juliana, Rodrigo, Daniela, Fernanda e Carolina pelas vibrações de amor e à Célia pela dedicação;
- E a todos que colaboraram pela conclusão desta etapa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1	
REVISÃO DE LITERATURA	4
1.1. AS PLANTAÇÕES DE <i>PINUS</i> NO BRASIL E EM SANTA CATARINA	4
1.2. A ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA	6
1.2.1. Co-evolução com as plantas.....	6
1.2.2. O processo de sinalização entre o fungo e a planta.....	9
1.2.3. Os benefícios advindos da simbiose ectomicorrízica.....	11
1.2.4. Métodos de inoculação de fungos ectomicorrízicos.....	14
1.2.5. Práticas que afetam a colonização e a eficiência micorrízica.....	17
1.3. SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS	19
1.3.1. Classificação e ocorrência dos fungos ectomicorrízicos no Brasil, com ênfase a Santa Catarina.....	19
1.3.2. Avaliação de respostas das plantas à inoculação ectomicorrízica.....	21
1.3.3. Potencial biotecnológico do controle da micorrização.....	24
CAPÍTULO 2	
PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM SUBSTRATO SÓLIDO	26
2.1. INTRODUÇÃO	26

2.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
2.4.	CONCLUSÕES.....	36

CAPÍTULO 3

	SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Pinus Taeda</i> L.....	37
3.1.	INTRODUÇÃO.....	37
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.2.1.	Produção do inoculante dos isolados fúngicos ectomicorrízicos.....	38
3.2.2.	Preparo das sementes de <i>Pinus taeda</i> e do substrato de plantio.....	39
3.2.3.	Montagem e condução do experimento.....	40
3.2.4.	Avaliação dos resultados.....	40
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.3.1.	Colonização radicular.....	42
3.3.2.	Eficiência dos isolados ectomicorrízicos na promoção do crescimento de mudas de <i>Pinus taeda</i>	45
3.4.	CONCLUSÕES.....	55

CAPÍTULO 4

	INFECTIVIDADE DE INOCULANTE ECTOMICORRÍZICO PRODUZIDO EM BIORREATOR <i>AIRLIFT</i> E ENCAPSULADO EM ALGINATO DE CÁLCIO.....	56
4.1.	INTRODUÇÃO.....	56
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.4.	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
	ANEXOS.....	76

LISTA DE TABELAS

2.1.	Isolados ectomicorrízicos da coleção da UFSC utilizados na produção de inoculante para mudas de <i>Pinus taeda</i>	28
2.2.	Avaliação visual do crescimento de isolados dos fungos ectomicorrízicos em meio sólido, após 60 dias de cultivo, com aeração natural (+) e com aeração forçada (-).....	32
3.1.	Teores de nutrientes para adubação do substrato de plantio.....	39
3.2.	Colonização radicular de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	43
3.3.	Diâmetro do colo de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	46
3.4.	Altura de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízico, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	47
3.5.	Matéria seca da parte aérea de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	48
3.6.	Matéria seca da raiz de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	48
3.7.	Matéria seca total de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	49
3.8.	Teor de P na parte aérea de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	50
3.9.	Eficiência de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.....	53

4.1.	Porcentagem de colonização de mudas de <i>Pinus taeda</i> , após 180 dias em casa de vegetação, inoculadas com inoculante do isolado UFSC-Rh90 (<i>Rhizopogon nigrescens</i>), produzido em biorreator <i>airlift</i> , encapsulado em gel de alginato de cálcio e armazenado durante 8 meses sob refrigeração, com diferentes tipos de adubação.....	60
4.2.	Crescimento de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com inoculante do isolado UFSC-Rh90 (<i>Rhizopogon nigrescens</i>), produzido em biorreator <i>airlift</i> , encapsulado em gel de alginato de cálcio e armazenado durante 8 meses sob refrigeração, após 180 dias em casa de vegetação, com diferentes tipos de adubação.....	61

LISTA DE FIGURAS

2.1.	Etapas do procedimento de obtenção do inóculo para produção do inoculante de isolados de fungos ectomicorrízicos.....	29
2.2.	Detalhes da produção de inoculante em BOD a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 60 dias, em ausência de luz.....	30
2.3.	Avaliação visual de crescimento de micélio nos frascos de cultivo.....	31
2.4.	Teste de viabilidade de inoculante de fungos ectomicorrízicos, produzido em substrato sólido (turfa-vermiculita-solução nutritiva) após 60 dias de incubação ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$).....	33
3.1.	Ectomicorrizas formadas entre os isolados de fungos ectomicorrízicos e mudas de <i>Pinus taeda</i> , sob condições de casa de vegetação.....	42
3.2.	Relação entre a dose de P aplicada e a porcentagem de colonização de mudas de <i>Pinus taeda</i> inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação.....	44
3.3.	Comportamento de isolados de fungos ectomicorrízicos em função da dose de P aplicada.....	52

RESUMO

A silvicultura catarinense está aumentando sua participação no mercado de produtos florestais no Brasil e no mundo. Para atender a demanda do mercado é necessário encontrar novas tecnologias que aumentem a produtividade e a sustentabilidade das plantações florestais. Dentre essas novas tecnologias, a melhoria da qualidade das mudas poderá contribuir para o estabelecimento das florestas em regiões menos favoráveis. Para atingir esse objetivo, alguns países já recomendam, ou mesmo exigem, a inoculação de mudas de essências florestais com fungos ectomicorrízicos (fECM). A simbiose mutualística entre raízes e fungos, denominada micorriza, beneficia a produção florestal, uma vez que aumenta a absorção de nutrientes e protege as plantas contra condições adversas. Assim, é necessário selecionar fECM eficientes para que se possa estabelecer as melhores combinações hospedeiro-fungos a ser aplicadas em programas florestais. Com esse propósito, 13 isolados de fungos ectomicorrízicos, obtidos de plantações de pinus em Santa Catarina, foram estudados em relação à infectividade e à eficiência em promover o crescimento de mudas de *Pinus taeda*. Inicialmente, a produção de inoculante desses isolados foi estudada em duas condições de aeração: natural e forçada. Nenhuma diferença foi detectada em relação a esses dois tratamentos em termos de crescimento dos fungos. Isto indica que o inoculante fúngico pode ser produzido com aeração natural, o que representa maior ganho de tempo e outros custos. Como o nível de fósforo pode ser um fator importante para a infectividade e eficiência dos fECM, um segundo estudo foi realizado para testar o efeito de cinco diferentes níveis de P (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg P por planta) na colonização, produção de matéria seca e absorção de P de mudas de *P. taeda* inoculadas separadamente com os 13 isolados de fECM. O substrato de plantio, à base de uma mistura turfa-vermiculita, foi inoculado com inoculante proveniente do estudo de aeração, sendo distribuído em tubetes plásticos (60 mL) e semeado com cinco sementes de *P. taeda* por tubete. Após duas semanas foi realizado o desbaste, deixando-se somente uma planta por tubete. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 120 dias e irrigadas diariamente com água destilada. Após esse período, foram colhidas e avaliadas quanto à colonização micorrízica, altura, diâmetro, matéria seca e conteúdo de P na parte aérea. Os maiores níveis de P no substrato inibiram a colonização pelos isolados. A dose de 1 mg P por planta foi a que mais favoreceu a colonização. Os isolados Marx 270 (*Pisolithus tinctorius*), UFSC-Am75 (*Amanita muscaria*), UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.) e UFSC-Su118 (*Suillus cothurnatus*) foram aqueles que apresentaram maior potencial para programas de inoculação em viveiros de *Pinus taeda*. Finalmente, inoculante com oito meses de idade de um dos isolados UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), produzido em bioreator *airlift* e imobilizado em alginato de cálcio, foi testado em relação a mudas de *P. taeda* em casa de vegetação, mostrando alta infectividade e indicando que a fermentação líquida, seguida pela imobilização em gel, pode ser um método eficiente para a produção de inoculante de fungos ectomicorrízicos.

Palavras-chave: Micorrizas, Infectividade, Eficiência, Fósforo.

ABSTRACT

Santa Catarina State forestry is increasing its participation in the market of forest products both in Brazil and in the world. In order to provide these products to the demanding market it is necessary to find new technologies to increase the productivity and the sustainability of forest plantations. Among these new technologies, the improvement of seedlings quality is one of those that may contribute to the establishment of forest plantations even in less favourable regions. As a tool to achieve this objective, some countries are already recommending, or even requiring, the inoculation of eucalypts and pinus seedlings with ectomycorrhizal fungi (ECMf). The mutualistic symbiosis between roots and fungi, also called mycorrhiza, promotes forest production, since it improves nutrient uptake and protects plants against many adverse conditions. It is then necessary to select efficient ectomycorrhizal fungi before establishing the best host-fungus combinations to be applied in forest programmes. With this objective in mind, thirteen ectomycorrhizal isolates, obtained from pinus plantations in Santa Catarina, were studied concerning their infectivity and efficiency to promote growth of *Pinus taeda* seedlings. Initially, inoculum production of these isolates was studied in two aeration conditions: natural aeration and forced aeration. No differences were detected between these two treatments in terms of fungal growth. This indicates that fungal inoculum may be produced with natural aeration which is more time and money saving. As phosphorus level may be a very important factor influencing infectivity and efficiency of ECMf, a second study was performed to test the effect of five different levels of P (0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg P per plant) on mycorrhizal colonization, dry matter production and P uptake of *P. taeda* seedlings inoculated separately with the 13 ECMf isolates. Plant substrate was prepared with a mixture of peat and vermiculite and inoculated with the ectomycorrhizal inoculum produced during the aeration study. After inoculation, plant substrate was distributed in 60-mL plastic pots and each pot was sown with five *P. taeda* seeds. After two weeks, only one plant was left per pot. Plants were kept in greenhouse conditions during 120 days and watered every day with distilled water. After this period they were harvested and analyzed in terms of mycorrhizal colonization, plant height, diameter and dry matter as well as P shoot content. Higher P levels in the substrate inhibited root colonization by the isolates. One mg P per plant was the most favourable dosis in relation to root colonization. Isolates Marx 270 (*Pisolithus tinctorius*), UFSC-Am75 (*Amanita muscaria*), UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.) and UFSC-118 (*Suillus cothurnatus*) were those presenting higher potential to be applied in inoculation practices in *P. taeda* nurseries. Finally, 8-month old inoculum of one of the isolates, UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), produced in an airlift bioreactor and immobilized in calcium alginate, was tested towards *P. taeda* seedlings in greenhouse showing high infectivity and indicating that liquid fermentation followed by gel immobilization may be an efficient method to inoculum production of ectomycorrhizal fungi.

Key-words: Mycorrhizas, Infectivity, Efficiency, Phosphorus.

INTRODUÇÃO

As florestas plantadas no Brasil são responsáveis pela produção de madeira para os mais diversos fins, como papel, celulose, móveis, painéis reconstituídos, molduras, construção civil e energia e participam de forma significativa da economia estadual e nacional. Atualmente, a demanda de madeira em tora é superior à capacidade de produção sustentada dos reflorestamentos existentes, refletindo-se nos preços praticados no mercado, na competitividade da indústria florestal e nos remanescentes das florestas nativas. A expansão da base florestal plantada encontra restrições sobretudo de ordem ambiental, tornando urgente intervenções para maximizar o potencial produtivo com estratégias adequadas de manejo.

Dentre as ações de caráter técnico está o plantio de mudas colonizadas com fungos micorrízicos, que favorecem a sobrevivência e o crescimento das plantas. Micorrizas são associações simbióticas entre as raízes dos vegetais e certos fungos, promovendo uma melhor absorção e utilização de água e nutrientes pela planta, principalmente fósforo (P) e nitrogênio (N), maior resistência a patógenos, tolerância ao transplante e condições desfavoráveis do solo.

As essências florestais formam associações do tipo ectomicorrizas, micorrizas arbusculares e ectoendomicorrizas, que envolvem uma série de etapas e de modificações de ordem morfológica, fisiológica e química nos dois organismos, planta e fungo. As ectomicorrizas são as mais frequentes nessas plantas e a introdução da família Pinaceae nas regiões de clima tropical só foi possível devido à associação micorrízica.

Os fungos ectomicorrízicos são, geralmente, específicos nas associações com plantas, diferindo na habilidade de colonizar as raízes e na eficiência de promoção do crescimento da espécie vegetal. A estratégia de inoculação das plantas com fungos micorrízicos eficientes,

previamente selecionados, pode contribuir para aumentar a produtividade das plantações florestais e diminuir gastos com replantio e insumos, tais como adubos e agrotóxicos.

Na maioria dos casos já estudados, os incrementos na taxa de crescimento obtidos pela inoculação das espécies florestais com fungos ectomicorrízicos ficam em torno de 1,2 a 1,4 vezes em relação às plantas não inoculadas. Os bons resultados obtidos com o uso da inoculação das plantas em áreas degradadas e de baixa fertilidade indicam a possibilidade de recuperar áreas consideradas impróprias ao plantio.

Assim, o trabalho de seleção de fungos ectomicorrízicos para a promoção do crescimento de espécies florestais pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de uma silvicultura sustentável e rentável, com inúmeros benefícios econômicos e sociais para o país.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Estudar a produção, seleção e aplicação de isolados fungos ectomicorrízicos na promoção do crescimento de mudas de *Pinus taeda* L.

Objetivos Específicos:

1. Produzir inoculante de diferentes isolados de fungos ectomicorrízicos de qualidade, com alta viabilidade e infectividade.
2. Avaliar a infectividade e a eficiência de diferentes isolados de fungos ectomicorrízicos com diferentes doses de P em mudas de *Pinus taeda*.
3. Verificar a infectividade e a eficiência de um dos isolados (*Rhizopogon nigrescens*), produzido em biorreator *airlift* e encapsulado em alginato de cálcio, em mudas de *Pinus taeda*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. AS PLANTAÇÕES DE *PINUS* NO BRASIL E EM SANTA CATARINA

A situação de clima e de solo no Brasil tem favorecido a produção de essências florestais, principalmente espécies de *Eucalyptus* e de *Pinus*, com a maior concentração de área plantada ocorrendo nas regiões sudeste e sul do país, compondo, respectivamente, 51% e 21% do total de 4,8 milhões de hectares plantados em todo o território nacional (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2004). O setor florestal destaca-se na economia brasileira por apresentar os maiores efeitos multiplicadores para os indicadores socioeconômicos, sendo superiores aos de outros setores como o da indústria automobilística, de equipamentos elétricos e eletrônicos, de máquinas e equipamentos e de produtos químicos e petróleo (VALVERDE et al., 2003). O PIB do setor florestal brasileiro está estimado em 23 bilhões de dólares e representa cerca de 4,5% do produto de toda a economia. O Brasil, maior produtor florestal da América Latina, industrializa mais de 100 milhões de metros cúbicos de madeira por ano, gerando cerca de 6,5 milhões de empregos e arrecadando em impostos, através do setor de base florestal, 4,5 bilhões de dólares anualmente. Em 2003, entre madeira e derivados, papel, celulose e móveis, o setor exportou 5,5 bilhões de dólares, contribuindo com 7,5% do total das exportações brasileiras, ficando atrás somente do complexo soja no *ranking* das exportações do agronegócio (INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA, 2004).

Santa Catarina possui em torno de 360 mil ha plantados com eucalipto e pínus e apresenta-se no cenário nacional como o terceiro produtor de papel e celulose, primeiro produtor de celulose de fibra longa e de móveis. A maioria dos plantios é feita com pínus (88,5%), uma das principais plantas usadas como matéria prima pelos segmentos de celulose, madeira, compensado, energia, chapa de fibra e aglomerado (CARON NETO, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2004). A produção catarinense de toras para processamento mecânico tem apresentado crescimento continuado, com a produção concentrando-se nos municípios do planalto e no maior município produtor, Caçador, localizado no meio oeste, com 13% da produção (INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA, 2003). A indústria de base florestal catarinense, quase toda baseada no uso de florestas cultivadas, teve um desenvolvimento bastante expressivo nos últimos dez anos. São mais de cinco mil empresas e quase 90 mil empregados envolvidos no setor. A silvicultura é responsável pela geração de mais de 10% do valor bruto da produção do setor agropecuário e a indústria de base florestal responde por quase 15% do valor da transformação industrial de Santa Catarina. Estima-se ser de aproximadamente 7% a participação de setor no PIB catarinense (INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA, 2004).

O abastecimento de madeira no mercado nacional não tem alcançado a demanda e alguns analistas prevêm a falta do produto nos próximos anos. Uma possível solução apontada pelo setor madeiro seria o estímulo ao plantio de florestas pelos pequenos produtores. Acredita-se que os custos, os impactos ambientais e sociais seriam menores que o plantio em grandes áreas. O governo do Estado de Santa Catarina tem estimulado o pequeno produtor, através de programas específicos, para o plantio em áreas que não são próprias para lavouras ou pastagens, como alternativa à devastação das matas nativas e para abastecer o exigente mercado. As espécies do gênero *Pinus* respondem bem ao manejo florestal e são

adaptadas às condições de solo e de clima catarinenses, tolerando as geadas severas que ocorrem no planalto e no oeste do Estado. A madeira apresenta boas propriedades de acabamento e vocação para aplicações de aparência. A floresta plantada de pínus é viável economicamente, tanto em termos de atividade empresarial quanto para pequenos agricultores (KREUZ, 2003).

Pinus taeda é uma espécie originária da América Norte e seu plantio em escala comercial no Brasil iniciou-se depois de 1950, no estado de São Paulo. Atualmente, a produtividade no Brasil é duas vezes e meio maior que a dos EUA. Parte disso se deve ao clima, que permite um crescimento muito rápido, e parte a décadas de estudos sobre o comportamento da espécie em nossas condições.

As espécies do gênero *Pinus* dependem da associação micorrízica para melhor sobrevivência e crescimento em diferentes condições de viveiro e campo. A importância dessa associação simbiótica foi demonstrada quando tentativas de implantar espécies de *Pinus* em outros países, fora de seu local de origem, onde não havia fungos compatíveis com essa planta fracassaram (VOZZO e HACKSKAYLO, 1971). Órgãos de pesquisas brasileiros reconhecem a importância da prática da inoculação de mudas de pínus com fungos ectomicorrízicos e recomendam aos viveiristas o uso dessa prática (STURION e ANTUNES, 2000; GALLOTTI, 2002).

1.2. A ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA

1.2.1. Co-evolução com as plantas

A maioria das plantas vasculares vive em simbiose mutualística com fungos micorrízicos. Há evidências de que essa associação entre raízes das plantas e fungos (FRANK, 1885) possibilitou a colonização do ambiente terrestre pelas plantas (PIROZYNSKI e MALLOCH, 1975; REDECKER, KODNER e GRAHAM, 2000). Estudos filogenéticos sugerem que os fungos micorrízicos evoluíram de ancestrais saprofíticos e que voltaram à condição de vida livre em múltiplas ocasiões (HIBBETT, GILBERT, DONOGHUE, 2000). Genes para enzimas lignolíticas são encontrados em grande escala em fungos ectomicorrízicos de diversas ordens, dando suporte a essa hipótese (CHEN et al., 2001; MÜNZENBERGER et al., 2003).

