

EFEITO DA INOCULAÇÃO COM FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Eucalyptus grandis* W. Hill ex MAIDEN EM SOLO ARENOSO

EFFECT OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI INOCULATION IN SEEDLINGS OF *Eucalyptus grandis* W. HILL ex MAIDEN, IN SANDY SOIL

Rodrigo Ferreira da Silva¹ Zaida Inês Antonioli² Robson Andrezza³

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes inóculos e mistura de inóculos de fungos ectomicorrízicos sobre a produção de mudas de eucalipto em solo arenoso. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação. Os tratamentos foram quatro isolados e quatro mistura de inóculo de fungos ectomicorrízicos. Utilizou-se solo sob processo de arenização, coletado no município de São Francisco de Assis – RS. Avaliou-se a massa da parte aérea e radicular verde, massa da parte aérea seca, altura de planta, diâmetro do colo, comprimento e área superficial específica radicular, colonização micorrízica e teores de nitrogênio, fósforo e potássio. Os resultados mostraram que o isolado F2-RS (*Pisolithus* sp.) proporcionou os maiores incrementos no desenvolvimento das mudas de eucalipto. A mistura de inóculos de fungos pode ser utilizada desde que se tenha um prévio conhecimento do efeito isolado do fungo.

Palavras-chave: fungos ectomicorrízicos, eucalipto, solo arenoso.

ABSTRACT

The purpose of this paper was to analyze the effect of different ectomycorrhizal fungi isolates and mixture of inoculum in the eucalyptus seedling production, in sandy soil. The treatments were four isolates of fungi and four inoculum mixture of ectomycorrhizal fungi. It was used soil with sandy process, collected at São Francisco de Assis, RS. It was determined the fresh matter of the shoot and the root system, above-ground dry matter, root length and specific surface area, mycorrhizal colonization, nitrogen, phosphorus and potassium level. The results showed that the F2-RS (*Pisolithus* sp.) isolated increased the eucalypt seedling development. The mixture of fungi inoculum could be used once there is a knowledge of the isolated effect to each fungi.

Key words: ectomycorrhizal fungi, eucalypt, sandy soil.

INTRODUÇÃO

As ectomicorrizas são fungos pertencentes à subdivisão Basidiomycotina cuja estrutura fúngica se desenvolve na raiz e nos espaços intercelulares do córtex, sem que ocorra penetração celular (Peterson e Bonfante, 1994). Esses fungos ocorrem em um grupo restrito de plantas (aproximadamente 5%), no entanto, tal associação é importante economicamente, sobretudo para o setor florestal. As ectomicorrizas podem melhorar a eficiência na absorção de alguns nutrientes. Concentrações mais elevadas de Cu, Mn, Mg, Ca, Fe e Zn foram encontrados nos rizoma e frutificações dos fungos do que nos órgãos das plantas sem micorrizas (Smith e Read 1977; Bellei e Carvalho 1992). Assim, alguns países vêm desenvolvendo, com êxito, programas de micorrização controlada, propiciando aumentos significativos na produção de biomassa florestal, como ocorre por exemplo em eucalipto, além de contribuir para que as plantas desenvolvam-se em locais onde, isoladamente, não teriam produção viável do ponto de vista econômico.

Uma das essências florestais mais plantadas no Brasil é o eucalipto em razão de seu rápido crescimento e elevado rendimento econômico. Com o aumento das áreas reflorestadas anualmente, a produção de mudas de essências florestais tem aumentado, não somente visando à quantidade, mas também à qualidade das mudas. É a qualidade da muda que poderá garantir o sucesso do plantio, assim como um

1. Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). rofesil@bol.com.br
2. Bióloga, Dr^a., Professora do Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS).
3. Técnico Agrícola, Acadêmico do Curso de Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). Bolsista de iniciação científica. robsonandrezza@bol.com.br

Recebido para publicação em 19/06/2002 e aceito em 29/11/2002.

menor índice de mortalidade e posterior replantio. Desse modo, os fungos ectomicorrízicos podem ser um auxílio na obtenção de mudas de melhor qualidade, adaptadas às mais adversas condições de solo.

O eucalipto pode associar-se tanto a fungos ectomicorrízicos quanto a fungos micorrízicos arbusculares (fMA) (Coelho *et al.* 1997). Geralmente, constata-se que a idade da planta tem influência sobre o tipo de associação micorrízica predominante, pois, inicialmente, há uma alta colonização por fungos fMA que decresce com a idade da planta, sendo substituída progressivamente por associações ectomicorrízicas (Bellei 1987; Santos *et al.* 2001).

