

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**Ângela Laís Fernandes Gomes**

**SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM VIVEIRO COMERCIAL DE  
MUDAS DE EUCALIPTO**

**Diamantina**

**2016**

**Ângela Laís Fernandes Gomes**

**SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM VIVEIRO COMERCIAL DE  
MUDAS DE EUCALIPTO**

**2016**

**Ângela Laís Fernandes Gomes**

**SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM VIVEIRO COMERCIAL DE  
MUDAS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti

**Diamantina**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

G633s	<p>Gomes, Ângela Laís Fernandes Seleção de fungos ectomicorrízicos em viveiro comercial de mudas de eucalipto / Ângela Laís Fernandes Gomes. – Diamantina, 2016. 38 p. : il.</p> <p>Orientador: Paulo Henrique Graziotti</p> <p>Dissertação (Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Ectomicorriza. 2. Produção de mudas. 3. Eucalyptus. 4. Pisolithus. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD 634.9</b></p>
-------	---

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Ângela Laís Fernandes Gomes**

**SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM VIVEIRO COMERCIAL DE  
MUDAS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti

Aprovada em 29/03/2016

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel – EMBRAPA/MG

Prof. Dr. José Sebastião Cunha Fernandes – UFVJM

Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti – UFVJM

Diamantina

*Ofereço*

*A Deus*

*Aos meus amados pais, Marcos e Angela  
Às minhas irmãs Anne, Rafaela e Annalyce  
E ao meu querido Emílio*

*DEDICO*

*À todos aqueles que ainda acreditam que a  
ciência, quando aliada à dedicação e ao  
esforço, pode mudar o mundo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, fonte de força e fé, que mesmo nos momentos mais difíceis e desgastantes não permitiu que eu desistisse.

Aos meus pais, Marcos e Angela, exemplo de que a perseverança nunca deve faltar quando se busca por um sonho.

Às minhas irmãs Anne, Rafaela e Annalyce, que em todos os momentos permaneceram ao meu lado.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, palco das minhas conquistas e a instituição que terei sempre orgulho de carregar comigo o nome.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos.

Ao professor Paulo Henrique Graziotti, pelos longos anos de orientação, convivência, amizade e ensinamentos. Se hoje cheguei aqui, foi devido ao apoio e paciência por ele concedidos.

Aos Professores Cunha e Ivanildo pela disponibilidade e contribuição neste trabalho.

À PLANTAR S.A. pela infraestrutura e suporte na condução desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, que me acolheram e compartilharam comigo os seus conhecimentos.

Aos meus companheiros do Laboratório de Microbiologia do Solo, Débora, Lídia, Eliane, Bárbara, Aline, Lucinha, Bibi, Leandro, Cleriston e Arlito, que se tornaram verdadeiros amigos, amigos que levarei para toda a vida. À Dani, pelos ensinamentos, amizade e dedicação desde sempre.

Ao meu amado Emílio, quem sempre esteve presente nos momentos que mais precisei, sendo fonte de inspiração, ajuda, carinho, paciência e amor. Sem este apoio eu não chegaria onde cheguei.

Às minhas amigas de curso, quem eu levarei pela vida, Carol e Rafa, pelos melhores momentos que alguém poderia desejar.

E a todos aqueles que me acompanharam e colaboraram com esta jornada, o meu muito obrigada!

## RESUMO

ÂNGELA LAÍS FERNANDES GOMES. **SELEÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM VIVEIRO COMERCIAL DE MUDAS DE EUCALIPTO.** 2016. 38 p. (Dissertação - Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

Os benefícios das associações ectomicorrízicas são dependentes da planta hospedeira, do isolado fúngico e do ambiente. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Pisolithus* sp. que colonizem mudas clonais de eucalipto propagados por miniestaquia e que promovam maior sobrevivência, crescimento e nutrição das mudas em viveiro comercial. Os clones PT3335 e PT3336 foram inoculados com 18 isolados de *Pisolithus* sp. e crescidos em substrato com adubação fosfatada reduzida, mais os controles não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada de substrato. A inoculação dos fungos ectomicorrízicos aumentou a sobrevivência, enraizamento, colonização, crescimento e teores de Fe em relação aos controles, porém estes efeitos foram dependentes de isolados e clones. Para o PT3335, alguns isolados dobraram a sobrevivência das mini-estacas em relação ao Controle e ao Comercial, sendo os melhores o D29, D62, D63, D118 e D216. Para o PT3336 os melhores isolados foram D5, D29 e D88, com aumento da sobrevivência de até 25 %. Os maiores aumentos de altura foram observados nas mudas do clone PT3335 inoculadas com D15, D16, D95, D184, D198, D206 e D216, sendo de 27 % a 32 % em relação às mudas do Comercial. Os isolados D63 e D216 aumentaram a massa seca (MS) da parte aérea dos dois clones em relação ao Comercial, sendo os maiores aumentos de 140 % nas mudas inoculadas com o D216 e de 87,5 % naquelas inoculadas com o D63. As mudas do PT3336 inoculadas com o D216 apresentaram maiores MS total (31,6 %) e teores de clorofila (39,9 %) em relação às mudas do Comercial. Os isolados que mais colonizaram as raízes foram D5 (19,5 %), D10 (11,7 %), D216 (10,5 %) e D63 (8,8 %) para o PT3335 e D118 (15,6 %), D206 (11,7 %), D216 (11,1 %) e D63 (10,0 %) para o PT3336. Os teores de Fe nas mudas do PT3336 inoculadas com D5, D10, D58, D85, D106, D118, D170, D184 e D216 foram de 21 a 79,3 % maiores do que os das mudas do Comercial e de 38,6 % a 110 % maior que os das do Controle. A colonização se correlacionou positivamente com a MS da parte aérea, das raízes e total para o PT3335 e com a sobrevivência e teores de P para o PT3336. A inoculação com isolados de *Pisolithus* sp. aumenta a colonização ectomicorrízica e o crescimento de mudas eucalipto em viveiro comercial, mas isto é dependente do clone e do isolado. Os isolados D63



e D216 são os mais promissores para utilização em programas de inoculação em viveiro comercial de mudas clonais de eucalipto.

**Palavras-chave:** ectomicorriza, produção de mudas, *Eucalyptus*, *Pisolithus*.

## ABSTRACT

ÂNGELA LAÍS FERNANDES GOMES. **ECTOMYCORRHIZAL FUNGI SELECTION IN COMMERCIAL NURSERY OF EUCALYPT CUTTINGS**. 2016. 38 p. (Dissertation - Master in Plant Production) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

The benefits of ectomycorrhizal associations are dependent on the host plant, the fungal isolate and environment. The objective of this work was to select *Pisolithus* sp. isolates that colonize eucalypt cuttings propagated by minicutting and that promote higher survival, growth and nutrition of cuttings on commercial nursery. The PT3335 and PT3336 clones were inoculated with 18 isolates of *Pisolithus* sp. and grown in substrate with reduced phosphate fertilization, in addition to non inoculated controls with (Control) and without (Commercial) reduction of the substrate phosphate fertilization. The inoculation of ectomycorrhizal fungi increased the survival, rooting, colonization, growth and Fe contents in relation to controls, but these effects were dependent on isolates and clones. For PT3335, some isolates doubled the survival of minicuttings in relation to Control and Commercial, having D29, D62, D63, D118 and D216 as the best ones. For PT3336 the best isolates were D5, D29 and D88, with survival increased to 25 %. The greatest height increases were observed in the PT3335 cuttings inoculated with D15, D16, D95, D184, D198, D206 and D216, which were from 27 to 32 % in relation to the Commercial cuttings. The D63 and D216 isolates increased the dry mass (DM) of the aerial part of both clones in relation to Commercial, which the largest increases were 140 % times in the cuttings inoculated with D216 and 87.5 % in those inoculated with D63. The PT3336 cuttings inoculated with D216 presented higher total DM (31.6 %) and chlorophyll contents (39.9 %) in relation to the Commercial cuttings. The isolates that most colonized the roots were D5 (19.5 %), D10 (11.7 %), D216 (10.5 %) and D63 (8.8 %) for PT3335 and D118 (15.6 %), D206 (11.7 %), D216 (11.1 %) and D63 (10.0 %) for PT3336. The Fe contents in the PT3336 cuttings inoculated with D5, D10, D58, D85, D106, D118, D170, D184 and D216 were from 21 % to 79.3 % higher than those of Commercial cuttings and from 38.6 % to 110 % higher than those of the Control. The colonization was positively correlated with the DM of the aerial part, of the roots and total for the PT3335 and with the survival and P contents for the PT3336. The inoculation with *Pisolithus* sp. isolates increases ectomycorrhizal colonization and growth of eucalypt cuttings in commercial nursery, but this is dependent on the clone and isolate. The D63 and D216

isolates are the most promising for usage in inoculation programs in commercial nursery of eucalypt cuttings.

**Keywords:** ectomycorrhiza, cutting production, *Eucalyptus*, *Pisolithus*.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>2</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERAURA.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Relação fungo-hospedeiro .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Inoculantes .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Influência do N e P nas plantas e na colonização .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Benefícios das ectomicorrizas.....</b>	<b>8</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Local do experimento .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Delineamento experimental.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Isolados Ectomicorrízicos e Produção de Inoculante .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Substrato de produção das mudas, plantio, fertilização e inoculação de plantio ...</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Produção das mudas.....</b>	<b>11</b>
<b>2.6 Condução do experimento e inoculação de reforço .....</b>	<b>11</b>
<b>2.7 Avaliações e colheita do experimento.....</b>	<b>12</b>
<b>2.8 Análises estatísticas.....</b>	<b>13</b>
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Sobrevivência, crescimento das mudas, colonização das raízes e teor de clorofila</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Teores de nutrientes .....</b>	<b>20</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>26</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>APÊNDICE A. ....</b>	<b>32</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>33</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>34</b>

## INTRODUÇÃO

A crescente demanda de produtos de base florestal, as restrições para a inclusão de novas áreas e a crescente preocupação na conservação da natureza impõe a necessidade de novas estratégias para aumentar a produtividade e sustentabilidade no setor. Neste sentido, as ectomicorrizas tornam-se de grande potencial como uma biotecnologia para aumentar a produtividade e a sustentabilidade dos plantios de eucalipto, pois vários trabalhos demonstraram que essa simbiose pode aumentar a sobrevivência e crescimento desta planta, principalmente em condições de baixa fertilidade de solo.

A inoculação por fungos ectomicorrízicos em viveiros de produção de mudas é uma realidade em outros países. Porém, apesar de os plantios de eucalipto serem predominantemente em solos de baixa fertilidade, esta simbiose não tem sido utilizada no Brasil. Os programas de melhoramento para o eucalipto selecionaram plantas que fossem mais responsivas à fertilização, de forma que os materiais genéticos disponíveis no mercado não são aptos à simbiose com FEM. Além disso, a produção de mudas é realizada com a adição de grandes quantidades de adubo, especialmente os fosfatados. Isto dificulta a associação ectomicorrízica, uma vez que, quando há grande disponibilidade de P no substrato, há diminuição da alocação de fotossintetatos para o sistema radicular que são essenciais para o crescimento do fungo.