A associação de fungos ectomicorrízicos com as essências florestais em novas áreas pode ter sido um pré-requisito para a adaptação de ambos os organismos a novas condições ambientais adversas (PIROZYNSKI, 1981). Uma hipótese baseada em análise de seqüências de rDNA sugere que a simbiose ectomicorrízica originou-se na mesma época do aparecimento da família Pinaceae, 125 a 130 milhões de anos atrás (BERBEE e TAYLOR, 1993).

As principais famílias vegetais que apresentam espécies associadas a fungos ectomicorrízicos são: Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Myrtaceae e Dipterocarpaceae (WILCOX, 1990). A formação das ectomicorrizas envolve uma série de etapas e de modificações de ordem morfológica, celular e química nos dois organismos. O fungo penetra nas raízes das angiospermas colonizando a região intercelular das células epidérmicas e a região do córtex nas gimnospermas. O crescimento das hifas na superfície das raízes forma a estrutura denominada manto. Já a colonização dos espaços intercelulares forma um labirinto, chamado rede de Hartig, que é a região de troca de nutrientes entre o fungo e a planta (SMITH e READ, 1997). As hifas saem do manto em direção ao solo, podendo formar feixes chamados rizomorfos, que são cordões de diâmetro maior que as hifas isoladas (DUDDRIDGE, MALIBARI e READ, 1980). Os fungos ectomicorrízicos produzem

hormônios que diminuem o crescimento das raízes e podem induzir à bifurcação das pontas e à formação de aglomerados de raízes, variando as estruturas conforme a espécie hospedeira e o fungo associado (BARKER, TAGU e DELP, 1998).

O grau de especificidade do fungo com o hospedeiro é considerado médio em relação ao que ocorre com as micorrizas arbusculares, onde os fungos simbioses são considerados de baixa especificidade (BRUNDRETT, 2002). Assim, Giachini et al. (2000) observaram em florestas plantadas de Santa Catarina que os fungos dos gêneros *Amanita*, *Lactarius*, *Suillus* e *Rhizopogon* estão associados somente a *Pinus* spp., enquanto que aqueles dos gêneros *Chondrogaster*, *Hysterangium* se associam somente a *Eucalyptus* spp.

Além da especificidade em relação aos hospedeiros, os fungos ectomicorrízicos podem associar-se em estádios diferenciados de crescimento da planta. Aqueles que associam-se a plantas jovens são chamados fungos de estágio inicial e os que associam-se a plantas de idade avançada, fungos de estágio tardio. Os que se associam às plantas em qualquer fase são chamados multiestádios (MASON et al., 1982; LAST et al., 1984). Supõe-se que esse fenômeno esteja ligado à maior demanda de açúcares por parte dos fungos ectomicorrízicos tardios e menor demanda pelos de estágio inicial (GIBSON e DEACON, 1990). Outra hipótese relaciona a sucessão dos fungos ectomicorrízicos com as diferentes formas de nutrientes disponíveis no solo. Os fungos de estágio inicial utilizariam nutrientes predominantemente na forma mineral e os de estágio tardio na forma orgânica (DIGHTON e MASON, 1985; LAST, DIGHTON e MASON, 1987; EATON e AYRES, 2002).

No entanto, acredita-se que em áreas onde já existiam plantações anteriores, as mudas seriam colonizadas por fungos de estágio tardio ou multiestádios e em áreas novas de plantio ou viveiros os fungos de fase inicial teriam a função de colonizadores primários (SMITH e READ, 1997). Esses últimos autores indicam, ainda, a possibilidade de as diferenças entre os grupos (pioneiros ou aqueles de florestas estabelecidas) estarem relacionadas à habilidade do

fungo de disseminar-se na forma de esporos ou de pequenos fragmentos de inóculo e o uso desses propágulos para a colonização de novas raízes.

1.2.2. O processo de sinalização entre o fungo e a planta

Para que ocorra a simbiose, o fungo ectomicorrízico necessita reconhecer e associar-se ao hospedeiro, escapar do processo de defesa da planta e iniciar o processo de transferência bilateral de nutrientes (SMITH e READ, 1997).

A sinalização entre o fungo e a planta inicia-se pela liberação, por parte desta última, de exsudatos que atuarão, principalmente, como nutrientes para o fungo e que podem estimular a germinação de esporos de fungos ectomicorrízicos presentes no solo (FRIES e BIRRAUX, 1980; BIRRAUX e FRIES, 1981; FRIES e SWEDJEMARK, 1986). Foi observado que as citocininas aumentam significativamente o crescimento do fungo ectomicorrízico em *Pinus sylvestris*, em solo mineral pobre, especialmente se associado ao ácido indol acético (IAA) (GOGALA, 1989).

Além dos hormônios, outros compostos como os flavonóides, diterpenos e vários nutrientes podem compor os sinais iniciais emitidos pela planta para iniciar o processo (MARTIN et al., 2001). Garbaye (1994) destaca a importância da presença de bactérias auxiliares da micorrização (BAM) que liberam compostos que auxiliam no processo. Em coníferas, o suprimento externo de exsudatos de fungos e auxinas sintéticas provocaram uma maior proliferação e ramificação dicotômica de raízes laterais (SMITH e READ, 1997). A sinalização pode ser seguida pela produção e acúmulo de fenilpropanóides nas raízes e liberação pelo fungo de compostos indólicos que irão atuar na rizogênese (WEISS et al., 1997; NEHLS et al. 1998). Os sinais bioquímicos de reconhecimento, compõem, com a ramificação e adesão das hifas, os passos iniciais da formação das ectomicorrizas. Wong e

Fortin (1990) citam, ainda, que o micélio de outros fungos pode estimular a germinação dos esporos de fungos ectomicorrízicos.

Observações de fases iniciais da colonização podem revelar se o reconhecimento resulta em interação compatível ou não. Quando o fungo entra em contato com a superfície das raízes, as hifas se ramificam, intumescem e parecem se fundir em certos locais, antes da produção do manto ou rede de Hartig (JACOBS, PETERSON e MASSICOTE, 1989). Após a modificação e adesão das hifas, pode ocorrer a penetração do fungo no tecido do hospedeiro.

Há também modificação na composição bioquímica dos polipeptídeos na membrana de interface planta-fungo, chamados de micorrizinas. Os polipeptídeos encontrados nas raízes colonizadas são diferentes daqueles encontrados nas raízes não colonizadas ou no micélio do fungo. A formação de micorrizinas ocorre logo no início do processo (observações realizadas 12 horas após), quando há ainda poucas hifas em torno da raiz, indicando que as mudanças na expressão do gene hospedeiro ocorrem antes da formação das estruturas anatômicas (HILBERT, COSTA e MARTIN, 1991).

Na seqüência do processo, o crescimento do meristema apical da raiz cessa, ocorre a formação da rede de Hartig e polissacarídeos e polipeptídeos agregam-se às hifas formando o manto. Há, então, o rearranjo do citoesqueleto que produz um alongamento das células da raiz. Para controlar a interação com o fungo ectomicorrízico, a planta pode produzir quitinases que atenuam o sinal eliciador produzido pelo fungo, sem influenciar o crescimento e a morfologia do fungo (SALZER et al., 1997). Feugey et al. (1999) sugerem que a resposta de defesa induzida pela planta pode limitar a formação da rede de Hartig.

A série de eventos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos envolvendo os dois simbiontes determinará a possibilidade de colonização de uma espécie vegetal por determinado fungo.

1.2.3. Os benefícios advindos da simbiose ectomicorrízica

A ciclagem biológica considera os fluxos de nutrientes do solo para a planta e dessa novamente para o solo. Esse é um processo importante da nutrição do pínus, sobretudo nos sítios mais pobres (REISSMANN e WISNIEWSKI, 2000). As micorrizas contribuem de forma eficiente na disponibilização e absorção de nutrientes (N, P, K, Ca, Zn, Cu, Fe), ampliando a área de exploração do solo pelas raízes (FINLAY e READ, 1986; MARTIN e BOTTON, 1993; MARSCHNER e DELL, 1994; TIBBETT e SANDERS, 2002).

Com a identificação de genes similares aos de lacase em fungos ectomicorrízicos, Chen et al. (2003) indicam que esses fungos têm potencial para a mobilização de nutrientes orgânicos a partir da lignina. Além da mobilização de nutrientes, os fungos podem contribuir na agregação do solo pela produção de compostos e pelo efeito das próprias hifas. Caravaca et al. (2002) observaram um efeito de maior estabilidade dos agregados do solo, em florestas de *Pinus halepensis* em semiárido, depois da adição de matéria orgânica e inoculação com fungos ectomicorrízicos. Essas práticas contribuem para a decomposição da serrapilheira, que é uma das principais fontes de nutrientes em plantações de pínus, e auxiliam, também, na melhoria das condições de estrutura e de fertilidade do solo.

Em solos tropicais, nutrientes como o P são de baixa disponibilidade para as plantas e muitas vezes se encontram em concentrações na solução do solo que as plantas não podem captar. Esse elemento, pouco móvel no solo, é um fator limitante ao crescimento das plantas. Os fungos micorrízicos, além de captar P além da região de depleção próxima às raízes, são mais eficientes do que as raízes na captação desse elemento, absorvendo-o mesmo quando ele se encontra em concentrações muito baixas na solução do solo (PAUL e CLARK, 1989).

Além de presente na solução do solo, os fosfatos também podem ser encontrados na forma orgânica como ortofosfatos de monoésteres (fosfato de inositol), ortofosfatos de

diésteres (ácidos nucleicos, os fosfolipídeos e o ácido teicóico) e fosfatos inorgânicos (fosfatos de alumínio, fosfatos de ferro e fosfatos de cálcio) (NOVAIS e SMYTH, 1999). Muitos microrganismos do solo produzem fosfatases, enzimas que catalizam a hidrólise que proporciona a clivagem de P de formas orgânicas, propiciando o aproveitamento do fósforo presentes nesses compostos. Observou-se que o micélio de isolados fúngicos apresentou ótima atividade para a fosfatase p-nitrofenil em pH 4,5 ou 5,0 (ANTIBUS, SINSABAUGH e LINKINS, 1992). Tam e Griffiths (1993b) observaram a habilidade dos fungos ectomicorrízicos de produzirem fosfatases e, também, de solubilizarem os fosfatos pouco solúveis, pela produção de prótons e ácidos orgânicos.

Como o P é um dos elementos mais limitantes ao crescimento vegetal, o benefício obtido com a associação micorrízica é variável e dependente do suprimento desse elemento. Quando o P é extremamente limitante, o crescimento dos dois simbiontes é inibido (DIGTHON, POSKITT e BROWN, 1993); quando a disponibilidade de P é baixa, ocorre o aumento do crescimento do hospedeiro graças à ação do fungo (SMITH e READ, 1997); em doses maiores de P, a proliferação do fungo pode ocorrer às expensas do hospedeiro, não havendo benefícios para este último (BOUGHER, GROVE e MALAJCZUK, 1990).

Como as plantas respondem à formação de micorrizas mais intensamente em solos de baixa disponibilidade de nutrientes, a grande maioria dos fungos micorrízicos é adaptada às condições de solos de baixa fertilidade (CASTELLANO e MOLINA, 1989). Em solos pobres, o aumento de custo para produção de enzimas por parte do fungo pode trazer vantagens para a planta porque também aumenta a mineralização de outros nutrientes que são limitantes no solo (DIGHTON, 1991).

Assim, a eficiência de fungos ectomicorrízicos em terrenos férteis depende de: i) efeito da fertilidade no estoque de carboidratos das raízes da planta hospedeira, ii) efeito da forma química e da concentração de nutrientes no crescimento dos fungos e na colonização, iii)

amplitude de respostas do fungo às alterações dessas fontes, e iv) características próprias da espécie de fungo em relação ao custo de carbono e benefícios de nutrientes (EATON e AYRES, 2002). O uso indiscriminado da adubação fosfatada solúvel, além de causar prejuízos à associação micorrízica, eleva os custos de produção, desperdiça um recurso natural não renovável e ocasiona danos ao ambiente.

Outro aspecto qualitativo importante da ação dos fungos micorrízicos em relação à disponibilização de nutrientes é a solubilização de constituintes de rochas pela ação de ácidos, liberando P, potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (WALLANDER, WICKMAN e JACKS, 1997; WALLANDER, 2000; LANDEWEERT et al., 2001).

As micorrizas também beneficiam as plantas na absorção de água (DUDDRIDGE, MALIBARI e READ, 1980), permitindo maior tolerância à seca (PARKE, LINDERMAN e BLACK, 1983). Esta deve ser uma das razões para o fato de as mudas que já saem colonizadas do viveiro apresentarem maior resistência ao estresse causado pelo transplante do que as mudas sem micorrizas (SMITH e READ, 1997).

O manto e a rede de Hartig protegem a planta fisicamente da ação de patógenos (MARX e DAVEY, 1969) e alguns fungos ectomicorrízicos podem ampliar essa proteção através da produção de antibióticos (TSANTRIZOS et al., 1991; BAUMERT et al., 1997). Tam e Griffiths (1993a), em experimento de síntese *in vitro*, observaram a formação de zonas de antibiose próximas às raízes colonizadas, demonstrando a habilidade de um isolado ectomicorrízico de restringir a contaminação por fungos saprofitos. A diminuição da fonte de nutrientes na rizosfera, o desenvolvimento de uma microbiota antagônica e a produção de metabólitos que inibem os patógenos são fatores que, também, influenciam a proteção das plantas por esses fungos (SMITH e READ, 1977).

Dentre os benefícios promovidos pela simbiose está a produção de hormônios pelos fungos ectomicorrízicos que induzem a rizogênese e contribuem para o estabelecimento da

associação (KARABAGHLI-DEGRON et al., 1998; NIEMI et al., 2002; RINCON et al., 2003) e afetam as respostas de crescimento em plântulas de coníferas (SCAGEL e LINDERMAN, 1998).

Esses fungos também apresentam uma grande diversidade de respostas a elementos potencialmente tóxicos, auxiliando as plantas na tolerância à acidificação do solo e à fitotoxicidade (TURNAU, KOTTKE e DEXHEIMER, 1996; MEHARG e CAIRNEY, 2000; BRUNNER, 2001).

Os benefícios da prática da inoculação micorrízica são particularmente significativos quando a introdução dos fungos é feita em solos ou substratos que tenham sido anteriormente fumigados; em áreas sem vegetação ou sujeitas a repouso prolongado; na recuperação de áreas degradadas; quando as plantas são introduzidas em locais sujeitos a queimadas freqüentes; quando da introdução de espécies exóticas; ou, simplesmente, quando se deseja melhorar o crescimento das plantas (CASTELLANO e MOLINA, 1989).

1.2.4. Métodos de inoculação de fungos ectomicorrízicos

Reconhecida a importância da inoculação de fungos ectomicorrízicos em mudas de pínus, para assegurar a implantação da floresta e aumentar a produtividade, surge o desafio de executar esta prática. Viveiristas utilizam diferentes técnicas de inoculação: (i) cobertura das mudas com solo proveniente de florestas; (ii) uso de esporos provenientes de coletas de corpos de frutificação; (iii) uso de inoculante obtido a partir de micélio do fungo, chamado inoculante vegetativo.

A primeira técnica foi bastante utilizada quando observou-se a dificuldade em implantar as florestas de pínus em locais fora de seu habitat natural (VOZZO e HACKSKAYLO, 1971). Essa técnica é utilizada ainda hoje pelos viveiristas no Brasil, mas

apresenta o risco de introduzir inços e doenças nas mudas, além de não se poder controlar o tipo de fungo ectomicorrízico que está sendo introduzido. O inoculante à base de solo proveniente de florestas maduras pode conter mais esporos de fungos do estágio tardio do que de estágio inicial (MARX e CORDELL, 1989), o que dificultará a colonização das mudas e contribuirá para o fracasso do programa de controle da micorrização.

O uso de esporos provenientes de corpos de frutificação é uma técnica que apresenta como vantagem a possibilidade de estocar o inoculante de um ano para o outro, além de ser de fácil aplicação (MARX e CORDELL, 1989). Como inconveniente, torna os produtores dependentes do ciclo de frutificação nas florestas, que pode ser variável de um ano para outro. Esse tipo de inoculante não pode ser obtido a partir de certas espécies de fungos que não produzem esporos, como é o caso de *Cenococcum geophyllum*. Além disso, os esporos podem apresentar uma grande porcentagem de dormência e existe um tempo de latência de várias semanas entre o contato com as raízes e o estabelecimento da simbiose. Nesse período a colonização por outros fungos micorrízicos já presentes no solo ou, ainda, por patógenos, reduzem ou anulam o efeito da inoculação (GARBAYE, 1990). Outro importante problema do uso de esporos como inoculante é a diversidade genética apresentada, principalmente se coletados de várias áreas geográficas, com diferentes condições climáticas e combinados num único inóculo (MARX, MAUL e CORDELL, 1992).

A utilização de inoculante vegetativo, obtido de culturas puras desses fungos apresenta-se como a prática mais apropriada para inoculação, por permitir selecionar fungos eficientes para cada condição ambiente-hospedeiro (GARBAYE, 1984). O inoculante miceliano tem sido produzido mais frequentemente em substrato sólido (turfa e vermiculita) enriquecido com meio de cultura (MARX et al., 1989; ALVES et al., 2001). Também é usado o cultivo em meio líquido seguido pela inclusão do micélio em alginato de cálcio (LE

TACON et al., 1983; MAUPÉRIN et al., 1987; ROSSI, 2001; ROSSI, SOUZA e OLIVEIRA, 2002).

Lapeyrie e Bruchet (1985) concluíram que fatores como a idade do micélio, a sobrevivência do micélio após a fragmentação e o tipo de meio no qual é produzido o inóculo são fatores determinantes para o êxito da produção de inoculante em meio líquido. Este tipo de inoculante pode ser produzido em larga escala através de biorreatores e requer mão de obra especializada (BRUNDRETT et al., 1996). A inclusão do micélio em alginato protege as hifas de eventual dessecação e objetiva manter a viabilidade e a infectividade em nível elevado até a formação de raízes que sejam receptivas ao fungo micorrízico (BOUKCIM, CONVENTI e MOUSAIN, 2002).