A inoculação com fungos ectomicorrízicos pode atuar diretamente sobre o crescimento pós-transplante de espécies florestais. No açoita cavalo (*Luehea divaricata* Mart.), verificou-se maior altura de planta, quando inoculadas com fungos micorrízicos. Esse comportamento foi observado também para sesbânia (*Sesbania* sp.) e tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.) que mostraram diferença no crescimento já aos trinta dias após transplante das mudas para área definitiva (Rojas e Siqueira, 2000). Esses mesmos autores verificaram que a inoculação no transplante pode ser uma alternativa para garantir o desenvolvimento de mudas não-inoculadas ou com baixa formação micorrízica no viveiro. Assim, a associação micorrízica pode favorecer o estabelecimento e desenvolvimento de mudas de essências florestais, o que poderá proporcionar uma maior produção.

A taxa de sobrevivência de mudas de espécies arbóreas pode ser altamente influenciada pela associação micorrízica. Em um estudo sobre o comportamento de quatro espécies de leguminosas inoculadas com micorriza, observou-se que plantas inoculadas apresentaram maior percentagem de colonização e maior taxa de sobrevivência em relação às plantas não-inoculadas (Caldeira, 1997/1999).

Assim, o estabelecimento de essências florestais micorrizadas pode ser uma alternativa viável para o aproveitamento de áreas degradadas, ou áreas que estão sujeitas a processos erosivos. A inoculação de mudas de essências florestais, ainda no viveiro, pode ser uma alternativa, para que o fungo possa ser levado a campo, com grande probabilidade de contribuir, para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas.

O objetivo deste trabalho foi testar isolados de fungos ectomicorrízicos para produção de mudas de eucalipto em solo arenoso, e avaliar o efeito da inoculação com diferentes isolados e mistura de fungos ectomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de eucalipto em solo arenoso.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria – RS, no período de Janeiro a Maio de 2001. O solo utilizado foi um NEOSSOLO QUARTZARÊNICO típico (Streck *et al.* 1999), com textura arenosa e baixa disponibilidade de fósforo (Tabela 1), ocorrente no município de São Francisco de Assis, na Depressão Central do Rio Grande do Sul. O solo foi coletado sob campo nativo, na profundidade de 0 – 20 cm.

TABELA 1: Características gerais do solo utilizado no experimento em casa de vegetação.

TABLE 1: General characteristics of the soil used in the green house experiment.

pH - água	Ca + Mg	Al	H + Al	P	K	MO	Argila
1:1	Cmol _c /L			mg/L		%	
5,0	0,7	0,3	2,3	8,0	36,0	0,8	14

O solo foi seco ao ar, peneirado em malha de 4 mm e adicionada mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio (relação molar 3/1) em quantidade equivalente a 1 tonelada de calcário por hectare, cuja finalidade foi elevar o pH acima de 5,5 e proporcionar adubação com cálcio e magnésio. O solo foi incubado por trinta dias com umidade de aproximadamente 70% da capacidade de campo, para que o carbonato de cálcio e o carbonato de magnésio pudessem reagir no solo. Após este período, o solo foi novamente seco ao ar, destorroado e peneirado. Posteriormente, o solo foi fumigado em lona plástica com Brometo de Metila, na dose de 60 ml de fumigante para 100 kg de solo. O material ficou hermeticamente fechado durante 72 horas e após quatro dias o solo foi armazenado em sacos plásticos e disponibilizado para uso no experimento.

A adubação de correção para N e K foi conforme recomendação da ROLAS (1995) (Rede Oficial de Laboratórios de Solos do RS e SC), sendo aplicado o equivalente a 50 kg/ha de N e 40 kg/ha de K para a cultura do eucalipto. O nitrogênio foi aplicado na forma de uréia e o potássio na forma de KCl.

Obtenção, multiplicação e inoculação de fungos ectomicorrízicos

Os fungos ectomicorrízicos utilizados neste experimento foram provenientes de três isolados nativos (FSE-RS, F2-RS e F1-RS), da região central do estado do Rio Grande do Sul, uma espécie oriunda do estado de Minas Gerais (Universidade de Viçosa), *Pisolithus* sp., denominada de Pt Silv.1.

O fungo FSE – RS e F2-RS foram coletados no município de São Francisco de Assis e o F1 – RS no município de Santa Maria, sendo todos, provavelmente, do gênero *Pisolithus*. Foram processados em laboratório utilizando-se de técnicas assépticas para o isolamento e multiplicação das ectomicorrizas, conforme Brundrett *et al.* (1996). Para o isolamento desse fungo, realizou-se uma desinfecção com álcool na superfície externa da frutificação do fungo, partindo daí abriu-se essa frutificação ao meio e retirou-se da parte interna pequenos pedaços do fungo. Esses pedaços da frutificação foram colocados em placa de Petry contendo o meio de cultivo MNM (Merlin Norkrans Modificado) Marx (1969). Após o crescimento micelial do fungo, repicou-se pequenas porções desse micélio para outra placa de Petry contendo meio de cultivo. Esse processo foi repetido várias vezes, com a finalidade de isolar o fungo micorrízico de contaminantes. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado.