O processo de inoculação também depende do tipo e disponibilidade de inoculantes. Os inoculantes considerados mais apropriados são aqueles produzidos em cultura pura, que permitem a utilização de isolados previamente testados quanto à sua compatibilidade e eficiência. Apesar das limitações no aumento de escala e custos de produção, este é um tipo de inoculante já utilizado comercialmente em alguns países. No Brasil não há inoculantes comerciais disponíveis no mercado, uma vez que a maioria das pesquisas realizadas até hoje não foram capazes de selecionar fungos ectomicorrízicos que fossem capazes de colonizar e promover o crescimento de mudas de diferentes procedências e regiões (COSTA *et al.*, 2016; GANDINI *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2012). Isto dificulta a produção de um inoculante que seja compatível às diversas condições a que serão expostos e torna esta biotecnologia um desafio para utilização em larga escala.

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 destes fungos de forma industrial. A adoção de práticas de inoculação nos viveiros auxiliará nos processos de seleção de FEM capazes de promover a colonização,

sobrevivência e crescimento das mudas, bem como suas adaptações em campo. Com isto, será possível o estabelecimento de empresas de produção de inoculantes, gerando novos empregos e contribuindo para a melhoria da qualidade de vida da sociedade. Ainda, há o benefício ambiental, uma vez que os adubos são provenientes de fontes esgotáveis e o processo produtivo dos insumos pode contribuir para a degradação do ambiente, sendo a utilização desta alternativa biológica uma colaboradora para a criação de um setor florestal mais sustentável.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, L.S. *et al.* Inoculação de micélio vegetativo de fungos ectomicorrízicos impregnados em gel de alginato em viveiro comercial de estacas enraizadas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, no prelo, 2016.

GANDINI, A.M.M. *et al.* Growth and nutrition of eucalypt rooted cuttings promoted by ectomycorrhizal fungi in commercial nurseries. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.1554-1565, 2015.

SOUZA, E.L. *et al.* Efeito da inoculação com isolados de fungos ctomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* hill ex Maiden. **Ciência Florestal**, v.22, n.2, p.251-261, 2012.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

A madeira é hoje uma das commodities mais produzidas pelo Brasil, e sua utilização como fonte para diversos setores é de fundamental importância para a economia e sustentabilidade. A princípio, a madeira era retirada das florestas nativas, o que acarretou uma significativa redução da área de florestas nativas. O plantio de florestas para fins produtivos veio como uma forma de evitar esta grande pressão nas matas nativas, e se tornou uma das principais atividades de produção da economia brasileira.

A área plantada para fins industriais no país tem crescido consideravelmente, atingindo 7,74 milhões de hectares em 2014 (IBÁ, 2015). As espécies mais utilizadas nos programas de reflorestamento são o pinus e o eucalipto, sendo que os plantios de eucalipto representam 71,9 % do total plantado e estão localizados principalmente nos Estados de Minas Gerais (25,2 %), São Paulo (17,6 %) e Mato Grosso do Sul (14,5 %) (IBÁ, 2015). Minas Gerais possui uma área de plantada de 1,4 milhões de hectares com eucalipto e quase 40 mil hectares de pinus (IBÁ, 2015), sendo a maior parte dos plantios conduzidos no Vale do Jequitinhonha.

O eucalipto contribuiu para a redução da exploração de florestas nativas, pois seus produtos são utilizados como matéria prima em diferentes processos industriais como lenha, carvão, celulose, construção civil, entre outros (IBÁ, 2015). As espécies de eucalipto destinadas a plantios comerciais apresentam crescimento rápido e boa adaptabilidade em campo. Todavia, a formação de florestas de alta produção depende, em grande parte, da qualidade das mudas plantadas, pois são estas que irão produzir árvores com crescimento volumétrico economicamente desejável (GOMES *et al.*, 1991).

A produção comercial de mudas de eucalipto é de grande importância para o setor florestal, pois existe grande demanda de mudas para o plantio e replantio em campo, para pequenos e grandes produtores. A qualidade das mudas também é de fundamental importância para o êxito na formação dos povoamentos florestais, sendo então necessário estas mudas apresentarem vigor suficiente para resistir às condições adversas encontradas no campo (GOMES *et al.*, 2002). Além disso, apesar da boa adaptabilidade da cultura, há ainda restrições no que diz respeito à fertilidade do solo. A maior parte dos plantios é realizada em ambientes que possuem baixa fertilidade natural, com histórico de uso agrícola e pecuário, além de apresentarem degradação física, biológica e química. Devido estas condições, a produção de eucalipto é dependente de adubações, o que diminui a sustentabilidade do plantio.

Desta forma, a utilização de biotecnologias capazes de potencializar o crescimento e produção da cultura, assim como minimizar a utilização da fertilização é uma alternativa que merece destaque devido sua importância econômica e ecológica, visto que estes adubos são oriundos de fontes findáveis. Dentre estas biotecnologias, o emprego de micro-organismos que fazem simbiose com as culturas florestais tem se mostrado bastante efetiva na maior absorção de nutrientes e favorecer o desenvolvimento da cultura. Para o eucalipto, a simbiose com fungos ectomicorrízicos (FEM) é uma das mais notáveis associações que a espécie é capaz de formar.

A simbiose ectomicorrízica é uma associação mutualística entre certos tipos de fungos e as raízes de algumas plantas. Ela é benéfica ao crescimento, especialmente em áreas onde os fatores climáticos e edáficos são limitantes, como é o caso dos plantios de eucalipto no Brasil. Estes fungos aumentam a superfície radicular da planta, proporcionando maior absorção de água e nutrientes, especialmente aqueles com baixa mobilidade no solo, como é o caso do fósforo, aumentam a longevidade das raízes infectadas e as protegem contra patógenos do solo, proporcionam resistência à toxicidade de metais e sintetizam hormônios de crescimento como ácido indolacético e precursores de giberelinas (BARROS; BRANDI; REIS, 1978; CAMPOS *et al.*, 2011; CANTON *et al.*, 2016; SMITH; READ, 2008). Por outro lado, o fungo utiliza carboidratos e demais substâncias orgânicas das raízes para completar seu ciclo de desenvolvimento.

A simbiose com FEM foi demonstrada através do plantio de espécies em habitats naturais e na dificuldade de crescimento de algumas dessas árvores em solos degradados, onde não existem fungos compatíveis com as espécies introduzidas (VOZZO; HACSKAYLO, 1971). No início da simbiose, enquanto as micorrizas ainda não se estabeleceram, as plantas podem ser prejudicadas, já que os fungos passam a ser dreno de fotossintetatos. Quando um fungo simbiote mais efetivo é introduzido com sucesso e a associação se desenvolve na planta, a inoculação resultará em benefícios para ambos (BACCHI; KRUGNER, 1988).

A capacidade competitiva e infectiva no processo de seleção de FEM eficientes também devem ser observadas (TRAPPE, 1977; MOSSE; STRIBLEY; Le TACON, 1981). A inoculação de mudas de *Eucalyptus* sp. com fungos ectomicorrízicos tem tido sucesso principalmente sob condições de laboratório e casa de vegetação (GRENVILLE *et al.*, 1986; SILVA; ANTONIOLLI; ANDREAZZA, 2003; SOUZA *et al.*, 2012).



### 1.1 Relação fungo-hospedeiro

As principais famílias vegetais que fazem associação com fungos ectomicorrízicos são Betulaceae, Dipterocarpaceae, Fagaceae, Myrtaceae, Pinaceae e Salicaceae (WILCOX, 1990). A simbiose é favorecida quando a planta encontra obstáculos de crescimento no campo, especialmente aqueles ligados à baixa fertilidade do solo, e diversos trabalhos sobre a inoculação de FEM em plantas já demonstram estes efeitos benéficos se manifestando nestas condições adversas.

A associação entre a planta e os fungos ectomicorrízicos ocorre naturalmente nos plantios de eucalipto no Brasil. No entanto, ela é rara em viveiros florestais devido aos altos níveis de adubação fosfatada e nitrogenada nesta fase do desenvolvimento e a utilização de substratos compostos de materiais inertes como vermiculita, casca de arroz carbonizada e fibra de coco (SOARES *et al.*, 1990). Ainda, deve-se levar em consideração a competitividade ectomicorrízica, que é a capacidade de um isolado ectomicorrízico em formar e manter a associação sob condições impostas. Desta forma, é necessário garantir o estabelecimento e a permanência do fungo selecionado nas circunstâncias definidas, especialmente em ambientes hostis para com crescimento dos fungos (GARBAYE, 1983).

É importante salientar que os FEM apresentam média especificidade com o hospedeiro, ou seja, estes fungos não conseguem efetuar simbiose com qualquer espécie arbórea (BRUNDRETT, 2002). Para a maioria das espécies de eucalipto, os gêneros mais encontrados na interação planta-fungo são *Pisolithus* sp. e *Scleroderma* sp. (BARROS; BRANDI; REIS, 1978; CAMPOS *et al.*, 2011). Ainda assim, não são todas as espécies destes gêneros que conseguem colonizar as plantas quando elas se encontram em condições diferenciadas daquela de origem dos FEM. Por este motivo, a planta hospedeira deverá exercer um controle sobre a formação das micorrizas, e este envolve uma combinação entre o mecanismo limitante ou promotor da colonização e das condições ambientais em que a simbiose é exposta (BUWALDA; STRIBLEY; TINKER, 1984).

A idade da cultura e o manejo também são fatores que podem influenciar a colonização e na diversidade de fungos que podem ser encontrados na área (CAMPOS *et al.*, 2011). Os FEM podem associar-se em estágios diferenciados do crescimento da planta, sendo os que se associam às plantas jovens fungos de estágio inicial e os que se associam às plantas mais velhas são os fungos de estágio tardio. Os que fazem simbiose com plantas em qualquer fase são chamados multiestádios (LAST; MASON; WILSON, 1984). Esta característica pode estar ligada à maior demanda de fotossintetatos por parte dos fungos ou às diferentes formas

em que os nutrientes estão disponíveis no solo (DIGHTON; MASON, 1985; EATON; AYRES, 2002).

Desta forma, estudos mais prolongados devem ser realizados utilizando FEM que colonizem de forma eficaz as raízes das plantas, levando em consideração que os fatores que condicionam o estabelecimento do fungo na planta e os que influenciam a eficiência na promoção do crescimento e da adaptação da planta ao ambiente não são totalmente conhecidos (SMITH; READ, 2008).