A técnica de produção em meio sólido apresenta como inconveniente o requerimento de maior espaço para crescimento das culturas e armazenamento. A vermiculita, tratada pelo calor para expandir as lâminas e extrair a água, constitui uma boa opção pelo custo, facilidade de uso e capacidade de proteger o micélio dos isolados. Entretanto, como seu pH é próximo à neutralidade e, portanto, elevado para o crescimento ótimo dos fungos ectomicorrízicos, deve-se adicionar um material ácido, utilizando-se, geralmente 10 a 30% (v/v) de turfa (GARBAYE, 1990). A avaliação da infectividade de inoculante produzido comercialmente em meio sólido mostrou que, em geral, o micélio fresco é mais efetivo e que sua infectividade diminui com o tempo de armazenamento. Entretanto, o armazenamento em temperatura baixa (2 °C) prolonga a viabilidade do micélio pelo menos dois meses a mais que a obtida com o armazenamento a 21 °C (HUNG e MOLINA, 1986).

As duas técnicas de produção de inoculante vegetativo de isolados de fungos ectomicorrízicos têm sido aprimoradas e os resultados observados quanto ao sucesso da inoculação em relação à colonização radicular variam conforme o fungo ectomicorrízico (BOUKCIM, CONVENTI e MOUSAIN, 2002).

1.2.5. Práticas que afetam a colonização e a eficiência micorrízica

Além da adubação com concentrações elevadas de P e N (REID e HACSKAYLO, 1982), outros fatores podem afetar a colonização das raízes pelos fungos ectomicorrízicos. São exemplos o uso de agrotóxicos, os agentes de controle biológico e condições ambientais extremas no solo.

Considerando que os fungos ectomicorrízicos fazem parte da população microbiana da rizosfera e do solo, os efeitos do uso de agrotóxicos na população microbiana geral podem ser a causa de muitas alterações observadas nos fungos ectomicorrízicos e nas micorrizas (TRAPPE, MOLINA e CASTELLANO, 1984). Os fungicidas tiazóis (benomil, carbendazin, fuberidizol) são os fungicidas indicados para utilização em viveiros de pinus, pois não afetam significativamente o crescimento dos fungos ectomicorrízicos. Já os ditiocarbamatos (ferbam, mancozeb, zineb, ziram), ou substitutos aromáticos, tendem a inibir a colonização micorrízica (CASTELLANO e MOLINA, 1989). Entretanto, O'Neill e Mitchell (2000) observaram um efeito inibidor do benomil no processo de colonização ectomicorrízica em *Picea sitchensis* e uma estimulação desse processo, e do crescimento de raízes, quando foi realizada uma única aplicação de captan. Os efeitos de fungicidas e herbicidas no crescimento de fungos ectomicorrízicos foram testados *in vitro*, observando-se que propamocarb foi o fungicida mais tolerado, enquanto que benomil, captan e tiram reduziram o crescimento miceliano a partir de certas concentrações. Himezaxol e iprodione apresentaram o maior efeito inibidor e os herbicidas glifosato, hexazinone, simazine produziram pouco ou nenhum efeito (DIAZ, CARRILLO e HONRUBIA, 2003).

Merece atenção, também, o efeito do parasitismo sobre fungos micorrízicos, que pode reduzir a colonização quando são aplicados produtos à base de organismos micoparasitas para controle biológico de doenças de raiz (BRIMNER e BOLAND, 2003).

Outros fatores como tensão de oxigênio, condições de temperatura e de pH extremas do solo ou do substrato podem afetar os fungos micorrízicos e o processo de colonização. Senior et al. (1993) testaram isolados de fungos ectomicorrízicos de estágio inicial em relação à tensão de oxigênio e observaram que *Paxillus involutus* não cresceu em ausência de oxigênio, enquanto que *Laccaria proxima* e *Hebeloma crustuliforme* apresentaram crescimento do micélio de forma difusa em meio sólido na placa. Com o isolado de *Hebeloma crustuliforme* apresentando colônia com maior diâmetro, indicando uma maior resistência a essa condição.

O pH do substrato de plantio também influencia os fungos ectomicorrízicos, sendo favorável a faixa entre de 4,8 e 5,8 para promover o crescimento de mudas de pinus (MARX, 1990). Isolados de *Pisolithus tinctorius* apresentaram velocidades de crescimento diferentes em faixas de pH 4 a 5, pH 4 a 6 e pH 3 a 7 (HUNG e TRAPPE, 1983). Assim, com a seleção de isolados, é possível escolher aqueles que se adaptem melhor às condições de pH predominantes no local de plantio.

O volume de água fornecido às mudas é um outro fator a ser considerado quando há inoculação de fungos ectomicorrízicos em viveiros. As quantidades excessivas ou reduzidas de água nas plantas tendem a diminuir a intensidade de colonização micorrízica. No caso das plantas excessivamente irrigadas, há a tendência ao aparecimento de raízes grossas e opacas, destituídas de pelos radiculares. Essas raízes não são colonizadas pelos fungos micorrízicos, já que os mesmos infectam apenas as raízes curtas (CASTELLANO e MOLINA, 1989). Além disso, altos teores de umidade diminuem as trocas gasosas para o fungo.

Solos frios (5 a 8 °C) podem ser limitantes para a formação de micorrizas enquanto que em temperaturas de 15 °C a 17 °C, um maior número de isolados é capaz de colonizar as plantas (HUSTED e LAVENDER, 1989). Theodorou e Bowen (1971) observaram colonização extremamente baixa a 16 °C quando comparada à colonização à temperatura de

20 °C. Isolados de *Pisolithus tinctorius* e *Suillus bovinus* apresentaram uma faixa estreita de temperatura para crescimento ótimo, 28 °C a 36 °C e 20 °C a 28 °C, respectivamente (HUNG e CHIEN, 1978). Isso demonstra a necessidade de selecionarem-se isolados para inoculação com base nos resultados obtidos em temperaturas do solo apropriadas para a área e a estação do ano onde as plantas serão cultivadas.

Assim, o primeiro e mais importante passo num programa de inoculação de mudas de essências florestais é a seleção dos fungos. Esses fungos devem apresentar boa infectividade e eficiência na promoção do crescimento das plantas. Também devem apresentar crescimento rápido em meios baratos de modo a viabilizar a adoção de práticas de inoculação pelos produtores florestais.

1.3. SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS

1.3.1. Classificação e ocorrência dos fungos ectomicorrízicos no Brasil, com ênfase a Santa Catarina

O maior número de fungos ectomicorrízicos conhecidos pertence ao filo Basidiomycota, mas há também representantes dos filios Ascomycota e Zygomycota. Espécies dos gêneros *Pisolithus*, *Amanita*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* e *Suillus* são os principais fungos encontrados nas plantações e são alvo do presente trabalho de seleção.

Pisolithus, é o gênero mais estudado e empregado em programas de micorrização controlada na maioria dos países (MARX, 1980; GARBAYE, 1990; DE LA CRUZ, LORILLA e AGGANGAN, 1990). São gasteromicetos com ampla distribuição e suas frutificações (carpóforos) podem ser encontradas isoladas ou em grupos, ao longo de estradas,

em desertos e em solos pobres e areia (ARORA, 1986). Os isolados mostram variações na morfologia dos carpóforos e dos basidiósporos, o que permite dividir o gênero em várias espécies (WATLING et al., 1995; CHAMBERS e CAIRNEY, 1999; MARTIN et al., 2002). Os espécimes deste gênero foram todos inicialmente colocados na espécie *P. tinctorius*. No entanto, esta última parece ser específica de coníferas, enquanto que no Brasil e aparentemente na Austrália, carpóforos deste gênero parecem ser exclusivos de plantações de *Eucalyptus* spp. (BOUGHER e SYME, 1998; OLIVEIRA e GIACHINI, 1999). As espécies observadas em Santa Catarina foram *P. microcarpus*, *P. albus*, e não *P. tinctorius* como até então se acreditava (GIACHINI et al., 2000).

O gênero *Suillus* apresenta carpóforos conspícuos e geralmente epígeos com himenóforos tubulares, que normalmente formam a maior porção da frutificação. Esses fungos ocorrem em florestas de coníferas (DAHLBERG e FINLAY, 1999). Em Santa Catarina, foi observado que as espécies desse gênero, além de apresentar especificidade em relação aos pinus, ocorrem predominantemente nos plantios de idade avançada, indicando tratar-se de fungos de estágio tardio (GIACHINI e OLIVEIRA, 1996; GIACHINI et al., 2000; GIACHINI, SOUZA e OLIVEIRA, 2004).

Rhizopogon é um gênero de hábito hipógeo e é um dos mais importantes membros das comunidades ectomicorrízicas de coníferas, contribuindo significativamente para a produtividade da biomassa fúngica e a dominância dos fungos ectomicorrízicos (MOLINA et al., 1999). Em Santa Catarina, esses fungos, além de apresentar especificidade em relação a coníferas, estão associados exclusivamente com plantações jovens (GIACHINI e OLIVEIRA, 1996; GIACHINI et al., 2000).

Scleroderma spp. são gasteromicetos de ampla distribuição que produzem carpóforos entre folhas de liteira, na grama ou em solo nu em áreas adjacentes a florestas (GUZMÁN, 1970; JEFFRIES, 1999). Esses carpóforos são frequentemente encontrados no interior de

florestas e em sitios com desequilíbrios ambientais (SIMS, WATLING e JEFFRIES, 1995). Estudos em plantações de *Pinus* em Santa Catarina indicaram que a maioria das espécies de *Scleroderma* era do tipo multiestádios (GIACHINI e OLIVEIRA, 1996). Algumas espécies são de ocorrência limitada a pínus, outras são encontradas somente em eucalipto, enquanto que outras ocorrem nos dois tipos de plantação (GUZMÁN, 1970, GIACHINI et al., 2000, GIACHINI, SOUZA e OLIVEIRA, 2004).

O gênero *Amanita* é um himenomiceto de hábito epígeo, praticamente cosmopolita, possui espécies com composição venenosa e outros comestíveis (YANG et al, 1999). Em Santa Catarina foi observada a especificidade dessas espécies em relação a pínus, sendo considerado um gênero de estágio tardio (GIACHINI e OLIVEIRA, 1996, GIACHINI et al., 2000, GIACHINI, SOUZA e OLIVEIRA, 2004).

1.3.2. Avaliação de respostas das plantas à inoculação ectomicorrízica

A seleção dos fungos ectomicorrízicos eficientes e a adoção da prática de inoculação, independentemente do tipo de inoculante utilizado, determinam o emprego de técnicas de avaliação dos efeitos e a escolha dos parâmetros a ser analisados. Assim, é essencial que os parâmetros utilizados no processo de avaliação da eficiência dos fungos testados sejam aqueles mais representativos.

Segundo Marx, Ruehle e Cordell (1991), o diâmetro do caule e a massa seca da planta são excelentes medidas da resposta à inoculação, sendo a última o indicador mais sensível. A massa seca da parte aérea deve ser determinada separadamente da massa seca da raiz. Entretanto, quando a massa seca da raiz e a da parte aérea refletem tratamentos similares, a massa seca total e a razão entre a massa seca da parte aérea e a da raiz devem ser registradas e calculadas as medidas de variabilidade. Em plantas jovens, a altura da parte aérea não é uma

medida sensível para pequenas diferenças entre os tratamentos de inoculação. O diâmetro do colo, por sua vez, é fortemente correlacionado com a massa seca.

Diversos autores têm utilizado o teor de P na planta como indicador do benefício da micorrização (BOUGHER, GROVE e MALAJCZUK, 1990; THOMSON, GROVE e MALAJCZUK, 1994; ALVES et al, 2001; NARLOCH, 2002; SOUZA, 2003). Por outro lado, Dighton, Poskitt e Brown (1993) avaliaram a taxa de influxo de P no fungo e recomendam este método para a seleção de isolados fúngicos eficientes na micorrização. Existem outros benefícios que poderiam ser medidos de forma indireta como a sobrevivência das mudas na fase de regeneração e a fecundidade das plantas na fase adulta, mas esses parâmetros são de mensuração mais difícil (SMITH e READ, 1997).

Garbaye (1990) analisou o resultado de estudos realizados por vários autores em plantações experimentais, publicados entre os anos de 1977 a 1990, comparando o crescimento das plantas não inoculadas em viveiros (naturalmente colonizadas com fungos indígenas) com o das plantas inoculadas e colonizadas por um isolado introduzido. Nos 25 casos estudados, os parâmetros medidos foram: altura (em idades diferentes), volume por ha (variando entre 3, 4 e 8 anos), volume do tronco (aos 2 anos), % sobrevivência (aos 2 anos), massa do tronco (aos 2 anos); massa da matéria seca (a 1 ano) e o aumento em altura entre o primeiro e segundo ano.

Esses estudos foram realizados em diferentes países, levando-se em consideração as variações de clima, solo, essência florestal e fungo inoculado. Os parâmetros de crescimento avaliados indicaram um aumento de 0,8 a 2,8 vezes das plantas inoculadas em relação às testemunhas, quanto à altura; de 1,0 a 6,5 vezes quanto ao volume; de 1,2 a 1,3 quanto à porcentagem de sobrevivência. Também se verificou aumento de 1,0 vez na matéria seca (100%); 4,0 vezes na massa da parte aérea e de 1,0 a 1,4 vezes no crescimento entre o

primeiro e segundo ano. De modo geral, as plantas inoculadas apresentaram aumentos de crescimento que variaram de 0,8 a 4,0 vezes em relação às plantas testemunhas.

Um dos principais parâmetros avaliados na pesquisa com ectomicorrizas é representado pela quantificação da colonização radicular, que pode ser feita pela estimativa visual ou pela contagem direta. A estimativa visual pode ser feita com o auxílio de lente de aumento, estimando-se qual a proporção de raízes que apresenta uma ectomicorriza específica em relação a todo o sistema radicular. Pode-se utilizar um sistema de notas, onde, 0 – quando não há micorrizas; 0,5 – encontram-se apenas micorrizas raras dispersas, 1 – micorrizas menos raras, mas ainda dispersas, 2 - micorrizas abundantes, agrupadas em pequenas áreas do sistema radicular, 3 – micorrizas abundantes em todo o sistema radicular (GARBAYE, 1984). Pode-se, ainda, usar as notas tabuladas em classes, classificando-se a ocorrência como excelente (75 a 100% das raízes colonizadas), boa (50 a 74%), moderada (24 a 49%) ou pobre (1 a 24%) (MARX, RUEHLE e CORDELL, 1991).

A partir desses dados, pode ser calculado um índice que varia de 0 a 100 e indica a agressividade do fungo, a eficácia do inóculo e o desempenho no campo. Este índice é obtido a partir da fórmula $(a.b)/c$, onde a representa a porcentagem de mudas com um determinado tipo de micorriza, b representa a porcentagem média das raízes curtas com esse tipo de micorriza (incluindo 0% para aquelas sem a micorriza) e c representa a porcentagem média de colonização de todas as micorrizas formadas (total colonizado), incluindo aquele tipo que está sendo analisado (MARX, MAUL e CORDELL, 1992).

A colonização pode também ser determinada pela contagem de fragmentos de raiz espalhados em uma placa de Petri com o fundo marcado com quadrículas, registrando-se a presença ou ausência de micorrizas nas intersecções das linhas (GIOVANETTI e MOSSE, 1980, modificado por BRUNETT et al., 1996). A contagem direta de todo sistema radicular é realizada apenas quando um pequeno número de plântulas está envolvido no experimento.

Nesse método, cada pequena porção de raiz e ectomicorriza é contabilizado com o auxílio de uma lente e o comprimento das raízes laterais é mensurado. O resultado pode ser apresentado como o número total de ectomicorrizas por planta, número de ectomicorriza por unidade de comprimento de raiz lateral, ou porcentagem de raízes curtas que são micorrizas. Quando as plantas são maiores, são coletadas amostras de raízes laterais ao acaso, nas quais são contadas as ectomicorrizas e estabelecida a porcentagem de colonização (MARX, RUEHLE e CORDELL, 1991).

Os diferentes métodos de avaliação permitem observar a compatibilidade dos isolados ectomicorrízicos com a espécie hospedeira e relacionar a colonização com os efeitos sobre o crescimento e sobrevivência das plantas. Dessa forma, pode ser realizada a micorrização controlada, selecionando-se os isolados para ambientes específicos, permitindo maior produtividade e a recuperação de áreas degradadas.

1.3.3. Potencial biotecnológico do controle da micorrização

No Brasil ainda não existem inoculantes ectomicorrízicos comerciais, mas a necessidade do estabelecimento dessa simbiose para o bom desempenho das mudas já é reconhecida pela grande maioria dos produtores. Acredita-se que muito em breve, a presença de micorrizas seja um dos requisitos para a certificação das mudas à semelhança do que já vem sendo feito no Canadá (Dr. Damase Khasa, Université du Québec, Canadá, comunicação pessoal).

É essencial que se dê início ao processo de seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para as diferentes essências florestais cultivadas no país e ao desenvolvimento de inoculantes desses fungos em escala industrial (NARLOCH, 2002; SOUZA, 2003; ROSSI, SOUZA e OLIVEIRA, 2002). No caso das espécies de *Pinus*, reconhecidamente de alta

dependência dessa simbiose, a inoculação com isolados fúngicos compatíveis e eficientes acarretará incrementos na produtividade a médio e a longo prazo (NARLOCH, 2002).

A adoção de práticas de inoculação nos viveiros levará ao estabelecimento de empresas de produção de inoculantes ou à diversificação de empresas já existentes, gerando novos empregos e receitas.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM SUBSTRATO SÓLIDO

2.1. INTRODUÇÃO

Para ampliar os benefícios da associação micorrízica é preciso verificar a compatibilidade e a infectividade desses fungos em relação ao hospedeiro (GARBAYE, 1984). Desta forma, é necessário isolar esses fungos e cultivá-los em laboratório para viabilizar a inoculação de mudas mantidas em casa de vegetação e/ou viveiros. O isolamento e a manipulação experimental de culturas de fungos ectomicorrízicos tem sido um ponto crítico no desenvolvimento de todas as fases da pesquisa com ectomicorrizas (MOLINA e PALMER, 1982).

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), através de seu Laboratório de Ectomicorrizas, contando com auxílio de empresas florestais, vem realizando desde 1989 o levantamento e a identificação dos fungos ectomicorrízicos nas plantações florestais do Estado. Os resultados têm demonstrado uma grande diversidade de espécies nesses locais (GIACHINI e OLIVEIRA, 1997; OLIVEIRA e GIACHINI, 1999; GIACHINI et al., 2000; GIACHINI, SOUZA e OLIVEIRA, 2004).

Os fungos ectomicorrízicos isolados em Santa Catarina e de outras áreas de produção de essências florestais são mantidos em cultura na coleção do laboratório. Os isolados dos

fungos ectomicorrízicos da UFSC vêm sendo testados quanto ao seu potencial para colonizar e promover benefícios para *Eucalyptus*, já existindo indicações de quais são os melhores isolados para auxiliar no crescimento das mudas (SOUZA, 2003; SOUZA, SILVA FILHO e OLIVEIRA, 2004).