Para o melhor crescimento e desenvolvimento os fungos foram multiplicados em meio MNM (Marx 1969). O meio foi preparado, esterilizado e colocado em torno de 20 ml de meio por placa de Petry. Em seguida retirou-se, das culturas estoques de fungos, discos de 10 mm de diâmetro contendo fungo e meio de cultivo, e repicou-se para as placas de Petry, contendo o meio MNM. Após, incubou-se a 28°C durante 20 dias, até obter um crescimento satisfatório dos fungos. A inoculação foi efetuada retirando-se discos de 10 mm de diâmetro das bordas do micélio dos fungos micorrízicos crescidos e transferindo-os para os vasos de cultivo no momento do transplante das mudas (Brundrett *et al.* 1996).

Essência florestal e isolados de fungos ectomicorrízicos

A essência florestal usada foi o *Eucalyptus grandis* cujas sementes foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO, Santa Maria, RS. As mudas foram inicialmente produzidas em substrato de areia esterilizada e ao apresentarem duas folhas definitivas, foi transplantada uma muda para cada vaso de cultivo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com nove tratamentos, sendo cinco tratamentos de inoculação de diferente isolados de fungos ectomicorrízicos e quatro tratamentos composto de mistura de fungos ectomicorrízicos (Tabela 2), três repetições.

TABELA 2: Combinação dos tratamentos aplicados com fungos ectomicorrízicos sobre o cultivo de mudas de eucalipto, em solo arenoso, em casa de vegetação.

TABLE 2: Combination of the treatments applied with ectomycorrhizal fungi on the culture of eucalypt seedling, in sand soil and green house.

Fungos	Mistura de Fungos
T1) Testemunha sem fungo	T6) 50%: FSE-RS + 50%F2-RS
T2)F2-RS	T7) 50%: FSE-RS + 50%F1-RS
T3)FSE-RS	T8) 50%: FSE-RS + 50%Pt silv.1
T4)F1-RS	T9) 25%: FSE-RS + 25%F2-RS + 25% F1-RS + 25%Pt silv.1
T5) Pt silv. 1	-

Em que: F2-RS (*Pisolithus* sp.); FSE-RS (*Pisolithus* sp.); F1-RS (*Pisolithus* sp.); Pt silv.1 (*Pisolithus* sp.).

Como unidade experimental foram utilizado vasos brancos de plástico com capacidade de 1 kg de solo.Esses vasos foram previamente lavados com hipoclorito de sódio 12%, para evitar possíveis contaminações. O solo utilizado em cada unidade experimental foi acondicionado em saco plástico de 1 kg para evitar a perda de umidade e nutrientes.

Condução do experimento

O experimento teve duração de cinco meses. Durante o experimento, foram realizadas irrigações diárias, por pesagem de cada vaso. Adicionaram-se 150 ml de água destilada, correspondente a 15% do peso do solo seco, o que corresponde aproximadamente a 80% da capacidade de campo. A irrigação por pesagem foi realizada pesando todos os vasos e completando a diferença do peso com água até 1,2 kg.

O rodízio dos vasos foi realizado semanalmente, atendendo as exigências do delineamento, com o objetivo de eliminar possíveis diferenças quanto à incidência de luz solar, temperatura e sombreamento. Com a finalidade de amenizar os efeitos das altas temperaturas, colocou-se, a uma altura de 1m dos vasos, sombrite com 30% de sombreamento. No período mais quente do dia, eram ligados os aspersores da casa de vegetação, diminuindo assim a temperatura no interior da casa.

Após 20 dias da germinação, aplicou-se solução nutritiva de Long Ashton contendo N, K, Mg, Ca, Fe e micronutrientes (Hewitt 1966), sendo aplicada três vezes por semana durante a condução do experimento. Aplicaram-se também, 60 mg/kg de nitrogênio na forma de uréia divididos em duas aplicações, aos 45 e 90 dias após o transplante da muda.

Parâmetros analisados

Os parâmetros analisados foram: altura da planta, diâmetro do colo, massa da parte aérea verde e radicular, massa da parte aérea seca, comprimento e área superficial específica radicular, colonização micorrízica, teores de nitrogênio, fósforo e potássio. A altura de planta foi medida utilizando-se uma régua graduada de 50 cm de comprimento. Para a medida de diâmetro de colo, foi utilizado um paquímetro digital, marca Mitutoyo.