## 1.2 Inoculantes

O tipo de inoculante a ser utilizado é fundamental para o sucesso de um programa de inoculação de mudas (BRUNDRETT *et al.*, 1996). As características que o inoculante deve apresentar são: ser adequado para armazenamento e transporte, ter aplicação fácil e uniforme e ser compatível com a espécie hospedeira. É importante ainda que o inoculante tenha qualidade microbiológica, ausência de patógenos e de micro-organismos indesejáveis (BRUNDRETT *et al.*, 1996), e que a produção de inoculantes seja aplicável a qualquer fungo que cresce em cultura pura, o que permite selecionar e posteriormente utilizar estes fungos (MARX, 1980; LAST *et al.*, 1984; ALVES *et al.*, 2001).

Diversos tipos de inoculantes já foram produzidos e testados quanto às suas eficiências. Os inoculantes podem ser naturais, como o solo de plantações (MIKOLA, 1973) e esporos fúngicos (MARX; CORDELL, 1989), mas também pode ser composto de micélio produzido em cultura pura (MARX, 1980). Este último é mais sofisticado e pode ser produzido em laboratório com auxílio de biorreatores e encapsulamento em gel de alginato de cálcio (ROSSI; FURIGO; OLIVEIRA, 2007).

A seleção de isolados fúngicos eficientes para a produção de inoculantes deve passar por uma etapa importante, que é o isolamento e a manutenção *in vitro* de uma coleção de isolados (GARBAYE, 1990). Os inoculantes micelianos são produzidos com micélio fúngico que pode ser isolado e cultivado em meio artificial, o que permite testar a infectividade e eficiência dos fungos nas plantas de interesse, para posterior utilização nos sistemas de produção comercial de mudas (MARX, 1980).

Apesar dos benefícios da inoculação com FEM, outro aspecto a se considerar é que, no mercado nacional, a oferta de inoculantes é inexistente, e a importação destes iria aumentar muito os custos de produção de mudas. Ainda, mesmo com as pesquisas em desenvolvimento, não há suficiente informação para encorajar os produtores a investir nesta biotecnologia, já que não existem ainda relatos de fungos ectomicorrízicos que são capazes de

se adaptarem às diversas condições ambientais do país e espécies e, ou clones existentes no mercado.

### **1.3 Influência do N e P nas plantas e na colonização**

Apesar de promover o desenvolvimento das plantas no campo, a utilização de inoculantes de FEM que promovem simbiose ainda não é empregada em larga escala para a produção de mudas em viveiros. Isto ocorre porque a adubação nesta etapa é bastante elevada e os clones de eucalipto usados atualmente foram melhorados de forma a responder à presença de nutrientes, não a simbiose. Além disso, altos níveis de fósforo e nitrogênio no substrato reduzem a alocação de carboidratos nas raízes das plantas, o que dificulta o desenvolvimento do fungo quando em associação com as raízes (MARX; HATCH; MENDICINO, 1977).

O N é essencial para a síntese de clorofila e a deficiência deste nutriente pode acarretar uma menor utilização da energia solar para realização de funções essenciais, como a fotossíntese (POTAFÓS, 1998). Os índices de clorofila nas folhas também se correlacionam com o teor de N na planta (SCHADICHINA; DMITRIEVA, 1995), sendo esta relação atribuída ao fato de cerca de 70 % do total de N nas folhas estarem em forma de enzimas associadas aos cloroplastos (STOCKING; ONGUM, 1962).

O P é responsável pelo controle da atividade enzimática e pelo armazenamento de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Dos macronutrientes, é o menos exigido pelas culturas, mas é o mais aplicado nas fertilizações, já que os solos brasileiros são pobres neste nutriente e ele possui alta adsorção na superfície de óxidos de Fe e Al na forma orgânica e na biomassa microbiana (SCHACHTMAN; REID; AYLING, 1998).

O benefício obtido com a associação micorrízica é bastante dependente da quantidade de P no solo. O crescimento dos dois simbiontes é inibido quanto à dose de P, que tem influência direta sobre a colonização das raízes das plantas (DIGTHON *et al.*, 1993). Quando a disponibilidade de P é baixa, ocorre o aumento na colonização das raízes do hospedeiro, havendo maiores benefícios para as plantas, que conseguem se desenvolver mesmo nestas condições adversas (SMITH; READ, 2008). Alguns autores observaram significativa inibição da colonização quando as concentrações de fósforo disponível no solo foram superiores a 8 mg por planta (VIEIRA; PERES, 1988; SOUZA; SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004). Estes resultados confirmam observações em pesquisas quanto ao efeito inibidor de níveis elevados de P sobre os benefícios da associação ectomicorrízica (SOARES *et al.*; 1990; SOUZA; SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004; GANDINI *et al.* 2015).

#### 1.4 Benefícios das ectomicorrizas

No Brasil, a inoculação de plantas com fungos ectomicorrízicos até o presente foi conduzida, na maioria das vezes, em condições controladas de laboratório e casa de vegetação (KASUYA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012). Para que um FEM possa ser inoculado comercialmente, precisa ser de rápido crescimento em meio de cultura, apresente colonização efetiva, desenvolva-se em diferentes hospedeiros, promova aumento do vigor, da sobrevivência, do crescimento e da adaptabilidade ecológica das mudas no campo (MOLINA, 1981). Quando há o intuito de se utilizar FEM em programas de micorrização, os fungos devem ser inoculados nas mudas e testados em condições de viveiro, casa de vegetação e no campo, para posteriormente serem recomendados ao uso em larga escala.

As associações ectomicorrízicas têm caráter multifuncional, pois os benefícios nutricionais não são os únicos proporcionados para os hospedeiros (NEWSHAM; FITTER; WATKINSON, 1995). Além do aumento da absorção de nutrientes, especialmente aqueles com baixa mobilidade no solo (GLOWA; AROCENA; MASSICOTE, 2003; SAWYER; CHAMBERS; CAIRNEY, 2003; DI PIETRO; CHURIN; GARBAYE, 2007), há o aumento da sobrevivência e do crescimento das plantas e melhoria da tolerância a diferentes estresses ambientais (ALVES *et al.*, 2001; ADELEKE *et al.*, 2010; HOBBIIE; AGERER, 2010).

Em mudas de *E. grandis* a inoculação com *Pisolithus tinctorius* aumentou a altura em 38 %, a massa seca da parte aérea em 85 %, a colonização em 560 % e ainda aumentou a tolerância a Mn (CANTON *et al.*, 2016). A porcentagem do comprimento radicular colonizado foi 12 % maior em mudas de *E. dunnii* inoculadas com *Pisolithus* sp. isolados UFSC-Pt22 e UFSC-Pt145 em uma mistura de turfa-vermiculita-meio de cultura (SOUZA *et al.*, 2008), enquanto a inoculação de mudas seminais de *E. urophylla* e *E. globulus* com esporos de *Scleroderma* sp. em condições controladas proporcionou colonização de 50 a 100 % das raízes finas (CHEN; KANG; MALAJCZUK, 2006). Contudo, estes resultados variam de acordo com a planta hospedeira, com o isolado de fungo e com a espécie de FEM utilizada.

A inoculação de *Chondrogaster angustisporus* UFSC-Ch163 e *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 em mudas de *Eucalyptus dunnii* aumentou a massa seca das raízes em 38 % em relação às mudas não inoculadas (SOUZA *et al.*, 2004). Em mudas de *E. dunnii* inoculadas com *Pisolithus* sp. isolado UFSC-Pt24 houve aumento de 170 % na massa seca da parte aérea em relação às não inoculadas (ALVES *et al.*, 2001); com a inoculação com *Scleroderma* sp. isolado UFSC-Sc68, o aumento de massa foi de 330 % (SOUZA *et al.*, 2008); e com *P. microcarpus* isolado UFSC-Pt116 o acréscimo foi 120 % maior que o controle não inoculado (SOUZA *et al.*, 2004).

Também foi observado em muitos estudos o aumento nos conteúdos de P para mudas de eucalipto inoculadas com fungos ectomicorrízicos (ALVES *et al.* 2001; CHEN; DELL; MALAJCZUK, 2006; SOUZA *et al.*, 2008). Mudas de *E. dunnii* inoculadas com *P. microcarpus* isolado UFSC-Pt188 acumularam 900 % mais P do que mudas não inoculadas (SOUZA *et al.*, 2008). Em mudas de *E. urophylla* inoculadas com esporos de *Scleroderma* sp., o aumento foi de 180 % nos conteúdos de P e de até 220 % para os conteúdos de N (CHEN; KANG; DELL, 2006). Mudas de *E. urophylla* também apresentaram aumentos de 170 % no conteúdo de K na parte aérea quando inoculadas com esporos de *Scleroderma* spp. em relação às mudas não inoculadas (SILVA; ANTONIOLLI; ANDREAZZA, 2003).

Assim sendo, pesquisas que envolvam espécies florestais utilizadas em plantios comerciais e fungos ectomicorrízicos promotores do crescimento e nutrição são de extrema importância para que haja a disseminação desta biotecnologia no mercado e estimule a seleção de FEM com melhor adaptação a uma maior gama de hospedeiros e condições ambientais. Tendo em vista estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Pisolithus* sp. que colonizem mudas clonais de eucalipto propagadas por miniestaquia e que promovam sua sobrevivência, crescimento, colonização e absorção de nutrientes em condições de viveiro.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local do experimento**

O estudo foi realizado no viveiro comercial de mudas clonais de eucalipto da empresa PLANTAR S.A., localizada em Curvelo – MG. O clima da cidade é classificado como tropical de altitude, tipo Cwa segundo a classificação climática de Köppen e Geiger. Esta característica é advinda da altitude média de 633 m, latitude 18°50'43" S e longitude 44°35'19" W. O período de verão registra chuvas e temperaturas elevadas, enquanto o inverno é seco com temperaturas mais baixas. A temperatura é amena durante o ano, variando de 15 °C a 30 °C e a precipitação anual média é de 1.308,3 mm. O presente experimento foi conduzido no período de primeiro de abril a 10 de julho de 2012, abrangendo as estações outono e inverno.

### **2.2 Delineamento experimental**

O experimento foi um arranjo fatorial 2x20, conduzido em um Delineamento Inteiramente Casualizado com cinco repetições, sendo a parcela experimental composta de seis plantas. A inoculação de dois clones de eucalipto (PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.) com 18 isolados de *Pisolithus* sp., desenvolvidos em

substrato com redução da adubação fosfatada correspondem a 36 tratamentos; os demais quatro tratamentos foram os referidos dois clones sem o *Pisolithus* sp., com redução da adubação fosfatada (Controle) e com a adubação fosfatada usada pela empresa (Comercial).

### **2.3 Isolados Ectomicorrízicos e Produção de Inoculante**

Os isolados de *Pisolithus* sp. utilizados foram D5, D10, D15, D16, D29, D58, D62, D63, D85, D88, D95, D106, D118, D170, D184, D198, D206 e D216, todos isolados de basidiomas colhidos em plantações de *Eucalyptus* sp. do Alto Jequitinhonha, em Minas Gerais e pertencentes à coleção de fungos ectomicorrízicos do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM. O inoculante utilizado nas mudas foi produzido a partir de culturas estoque que são mantidas em placas de Petri com 20 mL de meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado - MNM (MARX, 1969).