Ao mesmo tempo em que a infectividade e a eficiência dos isolados são testadas, pesquisas estão sendo desenvolvidas com vistas ao estabelecimento de técnicas de produção de inoculantes desses fungos. Além de conter um isolado infectivo e eficiente em relação à planta de interesse, o inoculante deve ser de boa qualidade, oferecendo condições apropriadas para o fungo resistir às condições de estresse físico, químico e biológico envolvidos na produção de inóculo, assim como aquelas impostas pelo substrato das mudas ou o solo (SMITH e READ, 1997). O inóculo precisa sobreviver no mínimo quatro a seis semanas entre a inoculação e a produção de raízes curtas pelas mudas (MARX e KENNEY, 1982). A produção de micélio em meio sólido, composto de turfa-vermiculita-meio MNM (Melin-Norkrans Modificado), proporciona essas condições aos fungos ectomicorrízicos e tem sido amplamente utilizada (MARX et al., 1982).

Os fungos ectomicorrízicos apresentam diferenças fisiológicas e nutricionais quando cultivados em meio de cultura, variando a velocidade de crescimento e a tolerância à falta de oxigênio (MOLINA e PALMER, 1982). A quantidade de oxigênio disponível nos frascos de cultivo pode ser limitada e a falta de aeração é um dos fatores limitantes para o crescimento de fungos ectomicorrízicos.

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da aeração do substrato de cultivo, turfa e vermiculita mais solução nutritiva, no crescimento e na viabilidade do micélio de isolados fúngicos ectomicorrízicos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS:

O inóculo dos fungos foi preparado a partir de culturas dos isolados da coleção de fungos ectomicorrízicos da UFSC, oriundos de plantações de *Pinus* spp. localizadas, em sua grande maioria, no Estado de Santa Catarina (Tabela 2.1). Para isso, cada isolado foi semeado em meio MNM sólido (Melin-Norkrans Modificado - anexo A) (MARX, 1969), em cinco placas de Petri e incubados em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de luz, durante 15 a 20 dias (Figura 2.1).

Tabela 2.1. Isolados ectomicorrízicos da coleção da UFSC utilizados na produção de inoculante para mudas de *Pinus taeda*.

Código	Espécie	Hospedeiro de origem	Fonte
UFSC – Am158	<i>Amanita muscaria</i>	<i>Pinus taeda</i>	Correia Pinto - SC
UFSC – Am75	<i>Amanita muscaria</i>	<i>Pinus taeda</i>	Correia Pinto - SC
MARX 270	<i>Pisolithus tinctorius</i>	<i>Pinus</i> sp.	Georgia - USA
UFSC – Rh71	<i>Rhizopogon</i> sp.	<i>Pinus taeda</i>	Três Barras - SC
UFSC – Rh90	<i>Rhizopogon nigrescens</i>	<i>Pinus taeda</i>	Três Barras - SC
UFSC – Rh106	<i>Rhizopogon vulgaris</i>	<i>Pinus taeda</i>	Correia Pinto- SC
UFSC – Rh117	<i>Rhizopogon rubescens</i>	<i>Pinus taeda</i>	Três Barras - SC
UFSC – Sc42	<i>Scleroderma</i> sp.	<i>Pinus</i> sp.	Blumenau - SC
UFSC – Sc133	<i>Scleroderma citrinum</i>	<i>Pinus elliottii</i>	Florianópolis - SC
UFSC – Su94	<i>Suillus cothurnatus</i>	<i>Pinus</i> sp.	Florianópolis - SC
UFSC – Su103	<i>Suillus cothurnatus</i>	<i>Pinus elliottii</i>	Florianópolis - SC
UFSC – Su118	<i>Suillus cothurnatus</i>	<i>Pinus taeda</i>	Três Barras - SC
UFSC – Su155	<i>Suillus cothurnatus</i>	<i>Pinus taeda</i>	Correia Pinto- SC

Em seguida, três discos de micélio foram retirados das bordas das colônias e utilizados para semear 25 mL de meio MNM líquido em frascos erlenmeyers de 250 mL. Após 16 dias de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o micélio de cada dois frascos foi fragmentado em liquidificador em 50 mL de meio MNM líquido, durante 7 segundos. Esse volume de suspensão miceliana foi utilizado para semear um frasco com substrato sólido para produção do inoculante (Figura 2.2).

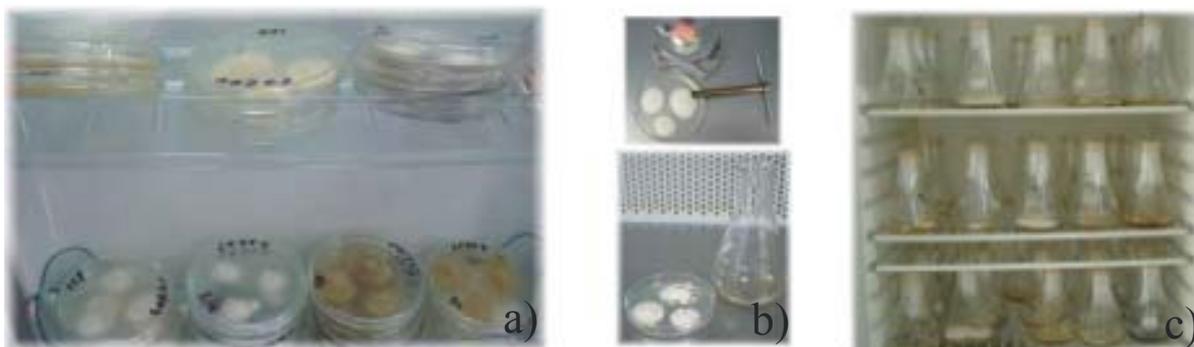


Figura 2.1. Etapas do procedimento de obtenção do inóculo para a produção do inoculante de isolados de fungos ectomicorrízicos: a) Crescimento dos isolados em meio MNM; b) Cortes dos discos e inoculação em meio MNM líquido; c) Crescimento das culturas em meio MNM líquido em incubadora BOD.

Como substrato para a produção do inoculante foram utilizados 300 mL de uma mistura de turfa e vermiculita (4:1 v/v), esterilizada em autoclave (120°C) durante 60 minutos, em frasco de vidro com capacidade de 900 mL. Depois de 24 horas, foram adicionados 100 mL de meio de cultura líquido MNM e realizada uma segunda esterilização durante 20 minutos. Após a esterilização, o conteúdo dos frascos foi semeado com a suspensão miceliana, obtida do cultivo em meio líquido descrita anteriormente. Os frascos foram fechados com tampa rosqueável e incubados sob duas condições diferentes de aeração (Figura 2.2).

Num dos tratamentos, as tampas dos frascos possuíam orifícios vedados com fita microporosa (Figura 2.2a). A esse tratamento denominou-se "aeração natural". No outro caso, foram introduzidas duas mangueiras de silicone: uma para a passagem do ar, previamente umedecido, proveniente de uma bomba do tipo usada para aquário, com capacidade de 4,5 litros por minuto e a outra para a saída do ar (Figura 2.2b). As duas mangueiras foram preenchidas com filtro de ar feito de algodão. A mangueira que conduzia a aeração para o fundo do frasco possuía na extremidade uma pedra porosa destinada à produção de pequenas bolhas de ar. Esse tratamento foi denominado "aeração forçada". Nos dois casos, foram feitas duas repetições para cada isolado.

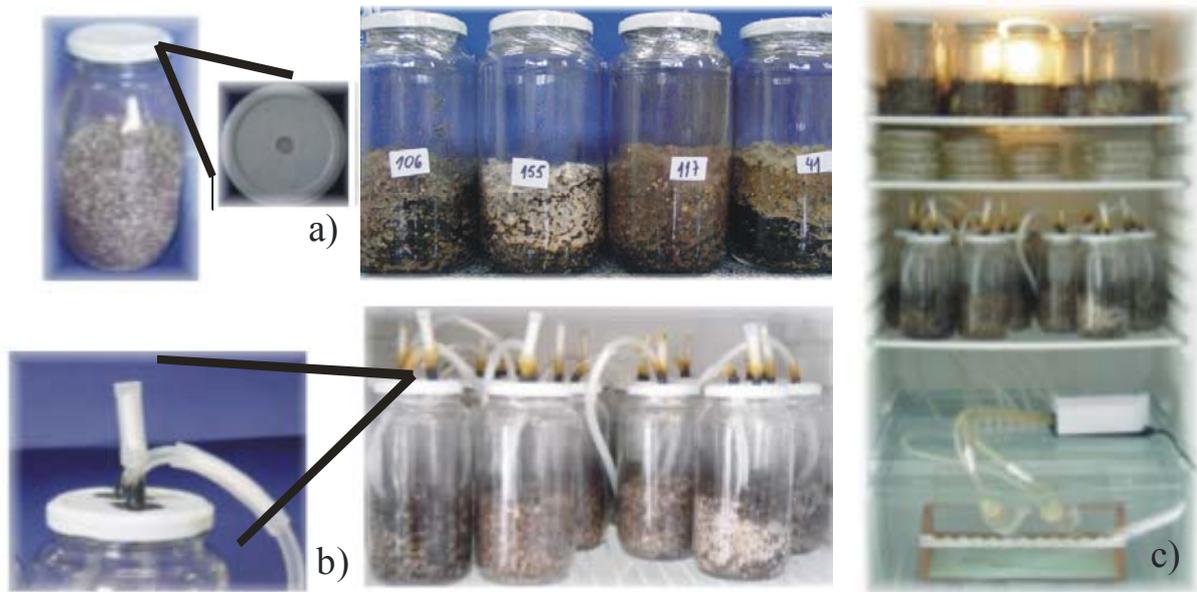


Figura 2.2. Detalhes da produção de inoculante em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 60 dias, em ausência de luz: a) Produção do inoculante em frascos com aeração natural; b) Produção do inoculante em frascos com aeração forçada; c) Cultivo dos frascos com e sem aeração forçada.

O cultivo foi realizado em câmara de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de luz (Figura 2.2c). O crescimento dos isolados foi avaliado aos 60 dias, atribuindo-se uma nota para cada frasco de acordo com uma escala arbitrária, considerando-se a área visível da mistura colonizada pelo micélio (Figura 2.3). A viabilidade do inoculante foi avaliada, semeando-se cerca de 6 mL do substrato colonizado em meio MNM sólido em placa de Petri, seguido de incubação nas mesmas condições de temperatura.

A análise estatística dos dados foi realizada aplicando-se o teste $2\hat{I}$, utilizando-se quadro de frequência e tabelas de contingência (ARBONNIER,1966). O teste $2\hat{I}$ é uma aplicação da lei polinomial, e utiliza quadros da função $n \log n$ para valores inteiros de n e permite trabalhar com frequências observadas com valores baixos ou nulos.



Figura 2.3. Avaliação visual de crescimento de micélio nos frascos de cultivo: Nota 1: 25% de área colonizada; Nota 2: 50% de colonização; Nota 3: 75% de colonização; Nota 4: 100% de colonização.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observaram-se diferenças significativas quanto à velocidade de crescimento em função do isolado avaliado. Alguns isolados colonizaram inteiramente a área visível do substrato no período de 60 dias, enquanto que outros isolados colonizaram apenas parte dessa área (Tabela 2.2). A coloração do micélio variou conforme o isolado, sendo alguns facilmente diferenciados por esta característica, enquanto que outros exigiam uma observação mais detalhada.

O isolado UFSC-Sc 42 foi o que apresentou o crescimento mais lento em relação a todos os outros fungos. Os isolados UFSC-Su103 e UFSC-Su118 foram os únicos isolados que colonizaram 100% da área visível, em todas as repetições. O inoculante de todos os isolados apresentou viabilidade quando semeado em meio de cultura sólido ao término do

cultivo (Figura 2.4). Observou-se a distribuição do micélio entre as lâminas da vermiculita, formando agrupamentos e agregação das partículas do substrato, o que Marx e Bryan (1975) sugerem como um fator importante para a proteção contra microrganismos antagonistas e outros fatores adversos do solo.

Tabela 2.2. Avaliação visual do crescimento de isolados dos fungos ectomicorrízicos em meio sólido, após 60 dias de cultivo, com aeração natural (+) e com aeração forçada (-).

Isolados	Aeração ⁽¹⁾	N° de frascos observados			$2\hat{I}^{(2)}$ $\chi^2_{0,05}$
		Notas de colonização			
		1 e 2	3	4	
UFSC-Am75	+	0	2	0	0
	-	0	2	0	
UFSC-Am158	+	0	2	0	0
	-	0	2	0	
UFSC-Rh90	+	0	1	1	4,498
	-	0	2	0	
UFSC-Rh106	+	0	0	2	4,498
	-	0	1	1	
UFSC-Rh71	+	0	2	0	0
	-	0	2	0	
UFSC-Rh117	+	0	1	1	1,724
	-	0	0	2	
UFSC-Su118	+	0	0	2	0
	-	0	0	2	
UFSC-Su103	+	0	0	2	0
	-	0	0	2	
UFSC-Su155	+	0	0	2	4,498
	-	0	1	1	
UFSC-Su94	+	0	0	2	0
	-	0	2	0	
UFSC-Sc133	+	0	1	1	2,772
	-	0	1	1	
UFSC-Sc42	+	2	0	0	1,724
	-	1	1	0	
MARX 270	+	0	1	1	1,724
	-	0	0	2	

⁽¹⁾ Tratamentos de aeração, cujos valores de $\chi^2_{0,05}$, para um mesmo isolado, são inferiores a 5,991, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste $2\hat{I}$.

⁽²⁾ Nota 1: 25% de área colonizada; Nota 2: 50% de colonização; Nota 3: 75% de colonização; Nota 4: 100% de colonização.

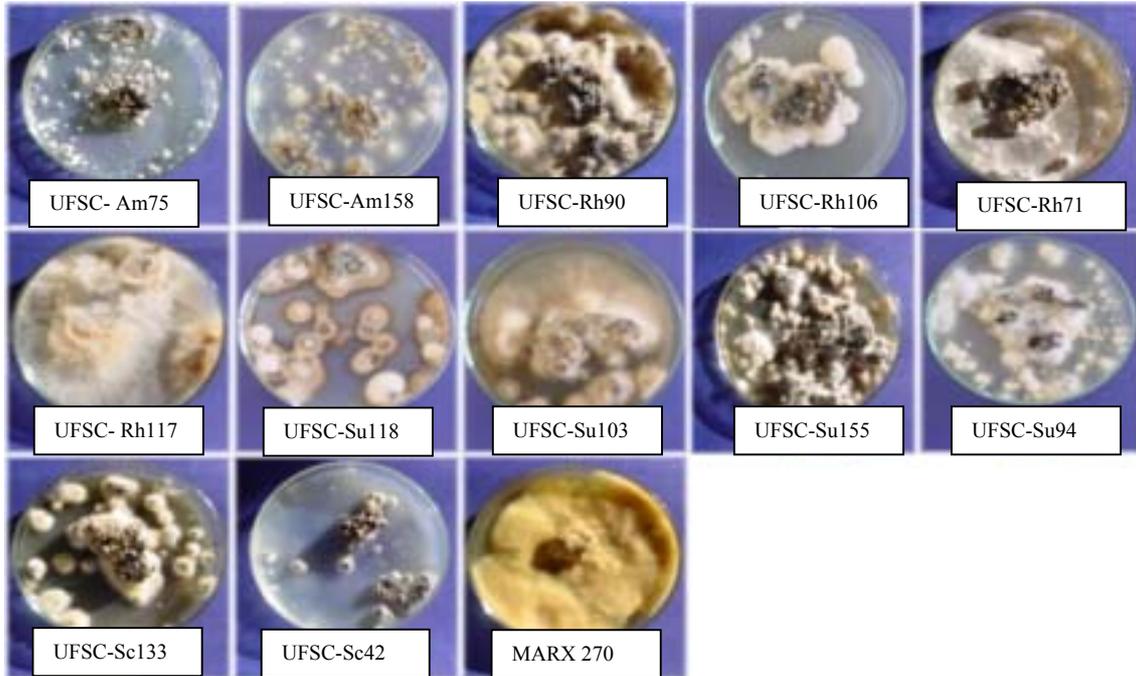


Figura 2.4. Teste de viabilidade de inoculante de fungos ectomicorrízicos, produzido em substrato sólido (turfa-vermiculita-solução nutritiva) após 60 dias de incubação ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

Apesar das diferenças entre os isolados, a aplicação do teste de homogeneidade dentro dos tratamentos de aeração não evidenciou diferenças significativas entre os tratamentos aeração forçada e aeração natural para todos os isolados testados. Isso demonstra que a quantidade de oxigênio que passa através da fita porosa é suficiente para sustentar o crescimento dos fungos, não havendo necessidade de se introduzir um sistema suplementar de aeração. A produção do inoculante com aeração forçada pode aumentar o custo, o tempo de preparação do inoculante e os riscos de contaminação, devido à introdução do dispositivo de aeração no interior da massa de inoculante.

A vantagem de se produzir um inoculante ectomicorrízico pela técnica de fermentação sólida (turfa e vermiculita) reside no fato de o processo poder ser realizado num laboratório com equipamento tipo padrão para culturas de fungos (BRUNDRETT et al., 1996). Ao aplicar essa tecnologia observaram-se algumas particularidades que podem garantir o êxito do cultivo, desde o início da produção do inóculo até o crescimento nos frascos. A primeira a destacar é a importância de renovar a matriz de micélio em meio sólido, 2 a 3 vezes em

intervalos de 15 a 20 dias, dependendo do isolado, antes de se colocarem os discos em meio líquido. Esse procedimento evita o esgotamento dos nutrientes e o acúmulo de substâncias inibitórias. Quando a velocidade de crescimento dos isolados em meio sólido é de 6 a 8 cm de diâmetro após 15 a 20 dias de incubação, esta é considerada uma boa taxa de crescimento (MARX e KENNEY, 1982). Rossi (2001) e Souza (2003) usaram o procedimento de subculturas em meio líquido para acelerar o crescimento posterior no processo de fermentação, obtendo um aumento significativo no vigor do micélio na etapa final de produção do inoculante.

A quantidade de meio líquido colocada para o crescimento dos fungos corresponde a 50% do volume do substrato turfa-vermiculita. Se for aumentada a quantidade de meio líquido, de tal forma que ocorra líquido sobrenadante, o crescimento dos fungos será bastante reduzido ou não haverá crescimento de micélio. Esse comportamento também foi observado por Souza (2003).

No presente estudo, observou-se que o micélio deveria ser colocado no substrato para crescimento logo após ter sido fragmentado no liquidificador, porque, se armazenado em meio de cultura perderia a viabilidade. No sistema aerado, foi necessário umidificar o ar antes da entrada no frasco, pois observou-se que o substrato ficava muito seco quando o ar era injetado diretamente no sistema. É necessário ter cuidado com o volume de água no local onde o ar é umidificado para que esta não seja conduzida pela mangueira e venha a molhar o filtro de algodão, aumentando os riscos de contaminação do inoculante. Também observou-se que é necessário manter a umidade do substrato em torno de 50% para não afetar a velocidade de crescimento dos fungos ectomicorrízicos ou mesmo sua viabilidade.