Os resultados de massa da parte aérea verde, do sistema radicular e massa da parte aérea seca foram obtidos da seguinte forma: as plantas foram cortadas rente ao solo, em seguida pesou-se a parte aérea, caracterizando o peso da massa da parte aérea verde. Após, as plantas foram colocadas em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa a 65°C, onde permaneceram até atingirem o peso constante. Pesou-se novamente, obtendo-se a massa da parte aérea seca. As raízes foram separadas do solo, lavadas com água destilada, secadas em papel toalha e então determinado o peso da massa radicular verde. Para a análise do comprimento radicular, utilizou-se uma amostra de 0,2 g de raízes cortadas em 1cm e distribuiu-se em uma placa quadriculada de 1cm x 1cm, em seguida, contou-se o número de intersecções das raízes com as linhas da placa. O comprimento e área superficial específica do sistema radicular foi estimado seguindo-se o método de Tennant (1975).

As amostras para determinação da porcentagem de raízes colonizadas por fungos ectomicorrízicos foram coletadas por ocasião da colheita do experimento. As raízes poderiam ser avaliadas diretamente para estimar o percentual de associação micorrízica, contudo foi efetuada a coloração das raízes. As raízes das plantas foram separadas do solo, por meio de peneiras e lavadas com água destilada, em seguida, retirou-se uma amostra de 0,1 g de raízes, as quais foram cortadas em 1cm e armazenadas em solução com álcool comercial a 50%. No laboratório, essas raízes foram submetidas ao processo de clareamento e coloração. O procedimento de clareamento e coloração das raízes constou em deixar uma amostra de 0,1g de raízes imersas em solução de KOH 10%, a 80°C durante 1 hora e 30 minutos. Após, lavou-se com água e, posteriormente, as raízes foram colocadas em HCl 0,1N durante 2 minutos. Lavou-se novamente com água e colocaram as raízes em Trypan Blue (corante) a 80° C por 30 minutos. Posteriormente, lavou-se novamente com água e foram armazenadas em lactoglicerol, conforme Brundrett *et al.* (1996). A avaliação da porcentagem de colonização micorrízica (CM) foi estimada pelo método da placa quadriculada (Giovannetti e Mosse 1980).

O material utilizado para a análise química foi a massa da parte aérea seca. Esta foi moída em moinho tipo facas e passada em peneira de 2 mm e, então, submetida à análise química para determinar as concentrações de N, P e K. Na análise da parte aérea, empregou-se a digestão por via úmida com água oxigenada e ácido sulfúrico, segundo metodologia descrita por Tedesco *et al* (1985). As concentrações de N foram determinadas pelo método de Bremner e Keeney (1965); a de P conforme o método de Murphy e Riley (1962) e a de K por fotometria de chama.

A análise estatística foi efetuada pela análise de variância, comparando-se as médias pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico SOC, desenvolvido pelo Núcleo Tecnológico para Informática NTIA (EMBRAPA 1997). Os dados de porcentagem de colonização micorrízica, eficiência micorrízica e massa da parte aérea seca foram previamente transformados em raiz quadrada mais 0,5 por não seguirem distribuição normal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação com alguns isolados e mistura de isolados favoreceu o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis*. A inoculação com os isolados F2-RS e F1-RS foi a que proporcionou os melhores resultados na altura de planta, diâmetro do caule, massa da parte aérea verde, massa radicular verde, quando em simbiose com as mudas de eucalipto (Tabela 3). O fungo F2-RS foi o que apresentou melhor desempenho entre os isolados testados, pois foi estatisticamente superior à testemunha nos oito parâmetros avaliados (Tabelas 3 e 4), exceto para massa radicular verde, no qual, embora tenha obtido maior média, não diferiu estatisticamente.

TABELA 3: Eficiência da inoculação com isolados de fungos ectomicorrízicos e mistura destes na altura, diâmetro, massa da parte aérea verde (PA) e radicular (Raiz) de mudas de *Eucalyptus grandis*.

TABLE 3: Efficiency of the inoculation with isolate of ectomycorrhizal fungi and mixture of these in the height, diameter, green above-ground mass (PA) and root of *Eucalyptus grandis* seedling.