Foram efetuadas três inoculações no experimento, a partir de dois tipos de inoculantes com micélio vegetativo. O primeiro inoculante utilizado foi composto de discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura sólido com micélio ativo retirados de bordas de colônias crescidas por 21 dias a 25 °C. Após a retirada dos discos, estes foram transferidos para outras placas contendo 10 mL do mesmo meio de cultura e foram incubados por três dias em mesmas condições para pré-crescimento e reativação do micélio antes da inoculação nas mini-estacas. O segundo inoculante, utilizado nas duas inoculações de reforço, era uma suspensão de micélio vegetativo triturado, que foi produzido pelo cultivo dos isolados a 25 °C em meio sólido MNM modificado por 30 dias. Foram retirados discos de 5 mm de diâmetro que foram transferidos para outras placas de Petri contendo 10 mL de meio MNM e incubados por três dias. Posteriormente, para cada isolado, adicionou-se 10 discos apresentando crescimento das hifas a 6 erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido MNM modificado (MARX, 1969) e incubados por 28 dias. Durante este período, os frascos foram suavemente agitados a cada dois dias. No viveiro, no momento da inoculação, os micélios foram colocados em peneira de malha com 150 µm de abertura e lavados com água destilada e esterilizada, sendo em seguida triturados em liquidificador por 10 segundos com 300 mL de água destilada e esterilizada adicionada de carvão ativo na proporção de 2 g L<sup>-1</sup>.

### **2.4 Substrato de produção das mudas, plantio, fertilização e inoculação de plantio**

O substrato de produção de mudas foi uma mistura de fibra de coco, vermiculita expandida fina e composto de casca de pinus, nas proporções respectivas de 45 %, 45 % e 10 %. Para todos os tratamentos, porções de 200 L desta mistura foram umedecidas com 20 L de

solução nutritiva fornecendo: 1,50 g dm<sup>-3</sup> de N e 1,65 g dm<sup>-3</sup> de S (sulfato de amônio – 20 % N e 22 % S); 1,40 g dm<sup>-3</sup> de K (cloreto de potássio - 62 % K); 30 mg dm<sup>-3</sup> de Zn (sulfato de zinco hepta-hidratado – 20 % Zn); 52,5 mg dm<sup>-3</sup> de Cu (sulfato de cobre - 35 % Cu); 45 mg dm<sup>-3</sup> de Mn (sulfato de manganês - 30 % Mn) e 51 mg dm<sup>-3</sup> de B (ácido bórico - 17 % B). Para o tratamento Comercial, além da solução nutritiva o substrato foi adubado com: 19,5 g dm<sup>-3</sup> de N, 3,9 g dm<sup>-3</sup> de P e 24 g dm<sup>-3</sup> de K (Basacote - NPK 13-6-16 de liberação lenta) e 125,9 g dm<sup>-3</sup> de P (Superfosfato simples farelado - 18 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em água). Para os demais tratamentos o superfosfato simples não foi utilizado. O substrato foi acondicionado em tubetes de 55 cm<sup>3</sup>, previamente lavados em água corrente e desinfetados por imersão em água a 85 °C por 10 segundos. O enchimento dos tubetes foi de forma manual, de modo que cada tubete recebeu cerca de 60 cm<sup>3</sup> de substrato (16.667 tubetes são preenchidos com 1 m<sup>3</sup> de substrato), sendo que os tratamentos com redução da adubação fosfatada receberam 1,18 mg de P por muda e o Comercial recebeu 38,93 mg. Os tubetes foram preenchidos com o substrato até 3 cm da borda superior. Três discos de meio de cultura contendo micélio pré-crescido, primeiro inoculante, de cada um dos isolados de *Pisolithus* sp. foram colocados em cada tubete. O controle com adubação reduzida recebeu igual quantidade de discos de meio MNM, porém sem crescimento fúngico. Após a inoculação, os tubetes tiveram seu volume completado com o substrato correspondente.

O substrato utilizado no tratamento Comercial não recebeu qualquer tipo de inoculante.

## 2.5 Produção das mudas

Mini-estacas com 6 a 8 cm de comprimento e com quatro a seis pares de folhas foram colhidas no viveiro de mudas da PLANTAR S.A. e plantadas no mesmo dia nos tubetes referentes a cada tratamento.

Os clones escolhidos foram PT3335, o mais propagado pela empresa e de características mais plásticas, e PT3336, clone que sofre muitas perdas devido à bacteriose foliar. Ambos são híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.

## 2.6 Condução do experimento e inoculação de reforço

As estacas foram acondicionadas em casa de vegetação, com irrigação por micro aspersão com turno de rega 20 minutos e lâmina de água de 1 mm. Após 15 dias do plantio das mini-estacas, foi realizada a primeira inoculação de reforço (Figura 1) por meio da aplicação de 5 mL de suspensões de micélio vegetativo injetada a 5 cm de profundidade no substrato de crescimento de cada muda com o auxílio de uma seringa e sonda mamária usada

em bovinos. As mudas do tratamento Controle receberam a mesma suspensão do inoculante exceto micélio fúngico. Na casa de vegetação receberam fertirrigações via aspersão duas vezes por semana, sendo a lâmina de solução equivalente a 3 mm dia<sup>-1</sup>.

Após 22 dias, as mudas foram transferidas para casa de sombra, onde permaneceram por 10 dias, recebendo aos 25 dias após o estaqueamento e a segunda inoculação de reforço, igual à primeira descrita acima, recebendo mais seis fertirrigações com lâmina de solução de 1 mm cada.



Figura 1 - a) Inoculação da suspensão do micélio fúngico triturado. b) Detalhe da sonda utilizada.

A solução aplicada na casa de vegetação fornecia: 86,5 mg dm<sup>-3</sup> de P (super simples – 18 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); 0,49 g dm<sup>-3</sup> de N e 0,93 g dm<sup>-3</sup> de P (monoamônio fosfato MAP – 12 % N e 61 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); 73 mg dm<sup>-3</sup> de N e 80,3 mg dm<sup>-3</sup> de S (sulfato de amônio - 20 % N e 22 % S); 0,33 g dm<sup>-3</sup> de K (cloreto de potássio – 62 % K); 4,36 mg dm<sup>-3</sup> de Zn (sulfato de zinco hepta-hidratado – 20 % Zn); 3,78 mg dm<sup>-3</sup> de Cu (sulfato de cobre – 35 % Cu); 4,98 mg dm<sup>-3</sup> de Mn (sulfato de manganês – 30 % Mn); 1,24 mg dm<sup>-3</sup> de B (ácido bórico – 17 % B); 1,46 mg dm<sup>-3</sup> de Mg (sulfato de magnésio hepta-hidratado – 9 % Mg) e 1,08 mg dm<sup>-3</sup> de Fe (Ferrilene® – 6 % Fe). A solução aplicada na casa de sombra continha: 0,25 mg dm<sup>-3</sup> de P (super simples – 18 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); 54,0 mg dm<sup>-3</sup> de N e 102,3 mg dm<sup>-3</sup> de P (monoamônio fosfato MAP - 12 % N e 52 % P); 0,034 mg dm<sup>-3</sup> de N e 0,037 mg dm<sup>-3</sup> de S (sulfato de amônio - 20 % N e 22 % S); 0,43 mg dm<sup>-3</sup> de K (cloreto de potássio – 62 % K); 0,06 mg dm<sup>-3</sup> de Zn (Sulfato de zinco hepta-hidratado – 20 % Zn); 0,28 mg dm<sup>-3</sup> de Cu (Sulfato de cobre – 35 % Cu); 0,93 mg dm<sup>-3</sup> de Mn (Sulfato de manganês – 30 % Mn); 1,07 mg dm<sup>-3</sup> de B (Ácido bórico – 17 % B); 13,6 mg dm<sup>-3</sup> de Mg (Sulfato de magnésio hepta-hidratado – 9 % Mg); 0,6 mg dm<sup>-3</sup> de Fe (Ferrilene® – 6 % Fe); 100,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ca e 100,0 mg dm<sup>-3</sup> de N (nitrato de cálcio – 19 % Ca e 15 % N).

## 2.7 Avaliações e colheita do experimento

Aos 90 dias após o plantio avaliou-se a sobrevivência, altura, diâmetro do coleto e teor de clorofila das mudas. Aos 100 dias as mudas foram cortadas rente ao tubete, separando parte aérea das raízes. Os torrões, raízes mais substrato, foram removidos do tubete e foram



atribuídas notas para a formação do torrão (Figura 2). Em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente para a remoção do substrato e obtenção de uma amostra composta de cada parcela experimental e esta foi armazenada em solução de álcool 50 % para determinação da porcentagem de pontas de raízes colonizadas por FEM (BRUNDRETT *et al.*, 1996). O restante das raízes e a parte aérea foram secos até peso constante em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR) e cálculos da massa seca total (MST), da razão raiz/parte aérea (R/PA) e do Índice de Qualidade de Dickson (IQD) (DICKSON; LEAF; HOSNER, 1960). O IQD foi calculado pela fórmula:  $IQD = (MST) / [(H/D) + (MSPA/MSR)]$ . Após a pesagem, a MSPA foi moída em moinho tipo Willey com peneira de 40 mesh e digerida em solução nitroperclórica 2:1 (v:v) para determinação dos teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, manganês, ferro e cobre (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).



Figura 2 - Características dos torrões das raízes das mudas de eucalipto correspondentes às notas: a) Nota 3 - torrão firme e bem enraizado; b) Nota 2 - torrão moderadamente firme e parcialmente enraizado; c) Nota 1 - torrão fraco e mal enraizado.

## 2.8 Análises estatísticas

Os dados referentes à formação torrão (avaliados por notas) foram submetidos a uma análise de frequência. As médias das demais variáveis, cujos efeitos dos isolados (inclusive o Controle e o Comercial) foram significativos pelo teste F, foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5 % de significância. Os efeitos dos clones foram comparados pelo próprio teste F a 5 % de significância.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Sobrevivência, crescimento das mudas, colonização das raízes e teor de clorofila

A sobrevivência e a altura das mudas foram influenciadas ( $p \leq 0,05$ ) pelos efeitos principais, isolados e clones, sendo que o PT3335 apresentou maior enraizamento do que o PT3336 (Tabela 1). Em geral, o enraizamento das mini-estacas do Comercial foi semelhante a do Controle. A sobrevivência média das mini-estacas dos dois clones foi maior naquelas

inoculadas com os D5, D29, D62, D63, D85, D88, D118 e D216, sendo a sobrevivência das mini-estacas inoculadas por estes isolados 42,7 % maior do que a média dos controles (Comercial e Controle) (Tabela 1). A inoculação de todos os isolados propiciou maior sobrevivência que a dos controles no PT3335, enquanto no PT3336, apenas os D5 (25 %), D29 (25 %) e D88 (14 %) promoveram a sobrevivência em relação aos controles, sendo que nas mudas inoculadas com D106 e D170 a sobrevivência foi 18 % menor que as dos controles (Tabela 1).