No final do cultivo, observaram-se resíduos de meio de cultura no fundo dos frascos, sendo necessário, portanto, lavar o inoculante com água esterilizada antes de sua utilização, para evitar contaminação com microrganismos que possam comprometer o inoculante. Esses

resíduos pareceram mais abundantes nos frascos com crescimento lento. Isso representa uma etapa suplementar quando da aplicação do substrato em sistema de viveiro e pode promover aumento do custo da operação, o que se constitui numa desvantagem. Para evitar essa etapa de lavagem poderia ser testada uma nova concentração de nutrientes para o cultivo, de tal forma que todo o açúcar seja consumido (GARBAYE, 1990). Entretanto, é necessário determinar a concentração adequada de nutrientes para cada isolado a fim de alcançar esse resultado. Como foi visto, os isolados apresentam velocidade de crescimento diferente, de modo que o consumo de açúcar será diferente de um isolado para outro.

Foi possível produzir inoculante no sistema turfa-vermiculita de todos os isolados em estudo, o que possibilitou, na seqüência, utilizar esses isolados em um estudo de seleção para determinar sua eficiência na promoção do crescimento de mudas de *Pinus taeda*.

2.4. CONCLUSÕES

1. A aeração forçada e a aeração natural do substrato proporcionaram crescimento equivalente dos isolados ectomicorrízicos quanto à velocidade e à abundância.

2. Todos os isolados ectomicorrízicos testados produzem inoculante viável, tanto sob aeração natural quanto sob aeração forçada.

CAPÍTULO 3

SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *PINUS TAEDA* L.

3.1. INTRODUÇÃO

Os fungos têm eficiência variável dependendo do isolado e das condições ambientais, notadamente da fertilidade do solo. Em solos fertilizados, principalmente com P, há diminuição dos benefícios da associação micorrízica (SMITH e READ, 1997). O aumento da disponibilidade de P no solo reduz o incremento no crescimento promovido pela simbiose.

Garbaye e Wilhelm (1985) acompanharam o processo de colonização de raízes e observaram a ocorrência de duas fases, sendo a primeira caracterizada pela distribuição do micélio ao redor das partículas de vermiculita e a segunda pela colonização da rizosfera pelo fungo, seguidas sucessivamente de infecções primárias e secundárias. Os autores concluíram que na segunda fase, as doses de P e N são determinantes no processo de colonização, porque modificam a composição química e biológica da rizosfera e a receptividade da planta à simbiose.

A inoculação das plantas com fungos ectomicorrízicos tem sido baseada em duas premissas. A primeira é a de que qualquer micorriza nas raízes é melhor para a planta do que nenhuma. A segunda é a de que algumas espécies (ou isolados) de fungos ectomicorrízicos,

sob certas condições ambientais, são mais benéficas para as plantas do que outras (MARX, 1980). As diferenças fisiológicas existentes entre os fungos ectomicorrízicos, tais como a especificidade de hospedeiros, infectividade e agressividade na colonização das raízes, crescimento em cultura pura, adaptabilidade a diferentes condições ambientais, formação de rizomorfas, captação e disponibilização de nutrientes (mineralização, solubilização), eficácia na promoção do crescimento das plantas e desempenho da muda colonizada no campo podem ser usados como critérios para seleção (MARX e BRYAN, 1970; GARBAYE, 1984; MARX e CORDELL, 1989). Assim, é necessário que sejam feitos estudos para determinar as melhores combinações fungo-hospedeiro visando o estabelecimento de um programa de controle de micorrização.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi selecionar isolados de fungos ectomicorrízicos eficientes na promoção do crescimento de mudas de *Pinus taeda*, definindo os níveis de fósforo que favorecem a colonização, a infectividade e a eficiência para o hospedeiro.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Produção do inoculante dos isolados fúngicos ectomicorrízicos

Foram utilizados inoculantes dos 13 isolados fúngicos cultivados com aeração natural, conforme descrito no capítulo 2, item 2.2. Após ser testada a viabilidade do inoculante, este foi transferido para uma peneira de malha 0,42 mm e lavado com água esterilizada para retirar os resíduos de meio de cultura, diminuindo, conseqüentemente, os riscos de contaminação. Em seguida, o inoculante foi homogeneizado manualmente com uma espátula.

3.2.2. Preparo das sementes de *Pinus taeda* e do substrato de plantio

As sementes de *P. taeda*, obtidas de pomar clonal de segunda geração, provenientes da Geórgia (USA), foram desinfectadas em solução de etanol (70%) e submetidas ao tratamento de quebra de dormência, em câmara de refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 180 dias.

Como substrato de plantio foi utilizada uma mistura de turfa e vermiculita (30:70, v/v) (Anexo - B), previamente esterilizada em autoclave a 120°C durante 60 min e distribuída em tubetes cônicos de plástico, com volume de 60 mL. Os tubetes foram previamente lavados e desinfectados em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) durante 72 horas.

Esse substrato recebeu uma solução nutritiva contendo nitrogênio (N), potássio (K) e micronutrientes (ALVES et al., 2001), descrita na tabela 3.1. A adubação nitrogenada foi parcelada em cinco aplicações. O fósforo (P) foi aplicado na forma de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ nas dosagens de 0, 0,5, 1, 2 e 4 mg por planta, conforme o tratamento.

Tabela 3.1. Teores de nutrientes utilizados para adubação do substrato de plantio⁽¹⁾

Elemento	Produto comercial	Quantidade por planta
K	K_2SO_4	16,0 mg
N	NH_4NO_3	35,0 mg
Mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3,0 mg
Mn	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150,0 mg
Zn	$\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	37,5 μg
Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125,0 μg
Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50,0 μg
B	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	50,0 μg
Fe	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	375,0 μg

⁽¹⁾Doses utilizadas de acordo com ALVES et al. (2001).

3.2.3. Instalação e condução do experimento

O inoculante fúngico foi adicionado ao substrato de plantio na proporção de 10% (v/v) e, em seguida, foi homogeneizado manualmente em condições assépticas e umidificado com água esterilizada (ALVES et al., 2001). No tratamento testemunha, não inoculado, as plantas receberam igual proporção do substrato de produção do inoculante, livre de fungos. Foram colocadas cinco sementes por tubete, efetuando-se o desbaste após quatro semanas, deixando-se somente uma planta por tubete.

O experimento obedeceu a um delineamento fatorial, com cinco doses de P, 13 isolados fúngicos ectomicorrízicos e uma testemunha (sem inoculação), com quatro repetições por tratamento, num total de 280 plantas.

O experimento foi montado no Laboratório da UnC – Campus de Caçador e conduzido na Casa de Vegetação da Estação Experimental da EPAGRI, em Caçador, SC, numa temperatura média de 27,7°C, distribuídas ao acaso, com adição diária de água destilada. Durante os 45 primeiros dias, a área experimental foi protegida com um filme de plástico transparente para evitar a contaminação com fungos micorrízicos existentes nas florestas da região.

3.2.4. Avaliação dos resultados

Após 120 dias de crescimento, as plantas foram colhidas, medindo-se a altura e o diâmetro do caule. O sistema radicular foi separado da parte aérea, lavado, colocado em solução FAA (formalina-aceto-álcool, 9:1:1 v/v/v) e observado quanto à porcentagem de

colonização. Em seguida, foi secado, juntamente com a parte aérea, em estufa a 75°C até peso constante, para determinação da massa de matéria seca.

O conteúdo de fósforo nos tecidos foi analisado através de digestão por via úmida, com H₂SO₄ e H₂O₂, pelo método vanadato-molibdato, e a leitura efetuada em espectrofômetro a 660 nm (TEDESCO et al., 1995). Os resultados foram expressos em mg de P por planta.

A intensidade de colonização radicular foi estimada através da contagem de 500 pontas de raízes por planta sob lupa binocular (30 X), anotando-se para cada planta o número de raízes curtas com micorrizas e transformando-se os valores em porcentagem de colonização. A natureza micorrízica dessas raízes foi confirmada ao microscópio óptico em secções transversais obtidas em crio-micrótomo (20 µm).

Os dados de crescimento (altura, diâmetro do caule e matéria seca) e dos teores de P na parte aérea foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,5$). Buscando-se estabelecer a relação entre os níveis dos fatores e a variável em estudo, também utilizou-se a análise de regressão. Para a análise estatística, os dados de porcentagem de colonização foram transformados em $\sqrt{\%colonização + 0,5}$.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados ectomicorrízicos foram capazes de colonizar as raízes das plantas de *Pinus taeda*. Entretanto, observaram-se diferenças na intensidade de colonização entre os isolados. As doses de P influenciaram esse parâmetro, tendo sido as dosagens mais baixas

aquelas mais favoráveis, enquanto que a dose mais elevada apresentou-se limitante à colonização.

As micorrizas formadas variaram no aspecto de coloração e morfologia conforme os isolados. Também foram observadas diferentes respostas no crescimento das plantas, sendo afetados principalmente, os parâmetros biomassa e teor de P na parte aérea.

3.3.1. Colonização radicular

Todos os isolados testados formaram micorrizas com as mudas de *Pinus taeda*. As micorrizas formadas variaram em morfologia, desde bifurcações simples até estruturas do tipo coralóide (Figura 3.1).

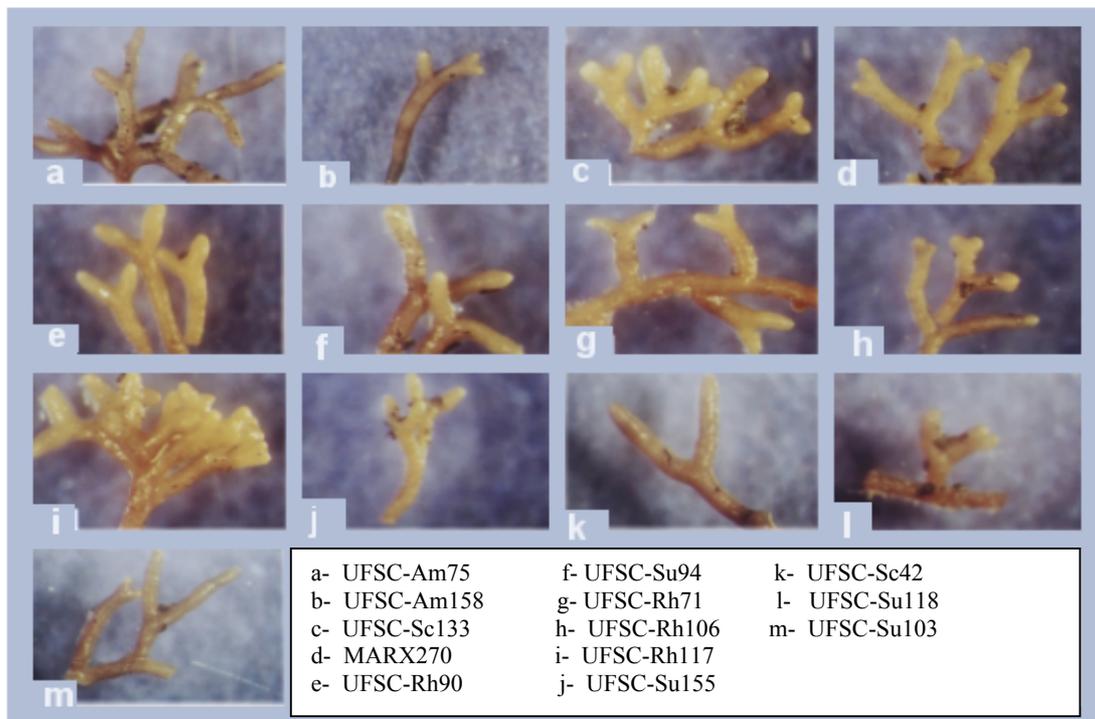


Figura 3.1. Ectomicorrizas formadas entre os isolados de fungos ectomicorrízicos e mudas de *Pinus taeda*, sob condições de casa de vegetação.

Os dados de colonização apresentaram grande variabilidade dentro de cada tratamento e a taxa média geral de colonização radicular foi 6,8 %, variando de 2,5 a 14,2 % entre os isolados (Tabela 3.2). Assim, não foram evidenciadas diferenças quanto à infectividade dos isolados. As plantas testemunhas não apresentaram colonização, indicando não ter havido contaminação por outros fungos ectomicorrízicos presentes eventualmente no local. Portanto, pode-se afirmar que embora a porcentagem de colonização tenha sido baixa, as micorrizas observadas nas plantas inoculadas pertenciam ao isolado introduzido.

Tabela 3.2. Colonização radicular de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
	Colonização (%)					
Testemunha	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 A
Marx 270	7,6	25,1	0,3	20,7	1,7	11,1 A
UFSC-Am75	0,0	33,7	17,6	19,9	0,0	14,2 A
UFSC-Am158	14,8	11,8	0,0	0,0	7,9	6,9 A
UFSC-Rh71	15,8	13,8	0,0	0,0	3,6	6,6 A
UFSC-Rh90	0,0	11,7	11,2	11,9	0,0	7,0 A
UFSC-Rh106	12,1	3,1	18,4	0,0	0,0	6,7 A
UFSC-Rh117	0,0	0,6	0,2	24,6	0,0	5,1 A
UFSC-Sc42	10,7	14,7	0,0	16,4	0,0	8,4 A
UFSC-Sc133	0,0	6,2	22,5	10,2	0,0	7,8 A
UFSC-Su94	0,0	6,6	5,0	9,2	0,0	4,1 A
UFSC-Su103	0,0	0,0	13,3	0,0	0,0	2,7 A
UFSC-Su118	11,2	0,0	0,0	1,5	0,0	2,5 A
UFSC-Su155	30,2	0,0	0,0	29,4	0,0	11,9 A
Média	7,3 ab	9,1 ab	6,3 ab	10,3 a	0,9 b	6,8

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As plantas que receberam a maior dose de P (4 mg por planta) foram aquelas que apresentaram os menores valores de porcentagem de colonização, com uma média de 0,9 % (Tabela 3.2.). Esse valor foi significamente inferior ao obtido com a dose de 2 mg P por planta, 10,3%. A análise de regressão (Figura 3.2.) confirma os resultados de outros autores quanto ao efeito inibidor de doses elevadas de P sobre a colonização micorrízica

(BOUGHER, GROVE e MALAJCZUK, 1990; SOARES et al., 1990; SOUZA, SILVA FILHO e OLIVEIRA, 2004).

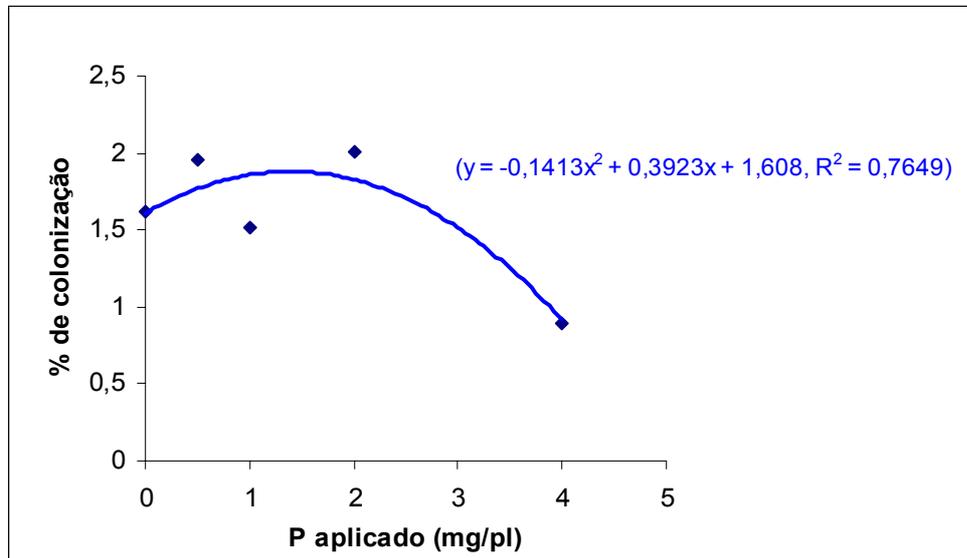


Figura 3.2. Relação entre a dose de P aplicada e a porcentagem de colonização de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação.

Bougher, Grove e Malajczuk (1990) também observaram que a colonização de raízes de *Eucalyptus diversicolor* por diferentes isolados de fungos ectomicorrízicos foi inibida pelo aumento das doses de fósforo no substrato de plantio. Esse comportamento também foi observado em estudo com plantas de *E. dunnii* inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e adubadas com diferentes níveis de fósforo (SOUZA, SILVA FILHO e OLIVEIRA, 2004).

A porcentagem de colonização observada neste estudo é bastante inferior aos valores relatados por alguns autores para esta espécie vegetal (36 a 69%) (MARX et al., 1989; MARX, 1990). No entanto, Narloch (2002), testando alguns dos isolados utilizados neste estudo em relação à solubilização de fosfatos, também observou uma baixa porcentagem de colonização micorrízica em *Pinus taeda*.

É possível que os procedimentos de lavagem tenham provocado perdas de micélio, diminuindo, assim, o potencial infeccioso do inoculante. Porém, Garbaye e Wilhelm (1985) recomendam a lavagem do inoculante para evitar a contaminação do substrato de plantio por fungos saprófitas que podem competir pelos exsudatos da raiz com o fungo micorrízico introduzido, ou mesmo ter efeito antagônico sobre a associação micorrízica (OLIVEIRA e GARBAYE, 1989). Além disso, a presença de açúcares oriundos do meio de cultura utilizado na produção do inoculante pode favorecer microrganismos patogênicos de raiz, o que viria a prejudicar direta ou indiretamente a colonização radicular pelo fungo micorrízico.

É possível, também, que a longa permanência dos isolados em cultura na coleção do laboratório tenha contribuído para a redução de sua infectividade, como é sugerido por Molina e Palmer (1982). Entretanto, Souza (2003) obteve valores de colonização micorrízica elevados em mudas de *E. dunnii*, utilizando isolados com um longo período de conservação em meio de cultura. Alguns dos isolados utilizados por esse autor tinham mais de 10 anos de cultivo sem, no entanto, perder seu poder infectivo.