Tratamento	Altura cm	Diâmetro mm	Massa Verde (g)	
			PA	Raiz
T1) Testemunha	23,00b	3,00c	4,37ed	4,66bcd
T2) F2-RS	39,00 a	3,70 b	11,18 a	7,51 ab
T3) FSE-RS	23,83 b	3,13 c	5,96 ecd	7,78 ab
T4) F1-RS	33,00 a	3,53 bc	7,65 bcd	8,07 a
T5) Pt Silv.1	24,00 b	3,63 bc	6,63 bcd	6,13 ab
T6) FSE-RS+ F2-RS	13,83 c	2,23 d	2,64 e	1,80 d
T7) FSE-RS+ F1-RS	32,83 a	3,20 c	7,86 abc	2,41 cd
T8) FSE-RS+ Pt Silv.1	37,66 a	4,73 a	9,35 ab	6,26 ab
FSE-RS + F2-RS + Pt Silv.1 + F1-RS	38,33 a	4,16 ab	9,89 ab	5,54abc
CV %	9,24	7,54	16,10	21,23

Em que: F2-RS (*Pisolithus sp.*); FSE-RS (*Pisolithus sp.*); F1-RS (*Pisolithus sp.*); Pt silv.1 (*Pisolithus sp.*). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao comprimento radicular (Tabela 4), não se observou diferença estatística em relação à testemunha. Comprimento radiculares maiores podem ser um importante fator para o estabelecimento de espécies florestais em solos degradados, como os encontrados na região sudoeste do Rio Grande do Sul. Contudo, esse crescimento poderá ser observado em um estágio posterior de desenvolvimento da muda ou mesmo a campo. Assim, as raízes micorrizadas das plantas poderiam explorar regiões de solo não-explorado, isso permitiria que a planta absorvesse nutrientes e água em região não-explorada por suas raízes, além disso, permitiria a absorção de maiores quantidades de nutrientes considerados de baixa mobilidade no solo (Sanders *et al.* 1977).

Na inoculação com mistura de isolados de fungos ectomicorrízicos (Tabelas 3 e 4), observa-se que o tratamento T6, composto pela mistura dos fungos FSE-RS + F2-RS, apresentou médias estatisticamente iguais ou até mesmo inferior à testemunha. Esse comportamento pode ser pelo fato que a associação simbiótica atuou negativamente, podendo ser os fungos, um dreno de carboidratos produzidos pela planta (Harley 1978; Siqueira 1988). Nesse sentido, embora a mistura de fungos possa ser uma prática aceitável, é necessário o conhecimento prévio do comportamento da combinação de fungo a ser efetuada para um maior retorno dessa associação.

A área superficial específica radicular foi favorecida pela associação micorrízica (Tabela 4). O incremento na área superficial de absorção traduz-se em um incremento na área de solo explorado pelas raízes, de tal forma que plantas com maior área de absorção podem apresentar um estado nutricional melhor em relação às plantas que apresentam menor área de absorção, podendo ser um fator condicionante para taxa

de sobrevivência das espécies. De uma forma geral, estima-se que a superfície da área explorada por ectomicorrizas é mil vezes superior àquela de raízes sem a presença do fungo micorrízico (Harley 1969), isso implicaria em aumento do vigor da planta e maior tolerância a diversos estresses ambientais, como temperaturas elevadas (Schenck e Schroeder 1974), deficiência hídrica (Mosse *et al.* 1981), variações elevadas de pH (Safir e Duniway 1982) e proteção contra agentes patogênicos (Marx 1970). Dessa forma, a maior área superficial específica é um fator importante que poderia contribuir ao estabelecimento de espécies florestais em solos degradados.

Houve uma variação significativa na percentagem de colonização micorrízica entre os tratamentos (Tabela 4). Os tratamentos T2, T3, T4 e T7 tiveram uma percentagem de associação com fungos ectomicorrízicos de 40; 52; 52 e 52 respectivamente bem acima da observada para os demais tratamentos. Esses resultados estão na média dos obtidos em trabalhos com eucalipto em casa de vegetação (Fernandes 1995). E as percentagens de associação ectomicorrízica encontradas são superior às obtidas nos trabalhos de caracterização de micorrizas em plantios comerciais de eucalipto (Coelho *et al.* 1997).

O uso da mistura de espécies de fungos ectomicorrízicos não favoreceu a colonização micorrízica, exceto para o tratamento T7, composto pelos fungos FSE – RS e F1 – RS e que também apresentaram maior média de colonização micorrízica quando inoculados isoladamente nas mudas de eucalipto. Assim, a colonização pelo fungo ectomicorrízico, na fase de viveiro, não estaria obrigatoriamente associada a um grande efeito da simbiose no crescimento da planta para obtenção de uma adequada resposta em nível de campo (Marx *et al.* 1985). Pois, outros fatores como pH, temperatura e umidade do solo, podem influenciar na resposta das mudas à inoculação, quando levadas a campo (Slankis 1974).

TABELA 4: Valores de massa da parte aérea seca (MS-PA), comprimento radicular (CR), área superficial específica radicular (ASE) e colonização micorrízica (CM) de mudas de eucalipto inoculadas com diferentes isolados e mistura de fungos ectomicorrízicos.