No PT3335, a inoculação dos D29, D62, D63, D118 e D216 aumentou a sobrevivência das mini-estacas em 85 % a 115 % em relação aos controles (Comercial e Controle), com destaque para as mini-estacas inoculadas com o D63 (Tabela 1). Exceto D16, D184 e D198, a maioria dos isolados proporcionou sobrevivência maior que 70 %, sendo as maiores porcentagens de enraizamento observadas nas mudas inoculadas com D29 (93,3 %), D63 (96,7 %) e D216 (Tabela 1) (90 %).

Tabela 1 - Sobrevivência e altura das mudas dos clones PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*, inoculados com isolados de *Pisolithus* sp. e não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada no substrato de produção das mudas em viveiro comercial.

Tratamentos	Sobrevivência			Altura		
	PT3335	PT3336	Média	PT3335	PT3336	Média
	-----%-----			-----cm-----		
Comercial	43,3	66,7	55,0b <sup>1</sup>	24,8	23,3	24,1c
Controle	46,7	56,7	51,7b	29,0	26,6	27,8b
D5	73,3	76,7	75,0a	29,9	27,1	28,5a
D10	73,3	56,7	65,0b	29,6	26,0	27,8b
D15	70,0	60,0	65,0b	31,5	28,0	29,7a
D16	66,7	63,3	65,0b	32,3	25,8	29,1a
D29	93,3	76,7	85,0a	28,1	25,9	27,0b
D58	80,0	56,7	68,3b	29,9	25,8	27,9b
D62	86,7	66,7	76,7 <sup>a</sup>	31,0	26,7	28,9a
D63	96,7	66,7	81,7 <sup>a</sup>	30,3	27,4	28,8a
D85	80,0	60,0	70,0a	30,9	28,1	29,5a
D88	70,0	70,0	70,0a	30,7	26,6	28,7a
D95	73,3	53,3	63,3b	32,0	27,0	29,5a
D106	73,3	50,0	61,7b	30,9	24,1	27,5b
D118	83,3	63,3	73,3 <sup>a</sup>	30,9	28,1	29,5a
D170	76,7	50,0	63,3b	30,1	27,9	29,0a
D184	56,7	63,3	60,0b	32,8	29,3	31,0a
D198	66,7	56,7	61,7b	31,9	28,9	30,4a
D206	73,3	60,0	66,7b	32,2	25,9	29,1a
D216	90,0	63,3	76,7a	31,8	23,5	27,7b
Média	73,7A	61,8B	67,8	30,5A	26,6B	28,6

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade e médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t ao nível de 5 % de significância.

As alturas das mudas do Comercial foram menores do que as do Controle ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1). Na média dos clones, todos os isolados proporcionaram às mudas maior crescimento em altura em relação ao Comercial. Nas mudas inoculadas com D5, D15, D16, D62, D63, D85, D88, D95, D118, D170, D184, D198 e D206 as alturas foram de 18,3 % a 28,6 % maiores do que as do Comercial e de 2,5 % a 11,5 % maior do que as Controle (Tabela 1). Para o PT3335, as mudas inoculadas com todos os isolados apresentaram alturas iguais ou maiores que as do Comercial e do Controle, exceto aquelas inoculadas com o D29 em relação às do Controle (Tabela 1). A inoculação com D15, D16, D95, D184, D198, D206 e D216 aumentou a altura em 27 % a 32 % em relação às do Comercial e 9 % a 13 % em relação às do Controle. No entanto, para o PT3336, apenas os D184 (10 %) e D198 (9 %) promoveram a altura das mudas em relação às do Controle, sendo que o D106 (-9 %) e D216 (-12 %) reduziram a altura em relação este tratamento (Tabela 1).

A MSPA e a MST foram influenciadas pela inoculação dos isolados e este efeito foi dependente de clones (Figura 3). A MSR, o diâmetro do coleto e a relação raiz-parte aérea foram influenciados ( $p \leq 0,05$ ) apenas pelos clones, sendo sempre maior para o PT3336. As médias dessas variáveis foram: MSR - PT3335 = 1,0 g e PT3336 = 1,2 g; diâmetro - PT3335 = 3,4 mm e PT3336 = 3,6 mm, e R/PA - PT3335 = 0,37 e PT3336 = 0,45.

Nos dois clones, a MSPA das mudas do Comercial e Controle foram semelhantes (Figura 3: A e B). Para o PT3335, a MSPA das plantas inoculadas foi igual às do Controle e maior que as do Comercial, exceto D88 que reduziu a MSPA em 16 % em relação às do Controle (Figura 3A). Para o PT3336, a inoculação com D5, D15, D29, D58, D62, D63, D85, D88, D95, D170, D198, D206 e D216 aumentou a MSPA em relação às do Comercial e foi igual às do Controle (Figura 3B). No entanto, apesar de não significativa, a inoculação com D216 e D63 tendeu a aumentar a MSPA das mudas dos dois clones. Com a inoculação do D216 nas mini-estacas do clone PT3335, o aumento da MSPA foi de 52 % em relação às do Controle e 140 % em relação às do Comercial e para o PT3336, o aumento foi de 10,3 % em relação ao Controle e 28 % ao Comercial (Figura 3A). Com o D63, o aumento foi de 20 % em relação às do Controle e de 87,5 % em relação às mudas do Comercial para o PT3335 e de 17,2 % em relação ao Controle e 36 % ao Comercial para o PT3336 (Figura 3B).

Para o PT3335, a MST não foi influenciada ( $p > 0,05$ ) pelos tratamentos fúngicos e os controles (Figura 3C). No entanto, como observado para a MSPA, D216 tendeu a aumentar a MST das plantas em 81,5 % em relação às do Comercial e em 48,5 % em relação às do Controle. Para o PT3336, a inoculação com D5, D15, D29, D58 D63, D85, D88, D95, D170, D198 e D216 proporcionou MST maior que as plantas do Comercial e igual a do Controle (Figura 3D). Para este clone, as mudas inoculadas com D63 e D216 tiveram a MST aumentada em 31,6 % em relação ao Comercial e 11,1 % em relação às do Controle (Figura 3D).

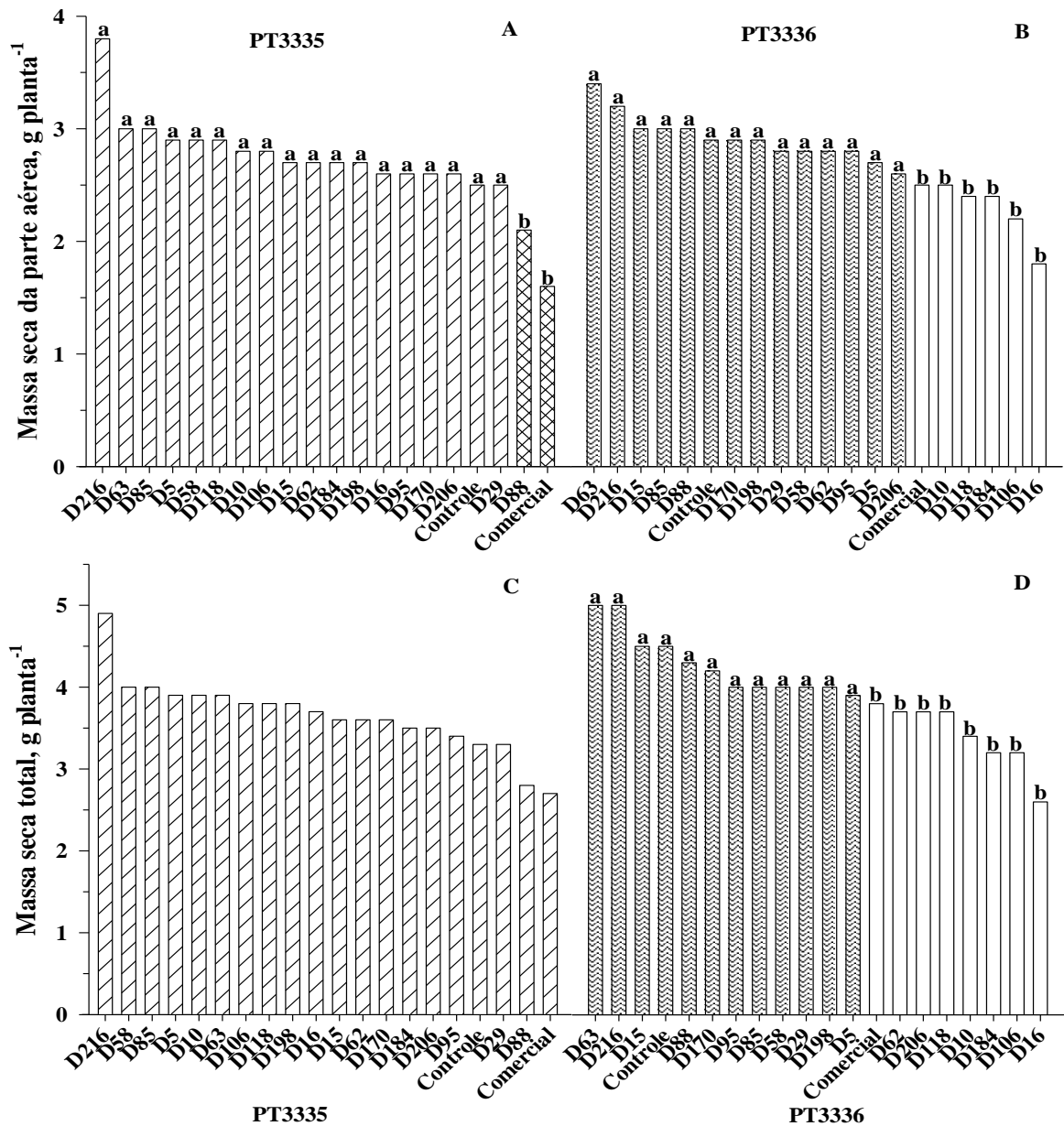


Figura 3 - Massa seca da parte aérea (A e B) e total (C e D) das mudas dos clones PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*, inoculados com isolados de *Pisolithus* sp. e não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada no substrato de produção das mudas em viveiro comercial.