3.3.2. Eficiência dos isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção do crescimento de mudas de *Pinus taeda*

Embora os isolados tenham apresentado baixa porcentagem de colonização, foram observados efeitos significativos da inoculação sobre alguns dos parâmetros de crescimento analisados. Em relação ao diâmetro, observou-se que as mudas inoculadas com o isolado MARX 270 (*P. tinctorius*) foram superiores à testemunha e àquelas inoculadas com os isolados UFSC-Am158 (*A. muscaria*), UFSC-Rh106 (*R. vulgaris*), UFSC-Sc133 (*S. citrinum*), UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*), UFSC-Rh117 (*R. rubescens*), UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) e UFSC-Su155 (*S. cothurnatus*) (Tabela 3.3). As plantas inoculadas com o

isolado MARX 270 apresentaram diâmetro de 2,4 mm, 12,5% superior às plantas testemunhas (Tabela 3.3). As doses de P aplicadas não apresentaram efeitos sobre este parâmetro.

Tabela 3.3. Diâmetro do colo de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg por planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
	Diâmetro do colo (mm por planta)					
Testemunha	2,3	2,0	2,2	2,0	2,1	2,1 B
Marx 270	2,6	2,3	2,2	2,6	2,4	2,4 A
UFSC-Am75	2,1	2,4	2,2	2,5	2,2	2,3 AB
UFSC-Am158	1,9	2,1	2,1	2,1	2,1	2,0 B
UFSC-Rh71	2,2	2,1	2,3	2,2	2,3	2,2 AB
UFSC-Rh90	2,2	2,2	2,2	2,3	2,2	2,2 AB
UFSC-Rh106	2,1	2,1	2,0	2,0	2,3	2,1 B
UFSC-Rh117	2,3	2,1	2,0	2,3	2,1	2,1 B
UFSC-Sc42	2,2	2,1	2,3	2,2	2,3	2,2 AB
UFSC-Sc133	2,0	2,2	2,4	2,0	2,2	2,1 B
UFSC-Su94	2,3	2,1	2,3	2,2	2,1	2,2 AB
UFSC-Su103	2,2	2,1	2,0	2,2	2,0	2,1 B
UFSC-Su118	2,1	2,0	2,1	2,0	2,1	2,0 B
UFSC-Su155	2,1	2,0	2,0	2,4	1,9	2,1 B
Média	2,2 a	2,1 a	2,2 a	2,2 a	2,1 a	2,2

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto à altura, as mudas inoculadas com os isolados UFSC-Am75 (*A. muscaria*) e UFSC-Rh106 (*R. vulgaris*) apresentaram os valores significativamente superiores aos do tratamento UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*) (Tabela 3.4). Como observado em relação ao diâmetro do caule, não foram detectados efeitos das doses de P aplicadas ao substrato de plantio sobre a altura das plantas.

Entretanto, houve efeito das doses de P e dos isolados sobre os parâmetros de matéria seca e nutrição das plantas. O isolado UFSC-Am75 (*A. muscaria*) foi mais eficiente na produção de biomassa da parte aérea, sendo superior aos isolados UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*), UFSC-Rh117 (*R. rubescens*), UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) e UFSC-Su155 (*S.*

cothurnatus) (Tabela 3.5). Este parâmetro sofreu influência da dose de P aplicada, com as doses de 1,0, 2,0 e 4,0 mg de P por planta promovendo massa seca superior à obtida com as doses de 0 e 0,5 mg de P por planta. O valor máximo de matéria seca da parte aérea, 0,74 g por planta, foi o mesmo na dose 1,0 mg de P por planta e na dose de 4 mg (Tabela 3.5).

Tabela 3.4. Altura de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg por planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
	Altura (cm por planta)					
Testemunha	11,5	11,5	12,3	13,6	13,4	12,5 AB
Marx 270	11,0	13,9	13,4	14,0	13,3	13,1 AB
UFSC-Am75	13,3	12,6	14,3	12,3	14,4	13,4 A
UFSC-Am158	11,8	12,1	13,5	13,2	12,6	12,6 AB
UFSC-Rh71	11,3	14,8	13,2	13,4	12,6	13,0 AB
UFSC-Rh90	13,4	12,9	13,0	12,7	13,3	13,1 AB
UFSC-Rh106	15,2	12,6	11,8	13,1	14,0	13,3 A
UFSC-Rh117	13,0	12,2	13,9	12,9	11,7	12,8 AB
UFSC-Sc42	13,4	13,3	11,9	12,9	12,8	12,8 AB
UFSC-Sc133	11,9	12,0	13,2	11,4	14,5	12,6 AB
UFSC-Su94	13,0	11,4	13,6	13,1	12,9	12,8 AB
UFSC-Su103	9,8	12,0	10,7	12,4	12,1	11,4 B
UFSC-Su118	13,7	12,3	12,3	12,3	12,9	12,7 AB
UFSC-Su155	11,0	12,1	12,4	12,4	10,4	11,6 AB
Média	12,4 a	12,5 a	12,8 a	12,8 a	12,9 a	12,7

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os diferentes isolados contribuíram de forma diferenciada na produção matéria seca de raiz. O isolado MARX 270 (*P. tinctorius*) foi aquele que promoveu o maior valor, 0,19 g por planta (Tabela 3.6), tendo sido superior à testemunha e aos isolados UFSC-Am158 (*A. muscaria*), UFSC-Rh71 (*Rhizopogon* sp.), UFSC-Rh90 (*R. nigrescens*), UFSC-Sc133 (*S. citrinum*), UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.), UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*), UFSC-Rh117 (*R. rubescens*), UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) e UFSC- Su155 (*S. cothurnatus*). A aplicação das diferentes doses de P não resultou em diferenças na massa seca da raiz.

Tabela 3.5. Massa seca da parte aérea de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg por planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
Massa seca da parte aérea (g por planta)						
Testemunha	0,58	0,57	0,72	0,67	0,85	0,68 ABC
Marx 270	0,64	0,78	0,80	0,82	0,70	0,75 AB
UFSC-Am75	0,70	0,76	0,79	0,78	0,84	0,77 A
UFSC-Am158	0,62	0,74	0,70	0,70	0,72	0,70 ABC
UFSC-Rh71	0,62	0,73	0,83	0,79	0,75	0,74 AB
UFSC-Rh90	0,69	0,63	0,68	0,65	0,76	0,68 ABC
UFSC-Rh106	0,66	0,66	0,72	0,76	0,77	0,71 ABC
UFSC-Rh117	0,65	0,65	0,74	0,67	0,59	0,66 BC
UFSC-Sc42	0,73	0,69	0,70	0,74	0,83	0,74 AB
UFSC-Sc133	0,64	0,63	0,83	0,73	0,75	0,72 ABC
UFSC-Su94	0,62	0,66	0,82	0,77	0,76	0,73 ABC
UFSC-Su103	0,54	0,68	0,66	0,72	0,67	0,65 BC
UFSC-Su118	0,62	0,62	0,72	0,69	0,72	0,67 BC
UFSC-Su155	0,56	0,67	0,64	0,73	0,58	0,63 C
Média	0,63 b	0,68 b	0,74 a	0,73 a	0,74 a	0,70

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3.6. Massa seca da raiz de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg por planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
Massa seca da raiz (g por planta)						
Testemunha	0,15	0,14	0,17	0,16	0,18	0,16 BCD
Marx 270	0,20	0,18	0,18	0,20	0,18	0,19 A
UFSC-Am75	0,15	0,18	0,18	0,17	0,17	0,17 AB
UFSC-Am158	0,14	0,15	0,14	0,16	0,15	0,15 BCD
UFSC-Rh71	0,15	0,17	0,17	0,16	0,15	0,16 BCD
UFSC-Rh90	0,15	0,18	0,16	0,16	0,13	0,16 BCD
UFSC-Rh106	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17 ABC
UFSC-Rh117	0,18	0,15	0,16	0,14	0,12	0,15 BCD
UFSC-Sc42	0,16	0,15	0,14	0,14	0,15	0,15 BCD
UFSC-Sc133	0,15	0,15	0,18	0,12	0,14	0,15 BCD
UFSC-Su94	0,16	0,15	0,18	0,18	0,16	0,17 ABCD
UFSC-Su103	0,12	0,14	0,15	0,16	0,14	0,14 CD
UFSC-Su118	0,13	0,13	0,14	0,16	0,14	0,14 CD
UFSC-Su155	0,14	0,13	0,13	0,17	0,13	0,14 D
Média	0,15 a	0,15 a	0,16 a	0,16 a	0,15 a	0,16

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os isolados MARX 270 (*P. tinctorius*) e UFSC-Am75 (*A. muscaria*) foram aqueles que apresentaram os melhores resultados de massa seca total, quando comparados aos isolados UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*), UFSC-Rh117 (*R. rubescens*), UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) e UFSC-Su155 (*S. cothurnatus*) (Tabela 3.7). O valor atingido pelas plantas dos dois primeiros tratamentos foi de 0,94 g por planta, representando 18,1 % a mais que o apresentado pelas plantas inoculadas com o isolado UFSC-Su155. Marx e Bryan (1975) observaram que a inoculação com *P. tinctorius*, da mesma espécie que o isolado MARX 270 (*P. tinctorius*), estimulou duas vezes mais a produção de matéria seca quando comparada à testemunha, sem inoculação. Aumentos acima de 20% na massa fresca das plantas foram obtidos em 30 viveiros do sul dos Estados Unidos inoculados com *P. tinctorius*, confirmando a eficiência desse fungo em contribuir para o crescimento das plantas (MARX e CORDELL, 1989).

Tabela 3.7. Massa seca total de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg por planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
	Massa seca total (g por planta)					
Testemunha	0,73	0,71	0,89	0,83	1,03	0,84 ABC
Marx 270	0,84	0,96	0,99	1,02	0,88	0,94 A
UFSC-Am75	0,85	0,94	0,96	0,95	1,01	0,94 A
UFSC-Am158	0,75	0,89	0,85	0,86	0,87	0,84 ABC
UFSC-Rh71	0,78	0,89	0,99	0,95	0,90	0,90 AB
UFSC-Rh90	0,85	0,81	0,84	0,81	0,90	0,84 ABC
UFSC-Rh106	0,83	0,83	0,89	0,93	0,93	0,88 ABC
UFSC-Rh117	0,82	0,81	0,89	0,82	0,72	0,81 BC
UFSC-Sc42	0,89	0,84	0,84	0,89	0,98	0,89 AB
UFSC-Sc133	0,79	0,78	1,01	0,85	0,89	0,86 ABC
UFSC-Su94	0,78	0,81	1,00	0,95	0,92	0,89 AB
UFSC-Su103	0,66	0,82	0,81	0,87	0,81	0,79 BC
UFSC-Su118	0,75	0,75	0,86	0,85	0,86	0,81 BC
UFSC-Su155	0,70	0,80	0,77	0,90	0,71	0,77 C
Média	0,79 b	0,83 b	0,90 a	0,89 a	0,89 a	0,86

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As plantas que receberam as maiores doses de P foram aquelas com os maiores valores de matéria seca total. Assim, observou-se que a aplicação de P produziu as melhores respostas nas doses 1,0, 2,0 e 4,0 mg de P por planta (Tabela 3.8).

Tabela 3.8. Teor de P na parte aérea de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo.⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg por planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
	µg P por planta					
Testemunha	55,4 Bb	116,4 Aa	123,1 ABa	129,1 ABa	146,8 ABCa	114,2 BCD
Marx 270	63,8 ABb	84,8 Aa	88,2 Ba	134,7 ABa	103,1 Ca	94,9 D
UFSC-Am75	61,2 Bb	121,9 Aa	121,5 ABa	141,5 Aa	143,8 ABCa	118,0 ABC
UFSC-Am158	78,8 ABc	102,0 Abc	116,2 ABbc	136,6 ABab	153,6 ABa	117,5 ABCD
UFSC-Rh71	96,6 ABb	122,9 Aab	137,2 ABab	158,4 Aa	158,0 ABa	134,6 AB
UFSC-Rh90	74,0 ABb	101,2 Aab	110,1 ABab	89,8 Bab	125,3 BCa	100,1 CD
UFSC-Rh106	95,9 ABc	103,3 Abc	118,1 ABabc	139,3 ABab	144,3 ABCa	120,2 ABC
UFSC-Rh117	113,0 Ab	115,7 Aab	148,5 Aab	146,5 Aab	154,0 ABa	135,6 AB
UFSC-Sc133	84,7 ABb	107,9 Aab	128,8 ABa	137,0 ABa	147,6 ABCa	121,2 ABC
UFSC-Sc42	99,9 ABc	114,5 Abc	141,1 Aab	167,0 Aa	164,3 ABa	137,3 A
UFSC-Su94	65,6 ABc	101,0 Abc	135,8 ABab	121,8 ABab	160,3 ABa	116,9 ABCD
UFSC-Su103	87,1 ABc	102,7 Abc	106,3 ABbc	128,0 ABab	167,0 ABa	118,2 ABC
UFSC-Su118	105,3 ABb	130,8 Ab	130,1 ABb	132,6 ABb	190,7 Aa	137,9 A
UFSC-Su155	78,7 ABc	91,3 Abc	109,1 ABabc	144,3 Aab	126,3 BCa	109,9 CD
Média	82,9 e	108,3 d	122,4 c	136,2 b	148,9 a	119,7

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

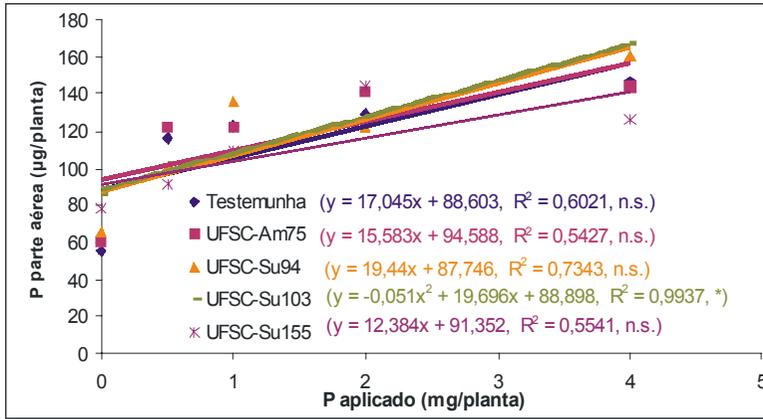
Os isolados UFSC-Sc42 (*Scleroderma*. sp.) e UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) foram os que mais se destacaram no acúmulo de P na parte aérea em relação à testemunha e aos isolados MARX 270 (*P. tinctorius*), UFSC-Rh90 (*R. nigrescens*) e UFSC-Su155 (*S. cothurnatus*) (Tabela 3.8). Souza (2003), testando a eficiência de diferentes isolados no crescimento e nutrição de plantas de *E. dunnii*, destacou a eficiência de alguns isolados fúngicos ectomicorrízicos em aumentar o teor de fósforo na parte aérea das plantas. O autor observou, também, que nem todos os isolados eficientes na produção de matéria seca foram aqueles que se destacaram em relação à acumulação de P pelas plantas. Esta é uma informação

importante, quando se considera que as mudas com maior teor de nutrientes, notadamente o P, poderão ter um melhor desempenho quando transplantadas para o campo onde os solos são geralmente pobres neste elemento.

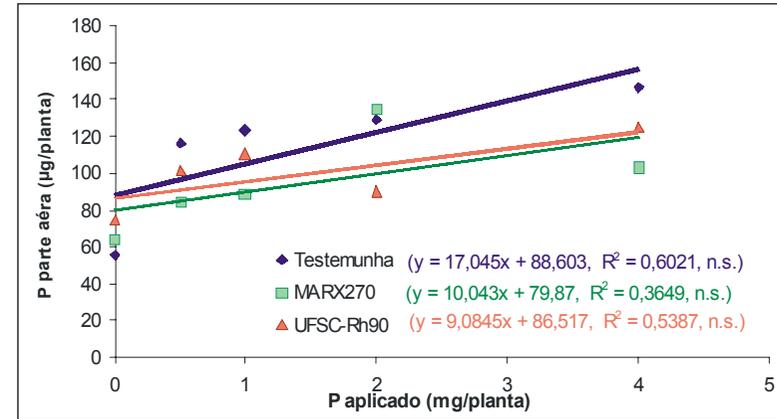
A absorção de P pelas plantas, medidas pelo teor desse elemento na parte aérea, foi influenciada pelas doses de P aplicadas apresentando um teor crescente de P em função da dose aplicada. O teor máximo de 148,9 μg por planta foi atingido com a maior dose de P aplicado (4 mg por planta).

Houve interação entre as doses de P aplicadas e os isolados de fungos ectomicorrízicos no teor de P absorvido pelas plantas. O comportamento dos isolados pode ser agrupado em 4 categorias (Figura 3.3.): a) as plantas inoculadas com os isolados UFSC-Am75 (*A. muscaria*), UFSC-Su94 (*S. cothurnatus*), UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*) e UFSC-Su155 (*S. cothurnatus*) não sofreram efeito da aplicação de fósforo; b) aquelas inoculadas com o isolados UFSC-Rh90 (*R. nigrescens*) e MARX 270 (*P. tinctorius*), apresentaram teor de P inferior aos demais tratamentos em qualquer dose de P aplicada; c) a inoculação dos isolados UFSC-Rh71 (*Rhizopogon* sp.), UFSC-Rh117 (*R. rubescens*), UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.), e UFS-Su118 (*S. cothurnatus*) teve efeito positivo no acúmulo de P na parte aérea em qualquer dose de P aplicada; d) já os isolados UFSC-Am158 (*A. muscaria*); UFSC-Rh106 (*R. vulgaris*) e UFSC-Sc133 (*S. citrinum*), apresentaram efeito variável sobre esse parâmetro dependendo da dose de P aplicada.

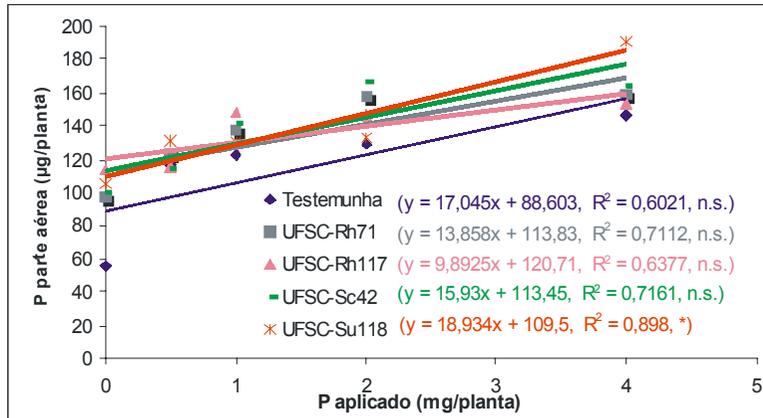
Quando se comparou a eficiência radicular (μg P por mg de massa seca da raiz) entre os tratamentos, observaram-se efeitos positivos de alguns isolados (Tabela 3.9.). Os isolados UFSC-Su118, UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.), e UFSC-Rh117 (*R. rubescens*) foram aqueles que mais se destacaram, apresentando uma eficiência 27 a 35% superior à do tratamento testemunha.