TABLE 4: Values of dry mass of above-ground part (MS-PA), root length (CR), specific surface area of root (ASE) and micorrhizal settling (CM) of eucalypt seedling inoculated with different isolate and mixture of ectomycorrhizal fungi.

Tratamento	MS	CR	ASE	CM
	PA	Raiz		
	g	cm	cm ²	%
T1) Testemunha	1,49 ef	5512,85 ab	323,57 cd	0,00 e
T2) F2-RS	4,32 a	7000,40 a	812,37 a	40,04 abc
T3) FSE-RS	1,87 de	7802,56 a	871,90 a	52,51 a
T4) F1-RS	2,91 bc	7614,32 a	877,47 a	51,94 ab
T5) Pt SILV.1	2,54 cd	5543,07ab	653,58 abc	36,33 bcd
T6) FSE-RS+ F2-RS	0,77 f	1707,98c	196,45 d	22,33 d
T7) FSE-RS+ F1-RS	2,53 cd	2558,96bc	355,46 bcd	51,80 ab
T8) FSE-RS+ Pt Silv.1	3,51 ab	6828,42 a	731,93 ab	31,75 cd
T9) FSE-RS + F2-RS + Pt Silv.1 + F1-RS	3,24 bc	6049,29 a	648,53 abc	28,20 cd
CV %	12,30	21,22	22,85	15,70

Em que: F2-RS (*Pisolithus sp.*); FSE-RS (*Pisolithus sp.*); F1-RS (*Pisolithus sp.*); Pt silv.1 (*Pisolithus sp.*). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise química, a presença dos fungos ectomicorrízicos foi benéfica para o aumento da concentração de nitrogênio na massa da parte aérea seca. Os fungos F2-RS, F1-RS, Pt Silv.1 e as misturas compostas pelos tratamentos T7, T8 e T9 apresentaram maior média dos níveis de nitrogênio na massa seca da parte aérea e foram significativamente superiores à testemunha (Tabela 5). O fungo F2-RS, (T2) apresentou maior nível de nitrogênio em relação aos outros tratamentos. A testemunha (T1) apresentou menor nível desse nutriente no tecido, assim como o tratamento T6, composto pela mistura dos fungos FSE – RS + F2-RS (Tabela 5). Essa absorção de nitrogênio nas mudas submetidas à inoculação com os fungos ectomicorrízicos proporcionou um efeito benéfico para as plantas, pois as mudas de eucalipto apresentaram maior massa da parte aérea seca, correlacionando-se positivamente com a absorção de nitrogênio. De uma

maneira geral, as ectomicorrizas favorecem a mineralização e a absorção de nitrogênio (Siqueira 1988). Então, a inoculação com esses fungos pode ser uma alternativa para o estabelecimento de eucalipto em solos com baixo nível desse nutriente.

Os maiores teores de fósforo no tecido foram obtidos nos tratamentos: T2, T4, T5, T7, T8, T9 e os menores níveis nos tratamentos testemunha e T6 (mistura de fungo FSE – RS + F2-RS) (Tabela 5). Observou-se que tanto na mistura de isolados de inóculos de fungos, como quando inoculado um isolado separadamente, a presença de fungos ectomicorrízicos foi positiva para a absorção de fósforo. Várias pesquisas têm demonstrado que as ectomicorrizas melhoram a eficiência na absorção de fósforo, o que em parte, pode explicar o estímulo no crescimento das plantas com ectomicorrizas, sobretudo quando são desenvolvidas em solo nutricionalmente pobres (Bowen 1973; Harley *et al.* 1983; Melin 1953; Dommergues *et al.* 1970 Reid *et al.* 1983). Desse modo, as ectomicorrizas podem favorecer a absorção de nutrientes de pouca mobilidade, quando se utiliza eucalipto em solo arenoso.

TABELA 5: Nível de nitrogênio, fósforo e potássio nas mudas de eucalipto inoculados com isolados e mistura de fungos ectomicorrízicos.

TABLE 5: Level of nitrogen, phosphor and potassium in inoculated seedlings of eucalypt with isolate and mixture of ectomycorrhizal fungi.