A frequência das notas para formação do torrão das raízes das mudas demonstrou que o PT3336 apresentou um enraizamento maior do que o PT3335 (Figura 4: A e B). No PT3335, nas mudas do Controle e nas inoculadas com D5, D10, D15, D29, D62, D170, D184, D198, D206, D216 a frequência de nota três (torrões firmes e bem enraizados) foi reduzida em média em 12 % em relação ao Comercial (Figura 4A). A inoculação com D16, D58, D63, D85, D88, D95, D106 e D118, entretanto, proporcionou uma frequência de nota três nas mudas em média 22,9 % maior em relação ao Comercial e 57,7 % em relação ao Controle,

com destaque para o isolado D88, que propiciou frequência torrões com nota três de 100 % e, portanto, 71,5 % maior que o Comercial e 120 % maior que as do Controle (Figura 4A). É importante salientar que o Controle foi o tratamento cujas mudas apresentaram menor percentual de bom enraizamento. Para o PT3336, a maior frequência de mudas com nota três foi observada nas mudas do Comercial, Controle, D5, D15, D29, D58, D63, D95, D106, D170, D198 e D216, sendo esta maior que 85 % (Figura 4B).

Os teores de clorofila total nas folhas das mudas foram influenciados ( $p \leq 0,05$ ) pela inoculação e este efeito foi dependente dos clones (Figura 4: C e D). Para o PT3335, os teores de clorofila total não foram influenciados pela inoculação ou pela redução da adubação fosfatada, sendo em média de 39,5 ICF (Índice de Clorofila Falker) (Figura 4C). No clone PT3336, as mudas inoculadas com todos os isolados, exceto D58 e D118, possuíam maiores teores de clorofila (Figura 4D). O isolado D216 tendeu a aumentar os teores de clorofila total, sendo que as mudas inoculadas com este fungo possuíam teores 39,9 % maiores que as do Comercial e 10,1 % maiores que as do Controle.

A porcentagem de pontas colonizadas foi influenciada ( $p \leq 0,05$ ) pelos isolados e este efeito foi dependente do clone (Figura 4: E e F). O teste de Scott-Knott separou os isolados em três grupos para o PT3335 e quatro para o PT3336. Para o PT3335, os grupos em ordem decrescente foram: Grupo I (19,5%) – D5 > Grupo II (11,7 % a 8,8 %) – D10, D216 e D63 > Grupo III (8,3 % a 4,1%) – D16, D29, D15, D198, D206, D85, D88, D184, D106, D170, D118, D58, D95, Controle, D62 e Comercial (Figura 4E). Já para o PT3336, os grupos em ordem decrescente foram: Grupo I (15,6%) – D118 > Grupo II (11,7 % a 10,0 %) – D206, D216 e D63 > Grupo III (8,6 % a 5,8 %) – D198, D88, D106, D29, D95, D184, D170, D62, D58, D16 e D5 > Grupo IV (5,6 % a 2,0 %) – D10, D85, D15, Comercial e Controle (Figura 4F).

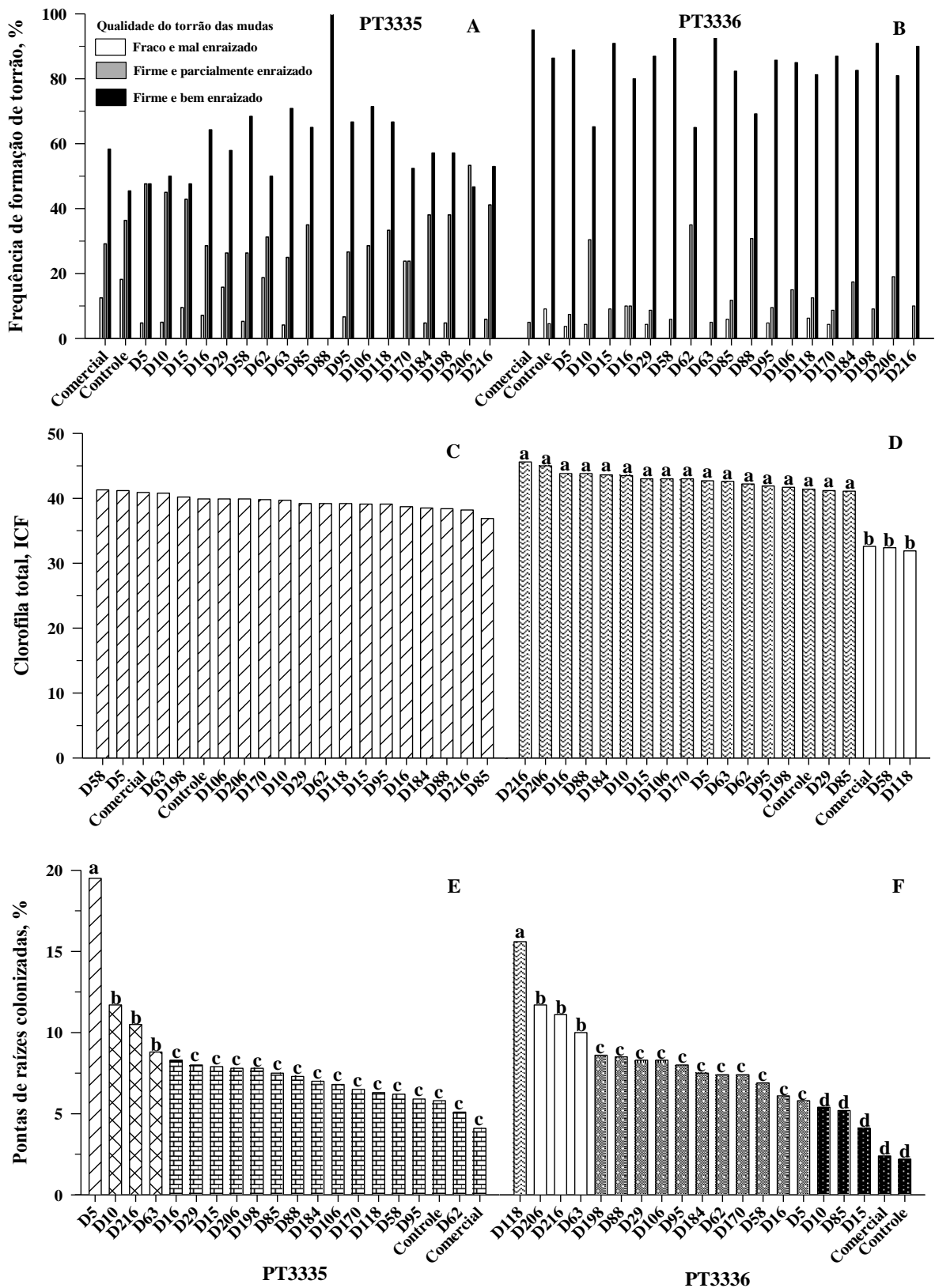


Figura 4 - Frequência das notas para formação de torrão (A e B), teor de clorofila total (C e D) e porcentagem de pontas de raízes colonizadas (E e F) das mudas de clones PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*, inoculados com isolados de *Pisolithus* sp. e não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada no substrato de produção das mudas, aos 100 dias, em viveiro comercial.

Os efeitos dos tratamentos sobre o Índice de Qualidade de Dickson não foram significativos. O IQD foi, em média, 0,31 para o PT3335 e 0,42 para o PT3336, sendo o maior IQD observado nas mudas inoculadas com o isolado D216 (IQD = 0,5).

### 3.2 Teores de nutrientes

Os teores de fósforo das mudas não foram influenciados ( $p > 0,05$ ) pelos isolados e clones testados. Os teores médios encontrados nas mudas foram de  $3,7 \text{ g kg}^{-1}$  para o PT3335 e  $3,8 \text{ g kg}^{-1}$  para o PT3336. Os teores de cálcio, zinco, manganês e cobre não foram influenciados ( $p > 0,05$ ) pelos tratamentos aplicados, sendo em média de  $2,43 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $35,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $167,1 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $13,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Os teores de potássio e magnésio variaram de acordo com o clone, sendo observados que os teores de K para o PT3335 ( $2,66 \text{ g kg}^{-1}$ ) foram maiores que para o PT3336 ( $0,83 \text{ g kg}^{-1}$ ) e, no caso do Mg, os teores no PT3335 ( $0,69 \text{ g kg}^{-1}$ ) foram menores que no PT3336 ( $0,77 \text{ g kg}^{-1}$ ).

Os teores de ferro foram influenciados ( $p \leq 0,05$ ) pelos isolados, e este efeito foi dependente dos clones (Figura 5). No PT3335, os teores de Fe foram iguais para todos os tratamentos, já no PT3336, a inoculação com os isolados D5, D10, D58, D85, D106, D118, D170, D184 e D216 proporcionou maiores teores de Fe nas mudas (Figura 5). Estes teores foram 21 % a 79,3 % maiores do que nas mudas do Comercial e 38,6 % a 110 % maiores do que nas do Controle.

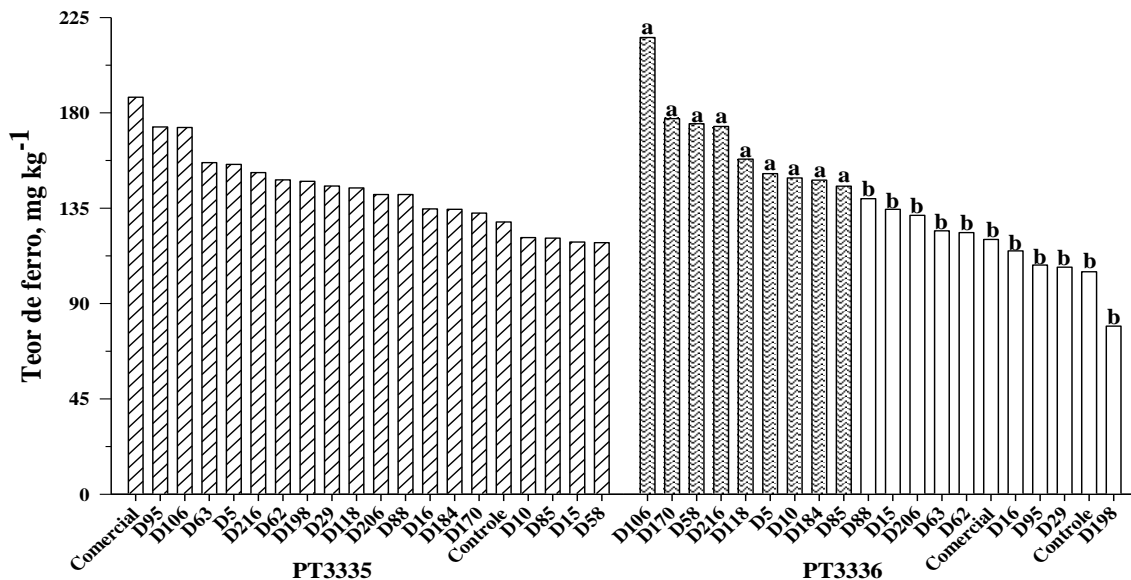


Figura 5- Teor de ferro nas folhas das mudas dos clones PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*, inoculados com isolados de *Pisolithus* sp. e não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada no substrato de produção das mudas em viveiro comercial.