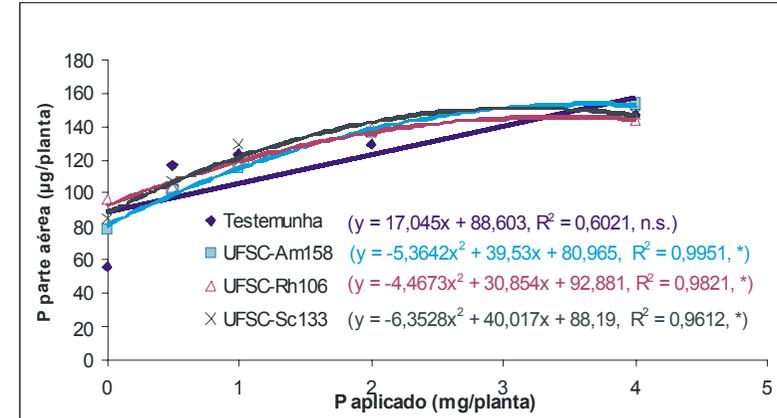
a)



b)



c)



d)

Figura 3.3. Comportamento de isolados de fungos ectomicorrízicos em função da dose de P aplicada: a) Sem efeito; b) Com efeito negativo em qualquer dose de P; c) Efeito positivo em qualquer dose de P; d) Efeito variável dependendo da dose de P.

Tabela 3.9. Eficiência radicular de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, após 120 dias em casa de vegetação, em presença de diferentes doses de fósforo. ⁽¹⁾

Fungo	Dose P aplicada (mg por planta)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
	µg P por mg massa seca da raiz					
Testemunha	374,35	859,68	815,88	833,19	806,21	737,86 CD
Marx 270	366,85	483,28	489,12	666,43	605,90	522,32 BCD
UFSC-Am75	412,97	734,53	709,88	854,48	831,56	708,69 CDE
UFSC-Am158	585,66	689,64	802,40	897,68	998,14	794,70 BCD
UFSC-Rh71	638,73	765,03	831,24	1042,24	774,20	810,29 ABCD
UFSC-Rh90	492,43	632,49	699,59	561,38	932,07	633,59 DE
UFSC-Rh106	564,85	617,31	734,58	812,89	910,62	728,05 CD
UFSC-Rh117	654,62	753,71	971,55	1028,88	1269,34	935,62 AB
UFSC-Sc42	640,66	777,15	1000,60	1149,98	1155,63	944,80 AB
UFSC-Sc133	562,10	749,38	712,03	1149,11	1128,53	860,23 ABC
UFSC-Su94	397,38	702,27	751,93	693,35	1010,86	711,16 CD
UFSC-Su103	706,78	736,86	739,68	828,02	1213,53	844,97 ABCD
UFSC-Su118	802,83	1032,00	944,07	833,63	1359,20	994,37 A
UFSC-Su155	571,54	685,44	856,30	859,87	1003,49	795,33 BCD
Média	555,13 d	729,92 c	789,92 bc	872,22 b	999,95 a	789,43

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Alguns isolados se destacaram na promoção de benefícios, notadamente o isolado MARX 270 (*P. tinctorius*), com maior produção de matéria seca da raiz que a do tratamento testemunha e dos isolados UFSC-Am158 (*A. muscaria*), UFSC-Rh71 (*R. sp.*), UFSC-Rh90 (*R. nigrescens*), UFSC-Sc133 (*S. citrinum*), UFSC-Sc42 (*Scleroderma sp.*), UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*), UFSC-Rh117 (*R. rubescens*), UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) e UFSC-Su155 (*S. cothurnatus*). Esse isolado destaca-se, também, juntamente com o isolado UFSC-Am75 (*A. muscaria*), na promoção da matéria seca total em relação aos isolados UFSC-Su103 (*S. cothurnatus*), UFSC-Rh117 (*R. rubescens*), UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) e UFSC-Su155 (*S. cothurnatus*). Por outro lado, os isolados UFSC-Sc42 (*Scleroderma sp.*) e UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) destacaram-se por promover maior absorção de P pelas plantas.

Embora nem sempre o efeito positivo de alguns dos isolados tenha ocorrido em relação à testemunha, mas somente em relação a outros isolados estudados, seu uso em

programas de inoculação pode ainda ser vantajoso se for considerado que a colonização das mudas não inoculadas pode ocorrer acidentalmente por fungos de baixa eficiência, ou até mesmo com efeitos negativos sobre as plantas, como parece ser o caso do isolado UFSC-Su155 (*S. cothurnatus*) utilizado neste estudo. Além disso, em situações em que as mudas devam ser transplantadas para o campo, a produção de maior massa de raízes ou o maior acúmulo de P na parte aérea podem representar um fator mais favorável a sua sobrevivência durante a crise de transplante do que a massa seca da parte aérea.

Considerando-se o desempenho geral, pode-se indicar os isolados MARX 270 (*P. tinctorius*), UFSC-Am75 (*A. muscaria*), UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp) e UFSC-Su118 (*S. cothurnatus*) com potencial para uso na micorrização controlada de *Pinus taeda*.

Esses resultados não significam, entretanto, que os estudos de seleção de fungos ectomicorrízicos para essa planta devam ser encerrados. Assim, novos isolados deverão ser testados e as condições mais apropriadas à expressão dos benefícios da simbiose ectomicorrízica, pelos isolados selecionados neste estudo ou em outros, deverão, também ser buscadas.

3.4. CONCLUSÕES

1. Todos os isolados fúngicos ectomicorrízicos testados são capazes de colonizar o sistema radicular das mudas de *Pinus taeda*, mas diferem entre si quanto à eficiência na promoção do crescimento e da nutrição dessas plantas.
2. Os isolados UFSC-Am75 e MARX 270 promovem maior produção de massa seca de mudas de *Pinus taeda*. Este último isolado também proporciona aumento do diâmetro do caule, enquanto que o primeiro uma maior altura das plantas.
3. Os isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Su118 promovem maior acúmulo de P na parte aérea das mudas.
4. As baixas doses de P favorecem a colonização micorrízica, sendo a dose de 1 mg P por planta aquela mais favorável.
5. Os isolados MARX 270, UFSC-Am75, UFSC-Sc42 e UFSC-Su118 são aqueles com maior potencial de uso na micorrização controlada de *Pinus taeda*.

CAPÍTULO 4

INFECTIVIDADE DE INOCULANTE ECTOMICORRÍZICO PRODUZIDO EM BIORREATOR *AIRLIFT* E ENCAPSULADO EM ALGINATO DE CÁLCIO

4.1. INTRODUÇÃO

A inoculação de mudas de essências florestais com fungos ectomicorrízicos auxilia a sobrevivência e o crescimento das plantas. Os inoculantes micelianos ou vegetativos têm sido os mais recomendados pois permitem que os fungos sejam selecionados antes de sua aplicação em larga escala. Métodos recentes de produção utilizam cultivo submerso, seguido de encapsulação da biomassa em gel de alginato de cálcio. Inoculantes produzidos por essa técnica foram eficientes na colonização e promoção do crescimento de diferentes plantas (MAUPÉRIN et al., 1987; KROPÁCEK, CUDLÍN e MEJSTRIK, 1990; KUEK, TOMMERUP, MALAJCZUCK, 1992). O micélio encapsulado sobrevive mais tempo no solo, sendo de mais fácil armazenamento e maior viabilidade (GARBAYE, 1990; KUEK, TOMMERUP, MALAJCZUCK, 1992). No entanto, a técnica tem ainda pouca aplicação devido a dificuldades no cultivo que comprometem a qualidade do inoculante, sobretudo na produção em larga escala (ŠAŠEK, 1990).

A utilização de biorreatores *airlift* para o cultivo de fungos ectomicorrízicos é uma tecnologia que vem se revelando promissora e utiliza como modelo isolados de diversos gêneros da coleção de fungos do Laboratório de Ectomicorrizas da UFSC (ROSSI, 2001;

ROSSI, SOUZA, OLIVEIRA, 2002). Paralelamente à seleção dos fungos mais eficientes, estudam-se processos de produção de biomassa fúngica através de cultivo submerso em biorreator *airlift* com circulação externa para obtenção de inoculantes de alta qualidade, baixo custo e com alta viabilidade, de modo a permitir o armazenamento e comercialização do produto.

Os fungos ectomicorrízicos contribuem de forma qualitativa e quantitativa na captura e absorção de nutrientes do solo, sendo sua infectividade e eficiência afetadas pela adubação fosfatada (BOUGHER, GROVE e MALAJCZUK, 1990). Nos viveiros de essências florestais é utilizada rotineiramente a adubação N-P-K solúvel ou em formulação de liberação lenta e continuada dos elementos. A primeira, por disponibilizar de imediato os nutrientes, pode inibir a infectividade dos fungos ectomicorrízicos na planta. A formulação de liberação lenta e continuada pode diminuir os efeitos inibidores da adubação sobre o processo de micorrização.

O objetivo deste estudo foi avaliar a infectividade e eficiência, em função do tempo de armazenamento, de um inoculante de fungo ectomicorrízico, produzido por cultivo submerso em biorreator *airlift* e encapsulado em alginato de cálcio, em relação a mudas de *Pinus taeda*, sob as condições rotineiras de produção de mudas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado inoculante do isolado UFSC-Rh90 da espécie *Rhizopogon nigrescens* Coker e Couch, proveniente de plantações de *Pinus taeda* do Estado de Santa Catarina, produzido através de cultivo submerso em biorreator *airlift* e, posteriormente, encapsulado em gel de alginato de cálcio (ROSSI, SOUZA e OLIVEIRA, 2002). Este inoculante apresentava

oito meses de armazenamento quando foi avaliada a infectividade em relação a mudas de *Pinus taeda*, sob condições de casa de vegetação na Estação Experimental da EPAGRI, em Caçador-SC.

O substrato de plantio constou de uma mistura turfa:vermiculita (30:70, v/v), distribuída em tubetes de PVC de 60 mL, previamente desinfetados com hipoclorito de sódio a 2%. O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C, durante 1 hora, duas vezes consecutivas, com 24 horas de intervalo. Foram aplicados dois tipos de adubação de liberação lenta e uniforme, utilizados em vários viveiros florestais: Osmocote® e Nutricote® contendo 14-8-8 e 18-5-9 de NPK, nas dosagens de 0,25 g por tubete e 0,020 g por tubete, respectivamente. O primeiro produto continha, ainda, em sua formulação, micronutrientes.

Antes do plantio, as sementes de *P. taeda* foram submetidas à quebra de dormência a 4°C durante 180 dias. Depois de testada a viabilidade do inoculante, a inoculação foi feita juntamente com o plantio das sementes, colocando-se quatro cápsulas de gel de inoculante por tubete. A viabilidade do inoculante foi confirmada previamente observando-se o crescimento miceliano em meio de cultura MNM a partir de uma amostra de 50 cápsulas, sob condições de temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em incubadora BOD. O tratamento testemunha (não inoculado) recebeu igual quantidade de cápsulas de alginato sem micélio fúngico. Para cada combinação adubo-inoculação, foram preparadas cinco repetições. Os tubetes foram distribuídos ao acaso em bandejas de isopor, e conservados em casa de vegetação com temperatura controlada de 27,7°C. As plantas foram irrigadas diariamente com água destilada.

Após seis meses de crescimento em casa de vegetação, as plantas foram colhidas, medindo-se a altura e o diâmetro do caule. A biomassa foi pesada após a secagem da parte aérea e raízes à temperatura de $70 \pm 1^\circ\text{C}$, até peso constante. Em seguida, a parte aérea foi utilizada para determinação do conteúdo de fósforo nos tecidos de acordo com Tedesco et al. (1995).

O sistema radicular foi examinado sob lupa binocular (10-30X) para estimar a intensidade de colonização micorrízica. Para isso, contou-se o número de raízes curtas colonizadas (apresentando micorrizas) num total de 500 raízes curtas por planta, transformando-se os valores em porcentagem de colonização. A natureza micorrízica dessas raízes foi confirmada pela obtenção de secções transversais em crio-micrótomo seguida de observações em microscópio óptico (400 X).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para a análise estatística, os dados de porcentagem de colonização micorrízica foram transformados em $\sqrt{\%colonização + 0,5}$.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após oito meses de armazenamento, o inoculante encapsulado de *Rhizopogon nigrescens* (isolado UFSC-Rh90) apresentou-se infectivo quando adicionado ao substrato de plantio de mudas de *Pinus taeda*. A porcentagem de colonização média foi de 37% (Tabela 4.1), não havendo influência da adubação sobre esse parâmetro. A intensidade de colonização observada mostrou-se compatível com os valores obtidos por outros autores em programas de inoculação de mudas com fungos ectomicorrízicos (BOUGHER, GROVE e MALAJCZUK, 1990; SOARES et al., 1990, ALVES et al., 2001; WALKER, 2001).

Embora os resultados sugiram um efeito positivo da inoculação no crescimento de *P. taeda* (Tabela 4.2), em apenas um dos parâmetros avaliados, diâmetro do caule, esse efeito foi significativo. É possível que o período de condução do experimento em casa de vegetação não tenha sido suficiente para que efeitos dos tratamentos fossem evidenciados sobre os demais

parâmetros. Entretanto, alguns autores acreditam que o diâmetro do caule seja um bom parâmetro para medir a resposta das plantas à inoculação (MARX, RUEHLE e CORDELL, 1991). Nesse caso os resultados indicam um efeito positivo do inoculante.

Tabela 4.1. Porcentagem de colonização de mudas de *Pinus taeda*, após 180 dias em casa de vegetação, inoculadas com inoculante do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), produzido em biorreator *airlift*, encapsulado em gel de alginato de cálcio e armazenado durante 8 meses sob refrigeração, com diferentes tipos de adubação ⁽¹⁾.

Adubação	% colonização radicular		
	Testemunha	UFSC-Rh90	Média
14-8-8	0	35	17 <i>A</i>
18-5-9	0	39	20 <i>A</i>
Média	0 <i>b</i>	37 <i>a</i>	

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Observou-se um melhor desempenho do tratamento composto pela combinação inoculante-adubação 14-8-8 quanto ao teor de P nos tecidos da parte aérea (Tabela 4.2), indicando uma interação significativa entre esses dois fatores. Esta formulação apresenta maior teor de P e micronutrientes do que a 18-5-9, indicando que a presença do fECM proporcionou uma maior absorção do P aplicado.

Com esses resultados fica demonstrado que é possível manter a viabilidade e a infectividade do inoculante durante um longo período de conservação em refrigerador graças ao encapsulamento do micélio em gel de alginato de cálcio. Os resultados vêm corroborar as observações de outros autores (LE TACON et al., 1985; MAUPÉRIN et al., 1987) sobre a vantagem de se produzir um inoculante encapsulado, não somente pela facilidade de armazenamento e transporte, como também, e principalmente, pela manutenção da taxa de viabilidade e infectividade por períodos prolongados.

Tabela 4.2. Crescimento de mudas de *Pinus taeda* inoculadas com inoculante do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), produzido em biorreator *airlift*, encapsulado em gel de alginato de cálcio e armazenado durante 8 meses sob refrigeração, após 180 dias em casa de vegetação, com diferentes tipos de adubação⁽¹⁾.

Adubação	Testemunha	UFSC-Rh 90	Média
Fósforo (μg por planta)			
14-8-8	698 bA	993 aA	845 <i>A</i>
18-5-9	643 aA	518 aB	580 <i>B</i>
Média	670 <i>a</i>	755 <i>a</i>	
Altura (cm por planta)			
14-8-8	10,5	11,0	10,8 <i>A</i>
18-5-9	11,0	11,7	11,4 <i>A</i>
Média	10,8 <i>a</i>	11,4 <i>a</i>	11,1
Diâmetro (mm por planta) ⁽¹⁾			
14-8-8	2,4	2,6	2,5 <i>A</i>
18-5-9	2,1	2,7	2,4 <i>A</i>
Média	2,3 <i>b</i>	2,7 <i>a</i>	2,5
Massa seca parte aérea (g por planta)			
14-8-8	0,77	0,93	0,85 <i>A</i>
18-5-9	0,78	0,77	0,78 <i>A</i>
Média	0,78 <i>a</i>	0,85 <i>a</i>	0,82
Massa seca raiz (g por planta)			
14-8-8	0,31	0,33	0,32 <i>B</i>
18-5-9	0,37	0,39	0,38 <i>A</i>
Média	0,34 <i>a</i>	0,36 <i>a</i>	0,35
Massa seca total (g por planta)			
14-8-8	1,08	1,26	1,17 <i>A</i>
18-5-9	1,15	1,17	1,16 <i>A</i>
Média	1,12 <i>a</i>	1,21 <i>a</i>	1,17

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4. CONCLUSÃO

1. O inoculante do isolado UFSC-Rh90, produzido por fermentação submersa em biorreator *airlift* e encapsulado em alginato de cálcio, apresenta infectividade em relação a mudas de *Pinus taeda* após 8 meses de armazenamento, e apresenta potencial para produção comercial e aplicação nos viveiros florestais.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. R.; SOUZA, O.; PODLECH, P. A. S.; GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida no crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 307-313, 2001.

ANTIBUS, R.K; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Phosphatase-activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 4, p. 794-801, 1992.

ARBONNIER, P. L'analyse de l'information: aperçu théorique et application à la loi multinomiale. **Annales des Sciences Forestières**, Paris, v. 4, p. 949-1017, 1966.

ARORA, D. **Mushrooms demystified**: a comprehensive guide to the fleshy fungi. 2. ed. Berkeley: Ten Speed Press, 1986. p. 711-712.

BARKER, S.J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 4, p. 1021-1207, 1998.

BAUMERT, A. et al. Triterpenoids from *Pisolithus tinctorius* isolates and ectomycorrhizas. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n. 3, p. 499-504, 1997.

BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, n. 8, p. 1114-1127, 1993.

BIRRAUX, D.; FRIES, N. Germination of *Thelephora terrestris* basidiospores. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, n. 11, p. 2062-2064, 1981.

BOUGHER, N.L.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* B. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. **New Phytologist**, New York, v. 114, n. 1, p. 77-85, 1990.

_____; SYME, N.L. **Fungi of Southern Australia**. Perth: University of Western Australia Press. 1998. 391 p.

BOUKCIM, H.; CONVENTI, S.; MOUSAIN, D. Ectomycorhization de *Cedrus atlantica* en conditions contrôlées: efficacité de deux formes d'inoculum mycélien. **Annales des Sciences Forestières**, Paris, v. 59, n. 8, p. 839-846, 2002.

BRIMNER, T.A., BOLAND, G.J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 3-16, 2003.

BRUNDRETT, M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, New York, v. 154, n. 2, p. 275-304, 2002.

_____ et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1996. 374 p.

BRUNNER, I. Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zürich, v. 4, n. 1, p.13-27, 2001.