Tratamento	Nitrogênio	Fósforo	Potássio
	mg/planta		
T1) Testemunha	13,69 c	0,70 c	22,74 de
T2) F2-RS	42,16 a	2,58 ab	52,14 a
T3) FSE-RS	23,78 b	1,56 bc	23,66 cde
T4) F1-RS	33,1 ab	2,94 a	31,70 bcd
T5) Pt Silv.1	30,1 ab	2,25 ab	26,10 cd
T6) FSE-RS+ F2-RS	10,1 c	0,66 c	10,56 e
T7) FSE-RS+ F1-RS	33,73 ab	3,06 a	33,73 bcd
T8) FSE-RS+ Pt SILV.1	34,50 ab	3,23 a	40,62 ab
T9) FSE-RS + F2-RS + Pt Silv.1 + F1-RS	23,34 ab	3,44 a	37,16 bc
CV %	18,02	20,18	15,60

Em que: F2-RS (*Pisolithus* sp.); FSE-RS (*Pisolithus* sp.); F1-RS (*Pisolithus* sp.); Pt silv.1 (*Pisolithus* sp.). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O fungo FSE- RS e a mistura de fungos FSE- RS + F2-RS apresentaram efeito negativo na absorção de nitrogênio, fósforo e potássio quando inoculado isoladamente (Tabela 5). O menor acúmulo desses nutrientes na massa seca da parte aérea, pelo fungo FSE – RS, mesmo com uma percentagem de ectomicorrizas alta (52%), indica menor eficiência desse isolado quando comparado aos demais tratamentos. Contudo, esse fato, comum em mudas de pinus (Marx *et al.* 1985), poderia não implicar em uma resposta negativa das mudas à inoculação após o transplante para o campo, mas uma adaptação do fungo e da muda ao novo ambiente.

Nos fungos inoculados isoladamente, houve maior concentração de N, nas mudas de eucalipto, quando inocularam-se o fungo F2-RS e a maior concentração de fósforo, na inoculação com fungo F1-RS (Tabela 5). Entretanto, para esses dois nutrientes, parece ter ocorrido um efeito positivo das misturas dos fungos, observada nos tratamentos T7, T8 e T9. Observa-se que a inoculação isolada do fungo FSE – RS não foi benéfica para as mudas de eucalipto e quando se misturou esse fungo com o fungo F2-RS, também não se obteve benefício da inoculação. Entretanto, o efeito benéfico observado no tratamento T9 pode ser em consequência da presença dos fungos Pt Silv.1 e F1-RS e não da mistura utilizada (Tabela 5).

A inoculação com o fungo FSE – RS não favoreceu as mudas de eucalipto. O efeito observado nos tratamentos T7 e T8 pode ser em razão da presença do fungo F1-RS no tratamento T7 e a presença do fungo Pt Silv.1 (T8). Contudo, algumas espécies de organismos podem apresentar um efeito sinérgico sobre outras e, dessa forma, a presença de um organismo pode beneficiar ou não a outra (Cardoso, 1978; Smith e Read, 1997). Assim o efeito observado nos tratamentos com mistura de fungos, pode também ser um efeito sinérgico de um organismo sobre o outro. Desse modo, dependendo da mistura de inóculos de fungos

ectomicorrízicos, pode-se ter um efeito positivo da micorrização ou não. Esse resultado é bastante importante e pode ser uma alternativa, quando se trabalha com fungos menos eficientes na absorção de nitrogênio e fósforo simultaneamente.

CONCLUSÕES

Para eficiência de isolados ou misturas de fungos ectomicorrízicos, deve-se considerar isoladamente e a combinação de espécies ou isolados, para se obter o máximo de benefício da associação micorrízica.

O inóculo F2-RS beneficiou a produção de mudas de eucalipto quando cultivado sob solo arenoso.

A mistura de espécies de fungos ectomicorrízicos pode ser uma alternativa viável com vistas ao maior benefício para planta, no entanto, deve-se dar atenção às espécies que participarão dessa mistura.

Estudos que considerem isolados oriundos de áreas degradadas devem ser considerados para inoculação de mudas de eucalipto, para maior desempenho do fungo e da espécie florestal a ser introduzida nestas regiões.

A eficiência de fungos ectomicorrízicos, evidentemente, não apenas depende das condições de ambiente e propágulos das espécies de fungos, mas também pode ser determinada pelas espécies hospedeiras. Assim, o conhecimento de características genéticas de isolados e sua influência na produção de plantas de eucalipto fazem-se necessários.