A porcentagem de pontas colonizadas, para o clone PT3335, não foi correlacionada com a sobrevivência, altura e diâmetro das mudas, mas foi diretamente relacionada à MSPA, MSR, MST e inversamente ligada aos teores de P (Tabela 2). No PT3336, a colonização foi correlacionada positivamente com a sobrevivência, MSR, teores de P, Zn e Fe (Tabela 2).

Tabela 2 – Matriz de correlação entre sobrevivência, altura, diâmetro do coleto, massa seca, porcentagem de pontas colonizadas e teores de P, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Fe e Cu para as mudas dos clones PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*, inoculados com isolados de *Pisolithus* sp. e não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada no substrato de produção das mudas em viveiro comercial.

Clone	PT3335									PT3336								
	Pontas colonizadas	Teores								Pontas colonizadas	Teores							
P		K	Ca	Mg	Zn	Mn	Fe	Cu	P		K	Ca	Mg	Zn	Mn	Fe	Cu	
Sobrevivência	0,054	-0,022	-0,108	-0,030	0,026	0,016	-0,060	0,019	-0,109*	0,123*	0,261*	0,089	0,119	0,087	0,038	-0,051	-0,073	0,015
Altura	0,043	-0,322*	-0,095	0,162*	0,163*	-0,180*	-0,230*	-0,328*	-0,077	0,090	-0,250*	-0,142*	-0,017*	-0,113*	-0,264*	-0,168*	-0,165*	0,033
Diâmetro	0,062	-0,407*	-0,035	0,113*	0,111*	-0,137*	-0,116*	-0,318*	-0,139*	-0,060	-0,277*	0,054	-0,043	-0,115*	-0,191*	-0,228*	-0,120*	0,081
MSPA	0,180*	-0,327*	0,003	0,152*	0,090	-0,090	-0,095	-0,240*	-0,072	0,057	-0,242*	-0,128*	0,005*	0,032	-0,319*	-0,146*	-0,164*	0,066
MSR	0,234*	-0,162*	-0,019	0,091	0,133*	-0,147*	0,006	-0,161*	-0,192*	0,118*	-0,130*	0,011	0,124	0,069	-0,033	-0,072	-0,019	-0,079
MST	0,240*	-0,327*	-0,006	0,158*	0,127*	-0,132*	-0,073	-0,257*	-0,136*	0,098	-0,224*	-0,077	0,067	0,057	-0,225*	-0,132*	-0,116*	0,003
Pontas colonizadas		-0,205*	0,014	0,045	-0,027	0,034	0,032	-0,020	-0,051		0,143*	-0,017	-0,161	-0,032	0,176*	0,025	0,249*	0,027
Teores P			0,165*	0,027	0,173*	0,174*	-0,237*	0,072	-0,095			-0,109	0,121	0,261	0,441*	0,096	0,199*	-0,065
Teores K				0,083	0,0178	0,278*	-0,026	0,143*	0,169*				-0,222*	-0,434*	-0,183*	-0,156	-0,043	-0,003
Teores Ca					0,271*	0,033	-0,283*	-0,227*	-0,163*					0,426*	0,214*	0,020*	-0,026	-0,021
Teores Mg						0,089	-0,441*	-0,208*	-0,035						0,381*	0,133*	0,169*	-0,034
Teores Zn							0,074	0,173*	0,023							0,317*	0,458*	-0,003
Teores Mn									0,480*								0,581*	-0,104
Teores Fe																		0,264*

\*significativo a 5 % de probabilidade.

#### 4 DISCUSSÃO

A maior sobrevivência, altura, qualidade de torrões e teores de Fe das mudas inoculadas com alguns isolados de *Pisolithus* sp. do que as do Controle (Tabela 1, Figura 3 a 5) indica que a utilização de fungos ectomicorrízicos selecionados na produção de mudas clonais de eucalipto poderá trazer benefícios significativos para o setor, fato já observado por também por outros autores (FONSECA, 2013; COSTA *et al.*, 2016). Por exemplo, o dobro da sobrevivência das mini-estacas observado nas mudas do P3335 inoculadas com o D29, D63 e D216 (Tabela 1) em comparação com as do Controle pode resultar na redução de custos e, ou aumento da produtividade em viveiros comerciais. Os efeitos provocados pela inoculação foram dependentes do clone e do isolado, como exemplo: o aumento proporcionado na sobrevivência das mudas pelo D29 foi de 99,8 % para o PT3335 em relação ao aumento de 35,3 % do PT3336; a inoculação com D216 aumentou em 10 % a altura das mudas do PT3335 e reduziu em 12 % nas do PT3336, quando comparadas às mudas do Controle. Isto indica que se a capacidade de responder a simbiose micorrízica fosse uma característica considerada nos programas de melhoramento, isto maximizaria a obtenção de ganhos com a inoculação. Se a resposta à associação já fosse confirmada, a diferença de MSPA encontrada no clone PT3335 de 52 % entre as mudas inoculadas com o D216 em relação às do Controle, não significativa no presente trabalho, poderia ser ainda maior e provavelmente significativa. Desta forma, a escolha de isolados de FEM que sejam eficientes juntamente com a seleção de clones mais responsivos a simbiose poderá tornar o cultivo do eucalipto menos dependente da adubação fosfatada e, portanto, mais sustentável. No entanto, ainda se fazem necessários outros estudos para que se avalie o desempenho de mudas inoculadas no campo.

A capacidade diferenciada dos isolados de *Pisolithus* sp. de colonizarem e fornecer benefícios às plantas, como por exemplo, maior sobrevivência, altura, massa seca e enraizamento das mudas (Tabela 1, Figuras 3, 4: A, B, C e D) destaca a importância da seleção também de isolados mais eficientes. Esta seleção poderá também aumentar os benefícios em relação aos observados no presente trabalho, de forma que a obtenção de isolados capazes de manter estas características em diferentes regiões, tipos de solo e diferentes clones é muito desejável, pois, caso contrário, haverá a necessidade do mercado disponibilizar diferentes inoculantes.

As maiores alturas, MSPA e teores de clorofila (Tabela 1; Figuras 3: A e B; 4: C e D) das mudas do Controle, não inoculadas e crescidas em substrato com redução da adubação fosfatada, em relação às do Comercial indicam que a adubação fosfatada utilizada no último foi muito elevada. Ainda assim, todas as mudas apresentaram, aos 90 dias, altura (Tabela 1) e

diâmetro dentro da faixa recomendada para o plantio – altura entre 20 a 35 cm (ALFENAS *et al.*, 2004) e diâmetro > 2 mm (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A maior capacidade do PT3335 em formar micorriza e obter benefícios da associação em relação ao PT3336 e a ocorrência de porcentagem de pontas de raízes colonizadas diferentes nos dois clones para um mesmo isolado (Figura 4: E e F) indicam a existência de especificidade entre os clones de eucalipto e os isolados de *Pisolithus*. Isto foi observado, por exemplo, para o D5, que proporcionou maior colonização no PT3335 e o D118, que foi o que mais colonizou o PT3336. Ainda, pôde-se perceber que as mini-estacas dos dois clones inoculadas com D63 e D216 estavam também entre as mais colonizadas, demonstrando esta diferenciação, sendo que estes dois últimos isolados foram aqueles que mais beneficiaram as mudas (Tabela 1, Figuras 3 a 5). Por este fato, percebe-se que é possível obter isolados com menor especificidade em nível de clone e ainda benéficos ao enraizamento e crescimento das mudas no viveiro. Desta forma, estes isolados facilitarão a utilização desta biotecnologia, pois tornará mais barata a produção e comercialização de inoculantes.

A partir da análise de correlação foi possível perceber que a colonização ectomicorrízica influenciou características diferentes nos dois clones. Para o PT3335, a porcentagem de pontas de raízes colonizadas correlacionou-se positivamente com a produção de MSPA, MSR e MST, enquanto para o PT3336 a colonização correlacionou-se positivamente com a sobrevivência e a MSR (Tabela 2). Porém, nem sempre a maior colonização das mudas resultou em maiores benefícios, como observado para os isolados D10 e D118. A capacidade diferenciada de formação de ectomicorrizas entre clones também foi observada em trabalhos com metais pesados com clones de *Betula pendula* e *Betula pubescens* de diferentes procedências propagadas *in vitro* (DENNY; WILKINS, 1987). A inoculação de 13 isolados de *Pisolithus* sp. também proporcionou colonização diferenciada em *E. grandis* e *E. urophylla*, sendo que alguns isolados colonizaram as duas espécies, outros apenas uma e alguns apresentaram baixa colonização em ambas (PEREIRA *et al.*, 2005).

A porcentagem de pontas de raízes colonizadas nos clones (Figura 4E e F) encontra-se dentro da faixa de médias (6,7 % a 63,6 %) observadas em substratos com baixos teores de P (ALVES *et al.*, 2001; CHEN; KANG; DELL, 2006; SILVA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008). Ainda assim, considerando essa faixa, as porcentagens de pontas colonizadas podem ser consideradas baixas, mesmo tendo proporcionado benefícios como demonstrado (Tabela 1 e Figuras 2 a 5). Isto mostra a importância de novas pesquisas que selecionem isolados e determine adubações e manejos das mudas no viveiro que permitam a obtenção de

maiores taxas de colonização e se possível maiores benefícios na fase de viveiro. Além disso, é possível que mudas com maior porcentagem de pontas colonizadas por fungos eficientes na promoção da sobrevivência e crescimento possam obter maiores benefícios no campo após o plantio, pois naquela condição a permanência do isolado selecionado por mais tempo nas raízes das plantas, sob competição com outros fungos ectomicorrízicos, poderá ser determinante para a obtenção de benefícios no campo.

A ocorrência de raízes colonizadas nas plantas não inoculadas (Controle e Comercial) pode ter sido resultado da presença de esporos de FEM na água de irrigação ou trazidos pelo vento, pois o viveiro é localizado próximo à área de plantio comercial de eucalipto. Neste trabalho, o substrato de produção de mudas não foi esterilizado e a água de irrigação não foi destilada, condições estas diferentes da maioria dos trabalhos com FEM em que os experimentos foram desenvolvidos em casas de vegetação e recebiam água deionizada ou destilada (ALVES *et al.*, 2001; SOUZA; SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004), o que pode justificar a presença de colonização mesmo nos tratamentos não inoculados.

O IQD é mencionado como uma medida morfológica integrada (JOHNSON; CLINE, 1991) e como bom indicador da qualidade de mudas, por considerar no cálculo a robustez e o equilíbrio da distribuição da biomassa, sendo ponderadas várias variáveis importantes (FONSECA, 2000). Contudo, a colonização ectomicorrízica não é considerada e no presente trabalho o IQD não foi capaz de detectar as diferenças observadas em características individuais entre as mudas nos diferentes tratamentos e, segundo o índice, todas as mudas estavam apropriadas para o transplante, apesar das perceptíveis diferenças observadas no crescimento destas.