CARAVACA, F. et al. Aggregate stability changes after organic amendment and mycorrhizal inoculation in the afforestation of a semiarid site with *Pinus halepensis*. **Applied Soil Ecology**. Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 199-208, 2002.

CARON NETO, M. O manejo de *Pinus* em função das perspectivas do mercado de toras. In: **Anais do Simpósio Latino Americano Sobre Manejo Florestal**, Santa Maria: UFSM, 2000. p. 149-162.

CASTELLANO, M.A.; MOLINA, R. Mycorrhizae. In: LANDIS, T. D. et al. (Eds). **The container tree nursery manual**. Agriculture Handbook 674, Washington: US Department of Agriculture, Forest Service, 1989. v. 5, p. 101-167.

CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. *Pisolithus*. In: CAIRNEY, J.W.G.; CHAMBERS, S.M.(Eds). **Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 1-31.

CHEN, D.M. et al. Identification of genes for lignin peroxidases and manganese peroxidases in ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, New York, v. 152, n. 1, p. 151-158, 2001.

_____ et al. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. **New Phytologist**, New York, v. 157, n. 3, p. 547-554, 2003.

DAHLBERG, A.; FINLAY, R.D. *Suillus*. In: CAIRNEY, J.W.G.; CHAMBERS, S.M.(Eds). **Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 33-64.

DE LA CRUZ, R.E.; LORILLA, E.B.; AGGANGAN, N.S. Ectomycorrhizal tablets for *Eucalyptus* species. In: WERNER, D.; MÜLLER, P. (Eds.) **Fast growing trees and nitrogen fixing trees**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1990. p. 71.

DIAZ, G.; CARRILLO, C.; HONRUBIA, M. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to pesticides in pure culture. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 24, n. 3, p. 199-211, 2003.

DIGHTON, J. Acquisition of nutrients from organic resources by mycorrhizal autotrophic plants. **Experientia**, Basel, v. 47, n. 4, p. 362-369, 1991.

_____; MASON, P.A. Mycorrhizal dynamics during forest tree development. In: MOORE, D. et al. (Eds.). **Developmental Biology of Higher Fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. p. 177-139.

_____; POSKITT, J.M.; BROWN, T.K. Phosphate influx into ectomycorrhizal and saprotrophic fungal hyphae in relation to phosphate supply: a potential method for selection of efficient mycorrhizal species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n.3, p. 355-358, 1993.

DUDDRIDGE, J.A.; MALIBARI, A., READ, D.J. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. **Nature**, London, v. 287, n. 5785, p. 235, 1980.

EATON, G. K.; AYRES, M.P. Plasticity and constraint in growth and protein mineralization of ectomycorrhizal fungi under simulated nitrogen deposition. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 6, p. 921-932, 2002.

FEUGEY, L. et al. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. **New Phytologist**, New York, v. 144, n. 3, p. 541-547, 1999.

FINLAY, R.D.; READ, D.J. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. 1. Translocation of C¹⁴- labeled carbon between plants interconnected by a common mycelium. **New Phytologist**, New York, v. 103, n. 1, p. 143-156, 1986.

FRANK, B. On the root-symbiosis-depending nutrition through hypogeous fungi of certain trees. **Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft**, v. 3, p. 128-145, 1885. Tradução de

J. M. Trappe. In: **Proceedings of the 6th North American conference on Mycorrhizae**, Bend: Oregon State University, 1985. p. 25-29.

FRIES, N.; BIRRAUX, D. Spore germination in *Hebeloma* stimulated by living plants roots. **Experientia**, Basel, v. 36, n. 9, p. 1056-1057, 1980.

_____; SWEDJEMARK, G. Specific effects of tree roots on spore germination in the ectomycorrhizal fungus, *Hebeloma mesophaeum* (Agaricales). In : **Mycorrhizae: physiology and genetics, 1st European Symposium on Mycorrhiza**, Dijon: INRA, 1986. p. 725-730.

GALLOTTI, G.J.M. Importância da micorrização em viveiros de *Pinus* spp. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 15, n. 3, p. 60-61, 2002.

GARBAYE, J. Competitivité de champignons ectomycorhiziens: premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorrhization contrôlée du hêtre et du chêne rouvre dans le nord-est de la France. **Revue Forestière Française**, Nancy, v. 36, n. 1, p. 33-43, 1984.

_____. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In: STRULLU, D.G. 8 (Ed). **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**. Paris: Lavoisier, 1990, p. 197-248.

_____. Mycorrhization helper bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, New York, v. 128, n. 2, p. 197-210, 1994.

_____; WILHELM, M.E. Facteurs limitants et aspects dynamiques de la mycorrhization contrôlée de *Fagus silvatica* Lin. par *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. Ex. Saint-Amans) Qué. sur tourbe fertilisée. **Annales des Sciences Forestières**, Paris, v. 42, n. 1, p. 53-68, 1985.

GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L. Ectomycorrhizal fungi in eucalyptus and pinus plantations in Santa Catarina Southern Brazil. **Abstracts of the First International Conference on Mycorrhizas**, Berkeley: University of California Berkeley, 1996. p. 52.

_____. Fungos ectomicorrízicos (ECM) de plantações de *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Pinus taeda* L. em Santa Catarina (SC). **Resumos XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p. 137.

_____ et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* e *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**, New York, v. 92, n. 6, p. 1166-1177, 2000.

_____; SOUZA, L.A.B.; OLIVEIRA, V.L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza**, New York, 2004. (*In press*).

GIBSON, F.; DEACON, J.W. Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of glucose, nitrogen and phosphorus in relation to successions. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 166-172, 1990.

GIOVANETTI, M.G.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GOGALA, N. Growth substances in root exudate of *Pinus sylvestris* - their influence on mycorrhizal fungi. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 28, n. 1-4, p. 151-154, 1989.

GUZMÁN, G. Monografía del genero *Scleroderma* Pers. Emend. Fr. (*Fungi-Basidiomycetes*). **Darwiniana**, San Isidro, v. 16, n. 1/2, p. 233-407, 1970.

HIBBETT, D.S.; GILBERT, L-B.; DONOGHUE, M.J. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. **Nature**, London, v. 407, n. 6803, p. 506-598, 2000.

HILBERT, J-L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during early stage of eucalypt mycorrhiza development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 3, p. 977-984, 1991.

HUNG, L.-L.; CHIEN, C.-Y. Physiological studies on two ectomycorrhizal fungi, *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus*. **Transactions of the mycological Society of Japan**, Tokyo, v. 19, n. 2, p. 121-127, 1978.

_____; MOLINA, R. Temperature and time in storage influence the efficacy of selected isolates of fungi in commercially produced ectomycorrhizal inoculum. **Forest Science**, Bethesda, v. 32, n. 2, p. 534-545, 1986.

_____; TRAPPE, J.M. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi response to pH *in vitro*. **Mycologia**, v. 75, n. 2, p. 234-241, 1983.

HUSTED, L.; LAVENDER, D.P. Effect of soil temperature upon the root growth and mycorrhizal formation of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] seedlings grown in

controlled environments. **Annales des Sciences Forestières**, Paris, v. 46 supl., p. 750s-753s, 1989.

INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA. Desempenho do Setor Florestal. In: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2002-2003**. Florianópolis: Instituto CEPA/SC, 2003. p. 164-184.

_____. Desempenho do Setor Florestal. In: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2003-2004**. Florianópolis: Instituto CEPA/SC, 2004. (*In press*).

JACOBS, P.F.; PETERSON, R.L.; MASSICOTE, H. B. Altered fungal morphogenesis during early stages of ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus pilularis*. **Scanning Microscopy**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 249-255, 1989.

JEFFRIES, P. *Scleroderma*. In: CAIRNEY, J.W.G.; CHAMBERS, S.M.(Eds). **Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 187-200.

KARABAGHLI-DEGRON, C. et. al. The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**, New York, v. 140, n. 4, p. 723-733, 1998.

KREUZ, C.L. A cultura do pinus. In: _____. **Análise da competitividade de atividades agrícolas na região de Caçador, Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 2003. p. 25-40.

KROPÁČEK, K.; CUDLÍN, P.; MEJSTRÍK, V. The use of granulated ectomycorrhizal inoculum for reforestation of deteriorated regions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 28, n. 1-4, p. 263-269, 1990.

KUEK, C.; TOMMERUP, I. C.; MALAJCZUCK, N. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalyptus for plantations. **Mycological Research**, New York, v. 96, n. 4, p. 73-77, 1992.

LANDEWEERT, R. et al. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. **Trends Ecology and Evolution**, Oxford, v. 16, n.5, p. 248-254, 2001.

LAPEYRIE, F.F.; BRUCHET, G. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. **New Phytologist**, New York, v. 100, n. 4, p. 585-593, 1985.

LAST, F.T.; DIGHTON, J.; MASON, P.A. Successions of sheathing mycorrhizal fungi. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 157-161, 1987.

_____ et al. Succession of fruitbodies of sheathing mycorrhizal fungi associated with *Betula pendula*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1984.

LE TACON, F. et al. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 9, p.1664-1668, 1985.

_____ et al. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. **Annales des Sciences Forestières**, Paris, v. 40, n. 2, p. 165-176, 1983.

MARTIN, F.; BOTTON, B. Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. In: **Advances in plant pathology**. London: Academic press, v. 9, 1993. p. 83-102.

_____ et al. Developmental cross talking in ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. **New Phytologist**, New York, v. 151, n. 1, p. 145-154, 2001.

_____ et al. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. **New Phytologist**, New York, v. 153, n. 2, p. 345-357, 2002.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. In: ROBSON, A.D.; ABBOT, L.K.; MALAJCZUK, N. (Eds.). **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994, p. 89-102.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 2, p. 153-163, 1969.

_____. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: MIKOLA, P. (Ed.) **Tropical Mycorrhiza Research**. Oxford: Pub. Clarendon Press, 1980, p. 13-71.

_____. Soil pH and nitrogen influence *Pisolithus* ectomycorrhizal development and growth of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 36, n. 2, p. 224-245, 1990.

_____; BRYAN, W.C. Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 48, n. 3, p. 639-643, 1970.

_____. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. **Forest Science**, Bethesda, v. 22, n. 3, p.245-254, 1975.

_____; CORDELL, C.E. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: WHIPPS, J.M.; LUMSDEN, R.D. (Eds.) **Symposium of the British Mycological Society the University of Sussex**. Cambridge, 1989, p. 1-25.

_____; DAVEY, C.B. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. IV. Resistance of naturally occurring mycorrhizae to infections by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 5, p. 559-565, 1969.

_____. et al. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 28, n. 2, p. 373-400, 1982.

_____ et al. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries I. Efficacy of various vegetative inoculum formulations. **New Forests**, Dordrecht, v. 3, p. 45-56, 1989.

_____; KENNEY, S. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: SCHENCK, N.C. (Ed.). **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982. p. 131-147.

_____; MAUL, S.B.; CORDELL, C.E. Application of specific ectomycorrhizal fungi in word forestry. In: LEATHAM, G.F. (Ed.). **Frontiers in Industrial Mycology**. New York: Chapman & Hall, p. 78-98, 1992.

_____; RUEHLE, J.L.; CORDELL, C.E. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: NORRIS, J.R.; READ, D.J.; VARNA, A.K. (Eds.) **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, v. 23, p. 471-411, 1991.

MASON, P.A. et al. Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 4, n.1, p. 19-39, 1982.

MAUPÉRIN, C. et al. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 11, p. 2326-2329, 1987.

MEHARG, A. A.; CAIRNEY, J.W.G. Ectomycorrhizas – extending the capabilities of rhizosphere remediation? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11-12, p. 1475-1484, 2000.

MOLINA, R. et al. *Rhizopogon*. In: CAIRNEY, J.W.G.; CHAMBERS, S.M. (Eds). **Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 129-161.

_____; PALMER, J.G. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: SCHENCK, N.C. (Ed.). **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982. p. 115-129.

MÜNZENBERGER, B. et al. Detoxification of ferulic acid by ectomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, n. 2, p.117-121, 2003.

NARLOCH, C. **Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos - fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L.** 2002. 153 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NEHLS, U. et al. The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. **Planta**, New York, v. 207, n. 2, p. 296-302, 1998.

NIEMI, K. et al. Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyls cuttings *in vitro*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 22, n. 17, p. 1231-1239, 2002.

NOVAIS, F.N.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV, DPS, 1999. 399 p.

OLIVEIRA, V.L.; GARBAYE, J. Les microorganismes auxiliaires de l'établissement des symbioses mycorrhiziennes. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v. 19, n. 1, p. 54-64, 1989.

_____; GIACHINI, A.J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: _____ SIQUEIRA et al. (Eds.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 775-796.

O'NEILL, J.J.M.; MITCHELL, D.T. Effects of benomyl and captan on growth and mycorrhizal colonization of Sitka-spruce (*Picea sitchensis*) and ash (*Fraxinus excelsior*) on Irish nursery soil. **Forest Pathology**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 165-174, 2000.

PARKE, J.L.; LINDERMAN, R.G.; BLACK, C.H. The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings. **New Phytologist**, New York, v. 95, n. 1, p. 83-95, 1983.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press Limited. 1989. 213 p.

PIROZYNSKI, K.A. Interactions between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, n. 10, p. 1824-1827, 1981.

_____; MALLOCH, W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **BioSystems**, Clare, v. 6, n. 3, p.153-164. 1975.

REID, C.P.P.; HACSKAYLO, E. Evaluation of plant response to inoculation: Environmental variables. In: SCHENCK, N.C. (Ed.) **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. St. Paul : The American Phytopathological Society, 1982. p. 175-187.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, Washington, v. 289, n. 5486, p. 1920-1921, 2000.

REISSMANN, C.B.; WISNIEWSKI, C. Aspectos nutricionais de plantios de *Pinus*. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Eds.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 135-165.

RINCON, A. et al. Comparative effects of auxin transport inhibitors on rhizogenesis and mycorrhizal establishment of spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*. **Tree Physiology**, Victoria, v.11, n. 11, p. 785-791, 2003.

ROSSI, M. J. **Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator airlift**. 2001. 93 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROSSI, M.J., SOUZA, J.A.R., OLIVEIRA, V. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2-3, p.175-181, 2002.

SALZER, P. et al. Differential effect of purified spruce chitinases and β -1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Maryland, v.114, n. 3, p. 957-968, 1997.

ŠAŠEK, V. Submerged cultivation of ectomycorrhizal fungi. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 28, n. 1-4, p. 441-447, 1990.

SCAGEL, C.F.; LINDERMAN, R.G. Influence of ectomycorrhizal fungal inoculation on growth and root IAA concentration of transplanted conifers. **Tree Physiology**, Victoria, v. 18, n. 11, p. 739-747, 1998.

SENIOR, E. et al. Ectomycorrhizae and landfill site reclamations: fungal selection criteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.16, n. 3, p. 142-146, 1993.

SIMS, K.P.; WATLING, R.; JEFFRIES, P. A revised key to the genus *Scleroderma*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 56, p. 403-420, 1995.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. London: Academic Press, 1997, 605 p.

SOARES, I et al. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 14, p. 327-332, 1990.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Área plantada com pinus e eucaliptos no Brasil**. (On line). Disponível em: http://www.sbs.org.br/area_plantada.htm. Acesso em março de 2004.

SOUZA, L.A.B. de. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2003. 100 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

_____; SILVA FILHO, G.N., OLIVEIRA, V.L. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção de crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 349-355, 2004.

STURION, J.A.; ANTUNES, J.B.M. Produção de mudas de espécies florestais. In: GALVÃO, A.P.M. (Org.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de tecnologia, 2000. p. 130.

TAM, P.C.F.; GRIFFITHS, D.A. Mycorrhizal associations in Hong Kong Fagaceae I. Techniques for rapid detection and observation of ectomycorrhizas in local genera. **Mycorrhiza**, New York, v. 2, p. 111-115, 1993a.

_____. Mycorrhizal associations in Hong Kong Fagaceae IV. The mobilization of organic and poorly soluble phosphates by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza**, New York, v. 2, p. 133-139, 1993b.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p.

THEODOROU, C.; BOWEN, G.D. Influence of temperature on the mycorrhizal associations of *Pinus radiata* D. Don. **Australian Journal of Botany**. Victoria, v. 19, n. 1, p. 13-20, 1971.

THOMSON, B.D.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. 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**, New York, v. 126, n. 3, p. 517-524, 1994.

TIBBETT, M.; SANDERS, F.E. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, n. 6, p. 783-789, 2002.

TRAPPE, J.M.; MOLINA, R., CASTELLANO, M. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 331-359, 1984.

TSANTRIZOS, Y.S. et al. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 4, p. 1113-1118, 1991.

TURNAU, K.; KOTTKE, I.; DEXHEIMER, J. Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus*/*Pinus sylvestris* mycorrhizas collected from calamine dumps. **Mycological Research**, New York, v. 100, n. 1, p. 16-22, 1996.

VALVERDE, S.R. et al. Efeitos multiplicadores da economia florestal brasileira. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 285-293, 2003.

VOZZO, J.A.; HACSKAYLO, E. Inoculation of *Pinus caribea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. **Forest Science**, Bethesda, v.17, n.2, p. 239-241, 1971.

WALLANDER, H. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonized by different ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, n. 1-2, p. 249-256, 2000.

_____ ; WICKMAN, T.; JACKS, G. Apatite as P source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 196, n. 1, p. 123-131, 1997.

WALKER, R.F. Growth and nutritional responses of containerized sugar and Jeffrey pine seedlings to controlled release fertilization and induced mycorrhization. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 149, n. 1-3, p. 103-179, 2001.

WATLING, R. et al. A rainforest *Pisolithus*; its taxonomy and ecology. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 61, n. 3/4, p. 417-429, 1995.

WEISS, M. et al. Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 1, p. 15-27, 1997.

WILCOX, H.E. Mycorrhizal Associations. In: NAKAS, J.P.; HAGEDORN, C. (Eds). **Biotechnology of Plant-Microbe Interactions**. New York, McGraw-Hill, 1990. p. 227-255.

WONG, K.K.Y., FORTIN, J. A. Root colonization and intraspecific mycobiont variation in ectomycorrhiza. **Symbiosis**, Balaban, v. 8, n. 3, p. 197-231, 1990.

YANG, Z.L. et al. *Amanita*. In: CAIRNEY, J.W.G.; CHAMBERS, S.M. (Eds.). **Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 201-230.

ANEXOS**Anexo A. Composição do meio de cultura Melin-Norkans Modificado (MNM)**

Ingredientes	Quantidade
CaCl ₂	50,0 mg
NaCl	25,0 mg
KH ₂ PO ₄	50,0 mg
(NH ₄) ₂ HPO ₄	25,0 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	15,0 mg
FeCl ₃	1,2 mg
Tiamina - HCl	100,0 µg
Extrato de malte	3,0 g
Glicose	10,0 g
Ágar-ágar	15,0 g
Água destilada (q.s.p.)	1000,0 mL

(pH=5,8)