AGRADECIMENTOS

A FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), pelo financiamento do trabalho; à FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) de Santa Maria – RS, pelas sementes doadas e auxílio técnico; ao Sr. Nelsí Salbego, pela disponibilização de sua propriedade em São Francisco de Assis – RS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLEI, M.; CARVALHO, M. S. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 297-318.
- BELLEI, M. **Micorrizas de *Eucalyptus* spp. em viveiros e florestas de Santa Catarina**. Florianópolis: UFSC, 1987. 54 p.
- BOWEN, G.D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKY, T.T. **Ectomycorrhizae: Physiological ecology**, 1973. 430p.
- BREMNER, J.M.; KEENEY, D.R. Steam distillation methods for determination of ammonia, nitrate and nitrite. **Anal. Chem. Acta.**, Amsterdam, v. 32, p. 485-495, 1965.
- BRUNDRETT, M., BOUGHER, N. *et al.* **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400p.
- CALDEIRA, M. V.; SILVA, E. M. R.; FRANCO, A. A. *et al.* Crescimento de leguminosas arbóreas em resposta a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 1-10, 1997.
- CALDEIRA, M. V.; SILVA, E. M. R.; FRANCO, A. A. *et al.* Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de duas leguminosas arbóreas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 63-70, 1999.
- CARDOSO, E.J.B.N. Relações ecológicas entre organismos. In: GALLI, F. (coord.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1978. v. 1, p. 26-51.
- COELHO, F.C.; BORGES, A.C.; NEVES, J. C. *et al.* Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamento de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., nos municípios de Paraopeba, Bocaiúva e João Pinheiro, MG. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 21, n. 3, p. 393-404, 1997.
- DOMMARGUES, Y.; MANGENOT, E.F. **Écologie microbienne du sol**. Paris: Masson, 1970.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura. Manual do Usuário Ferramental Estatístico. Ambiente de Software NTIA, versão 4.2.2. Campinas, 1997.
- FERNANDES, M.F. **Crescimento e absorção de fósforo em plantas de *Eucalyptus grandis* associadas a fungos micorrízicos em diferentes doses de fósforo e níveis de água no solo**. 1995. 64p. Dissertação (Mestrado) –

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

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

HARLEY, J.L. **The biology of mycorrhiza**. London: Leonard Hill, 1969. 230p.

HARLEY, J.L. Ectomycorrhizas as nutrient absorbing organs. **Proc. R. Soc.**, London, v. 203, p. 1-21, 1978.

HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1983. 483p.

HEWITT, E. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Faruham Royal: UK. Commonwealth Agricultural Bureaux. 1966. 300p.

MARX, D.H.; HEDIN, A.; TOE IV, S.F.P. Field performance of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* seedlings with specific ectomycorrhizae and fertilizer after three years on a savanna site in Liberia. **For. Ecol. Mang.**, Amsterdam, v. 13, p. 1-25, 1985.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. V. Resistance of mycorrhizae to infections mycelium of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 61, p. 1472-1473, 1970.

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**, Saint. Paul, v.59, p. 153-163, 1969.

MELIN, E. Physiology of mycorrhizal relations in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, Palo Alto, v.4, p.325-346, 1953.

MOSSE, B.; STRIBLEY, D.P.; Le TACON, F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. **Adv. Microbial Ecol.**, v. 5, p. 137-210, 1981.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Anal. Chem. Acta.**, Amsterdam, v. 27, p. 31-36, 1962.

PETERSON, R.L.; BONFANTE, P. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas e ectomycorrhizas. **Plant and Soil**. v. 159, n. 1, p. 79-88, 1994.

REID, C.P.P; KIDD, F.A.; EKWEBELAM, S.A. Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 71, p. 415-432, 1983.

ROJAS, E. P.; SIQUEIRA, J.O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Rev. Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 103-114, 2000.

ROLAS – Comissão de Fertilidade do Solo - RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3. ed. Passo Fundo: SBCS - Núcleo Regional Sul, 1995.

SAFIR, G.R.; DUNIWAY, J.M. Evaluation of plant response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: SCHENCK, N.C. (Ed.). **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1982. p.77-80.

SANDERS, F.E. *et al.* The development of endomycorrhizal roots system. I. Spread of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. **New Phytologist**, Cambridge, v. 78, n. 2, p. 257-268, 1977.

SANTOS, V.L. *et al.* Vesicular-arbuscular and ectomycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. **Plant Physiology**, 2001.

SLANKIS, V. Soil factors influencing formation of mycorrhizas. **Annu Rev. Phytopathol.**, Palo Alto, v. 12, p. 437-510. 1974.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A., **Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: ABEAS, 1988. 330p.

SCHENCK, N.C.; SCHROEDER, V.N. Temperature response of *Endogone* mycorrhiza on soybean roots. **Mycology**, Madison, v. 69, n. 3, p. 600-605, 1974.

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

STRECK, E. V.; KAMPT, N. *et al.* Atualização da classificação taxonomica das unidades de mapeamento do levantamento de reconhecimento dos solos do estado do Rio Grande do Sul. **Informativo da EMATER\RS**. v. 16, n. 5, 1999.

TEDESCO, M.; WOLKWEIS, S.; BISSANI, C. A. *et al.* **Análise de solo, planta e outros materiais**. Porto Alegre:

UFGRS, 1985. 188p.

TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. **J. Ecol.**, v. 63, p. 995-1001, 1975.