Os teores médios de P e Fe nas mudas dos clones foram maiores que a média considerada ideal para o crescimento de mudas de eucalipto (1,5 a 2,0 g kg<sup>-1</sup> para P e 80 a 130 mg kg<sup>-1</sup> para Fe – SILVEIRA *et al.*, 2001). Estes maiores teores de P indicam que as plantas absorveram sua capacidade máxima permitida pela fisiologia dela. Isto confirma que a adubação fosfatada de substrato foi elevada e pode explicar a ausência de efeito desta nos teores de P na parte aérea das mudas. É importante ressaltar que as mudas inoculadas e do Controle receberam adubação fosfatada aproximadamente 33 vezes menor que a do Comercial.

Os teores médios de Zn e Cu estavam dentro da faixa considerada adequada (Zn = 30 a 40 mg kg<sup>-1</sup>; Cu = 10 a 15 mg kg<sup>-1</sup>), enquanto os de K, Ca, Mg e Mn estavam abaixo do considerado ideal (K = 15 a 20 g kg<sup>-1</sup>; Ca = 8 a 12 g kg<sup>-1</sup>; Mg = 3 a 3,5 g kg<sup>-1</sup>; Mn = 300 a 500

mg kg<sup>-1</sup>) (SILVEIRA *et al.*, 2001). Porém, as mudas apresentaram crescimento satisfatório e a ausência de efeito de clone e inoculação não contribuem para explicar os resultados obtidos no presente trabalho.

Os baixos teores de Mn em relação a faixa considerada ótima pode ser devido à fertirrigação com Ferrilene<sup>®</sup> que promoveu teores de Fe maiores do que a faixa recomendada e pode ter competido com sítios de absorção e transporte de Mn (FAQUIN, 2005).

Numa visão geral, os isolados de *Pisolithus* que mais se destacaram foram: D216 = D63 > D5 = D118. Sendo que, em relação às mudas do Controle, os dois primeiros isolados promoveram benefícios para MSPA (apesar de não significativo) e colonização dos dois clones; sobrevivência (maior destaque no PT3335) e qualidade de torrões no PT3336 (Tabela 1 e Figuras 3, 4: A, B, E e F). Além desses benefícios o D63 também contribuiu para altura das mudas dos dois clones (Tabela 1) e para qualidade de torrões no PT3335 (Figura 4: A e B). Já o D216 também contribuiu para a altura (Tabela 1) e teores de Fe das mudas do PT3335 (Figura 5) e teores de clorofila no PT3336 (Figura 4D). Já os isolados D5 e D118 promoveram benefícios para sobrevivência, altura e teores de Fe nos dois clones. Além desses benefícios esses isolados também contribuíram para qualidade de torrões e colonização porém em clones distintos (Figura 4: A, B, E e F).

Finalmente, é importante se utilizar, em viveiro, clones e níveis de fertilização que sejam compatíveis com a produção de mudas colonizadas e com crescimento semelhante ao obtido com os níveis de fertilizações usados atualmente.

## 5 CONCLUSÕES

A inoculação com isolados de *Pisolithus* sp. aumenta o crescimento de mudas de eucalipto em viveiro comercial, porém isto é dependente do clone e do isolado utilizados.

A escolha de isolados de FEM que sejam eficientes juntamente com a seleção de clones mais responsivos a simbiose poderá tornar o cultivo do eucalipto menos dependente da adubação fosfatada e, portanto, mais sustentável.

Os isolados D63 e D216 são os mais promissores para utilização em programas de inoculação em viveiro comercial, pois promoveram a sobrevivência, massa seca, colonização e qualidade de torrões das mudas de eucalipto.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELEKE, R.A. *et al.* Mobilisation of potassium and phosphorus from iron ore by ectomycorrhizal fungi. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.26, p.1901-13, 2010.

ALFENAS, A.C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442p.

ALVES, J.R. *et al.* 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.

ANDREAZZA, R. *et al.* Ectomicorrizas em grápia [*Apuleia leiocarpa* (vogel) j.f. macbride] e canafístula [*Peltophorum dubium* (sprengel) taubert] *in vitro*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.21, n.4, p.727-734, 2011.

BACCHI, L.M.A; KRUGNER T.L. Desenvolvimento ectomicorrízico em mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* em um viveiro comercial. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v.40, p.21-25, 1988.

BARROS, N.F.; BRANDI, R.M.; REIS, M.S. Micorriza em eucalipto. **Revista Árvore**, v.2, p.130-140, 1978.

BRUNDRETT, M. *et al.* **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**, Camberra: ACIAR, 1996, 374p.

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

BUWALDA, J.G.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B. The development of endomycorrhizal root systems. V. The detailed pattern of development of infection and the control of infection level by host in young leek plant, **New phytologist**, v.96, p.411-427, 1984.

CAMPOS, D.T.S. *et al.* Colonização micorrízicas em plantios de eucalipto. **Revista Árvore**, v.35, n.5, p.965-974, 2011.

CANTON, G.C. *et al.* Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. **Mycorrhiza**, v.26, p.1-13, 2016.

CHEN, Y.L.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Effect of *Scleroderma* spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* seedlings. **New Forests**, Dordrecht, v.31, n.3. p.453-467, 2006.

CHEN, Y.L.; KANG, L.H.; DELL, B. Inoculation of *Eucalyptus urophylla* with spores of *Scleroderma* in a nursery in south China: comparison of field soil and potting mix. **Forest Ecology and Management**, Oxford, n.222, p.439-449, 2006.

COSTA, L.S. *et al.* Inoculação de micélio vegetativo de fungos ectomicorrízicos impregnados em gel de alginato em viveiro comercial de estacas enraizadas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, no prelo, 2016.

DENNY, H.J.; WILKINS, D.A. Zinc tolerance in *Betula* spp.. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. **The New Phytologist**, Oxford, v.106, n.3, p. 535-544, 1987.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, v.36, p.10- 13, 1960.

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

DI PIETRO, M.; CHURIN, J.L.; GARBAYE, J. Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. **Mycorrhiza**, v.17, p.547-550, 2007.

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, p.921-932, 2002.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 186p.

FONSECA, A.J. **Seleção de isolados de *Pisolithus* para mudas clonais de eucalipto em viveiro comercial**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, MG, 2013.

FONSECA, E.P. **Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume. *Cedrela fissilis* Veli. e *Aspidosperma polyneuron* Müll Arg. produzidas sob diferentes períodos de sombreamento**. 2000. 113 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP. 2000.

GANDINI, A.M.M. *et al.* Growth and nutrition of eucalypt rooted cuttings promoted by ectomycorrhizal fungi in commercial nurseries. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.1554-1565, 2015.

GARBAYE, J. Utilization des mycorhizes en sylviculture. In: STRULLU, D.G. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. **Lavoisier**, p.197-250, 1990.

GARBAYE, J. Premiers resultats de recherche sur la competitivite des champignons ectomycorhiziens. **Plant and Soil**, v.71, p. 303-308. 1983.

GLOWA, K.R.; AROCENA, J.M.; MASSICOTTE, H.B. Extraction of potassium and/or magnesium from selected soil minerals by *Piloderma*. **Geomicrobiology Journal**, v.20, p.99-111, 2003.

GOMES, J. M. *et al.* Efeito de diferentes substratos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, em “Win- Strip”. **Revista Árvore**, v.15, n.1, p.35-42, 1991.

GOMES, J.M. *et al.* Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.26, p.655-664, 2002.

HOBBIE, E.A.; AGERER, R. Nitrogen isotopes in ectomycorrhizal sporocarps correspond to belowground exploration types **Plant Soil**, v.327, p.71-83, 2010.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório IBÁ 2015: ano base 2014. Brasília: IBÁ, 2015. 60p.



JOHNSON, J.D.; CLINE, M.L. Seedling quality of southern pines. In: DURYEYEA, M.L.; DOUGHERTY, P.M. Forest regeneration manual. **Klumer Academic**, Netherlands, p.143-162, 1991.

LAST, F.T.; MASON, P.A.; WILSON, J. Controlled inoculation of sitka spruce with sheathing (ecto-) mycorrhizal fungi: a commercial experience in 1982. **Scottish Forestry**, Edinburgh, v.38, n.2, p.75-77, 1984.

LU, X.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v.8, p.81-86, 1998.

MALAVOLTA, E; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319p.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine root to pathogenic infections and antagonism of mycorrhizal to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopatology**, Saint Paul, v.59, p.153-163, 1969.

MARX, D.H. Ectomycorrhizal fungus inoculation: a tool for improving forest practices. In: Mikola, P. (ed.), **Ectomycorrhiza Research**, Oxford: Clarendon Press, p.13-71, 1980.

MARX, D.H.; CORDELL, C.E. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: WHIPPS, J.M.; LUMSDEN, R.D. (Ed.). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. New York: Cambridge University Press, p.1-25, 1989.

MARX, D.H; HATCH, A.B.; MENDICINO, J.F. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Botany**, v.50, p.1569-1974, 1977.

MOLINA, R. Mycorrhizal inoculation and its potential impact on seedlings survival and growth in Southwest Oregon. In: HOBBS, S.D. & HELGERSON, O.T. eds. **Reforestation of skeletal soils: Proceedings of a workshop**. Corvallis, OR, Oregon State University, p.86-91, 1981.

MOSSE, B.; STRIBLEY, D.P.; Le TACON, F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. IN: ALEXANDRE, M. ed. **Advance in Microbial Ecology**. New York, Plenum Press, p.137-210, 1981.

NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizae. **Trends in Ecology & Evolution**, v.10, n.10, p.407-411, 1995.

PEREIRA, O.L. *et al.* Compatibility and ectomycorrhiza formation among *Pisolithus* isolates and *Eucalyptus* spp. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.29, p.337-344, 2005.

POTAFÓS. **Manual internacional de fertilidade do solo**. Associação Brasileira para Pesquisada Potassa e do Fosfato. 2.ed. Piracicaba: 1998, 177p.

RINCÓN, A.; ALVAREZ, I.F.; PERA, J. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v.11, p.265-271, 2001.

ROSSI, M.J.; FURIGO, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; Inoculant Production of Ectomycorrhizal Fungi by Solid and Submerged Fermentations. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v.45, n.3, p.277-286, 2007.

SAWYER, N.A.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.151-158, 2003.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, v. 116, p. 447-453, 1998.

SCHADCHINA, T.M. & DMITRIEVA, V.V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, p.1427-1437, 1995.

SILVA, R.F.; ANTONIOLLI, Z.I. ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria v.13, n.1, p.33-42, 2003

SILVA, M.A. *et al.* Formação de ectomicorrizas por monocários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.917-929, 2007.

SILVEIRA, R.L.V.A. *et al.* **Seja o doutor do seu eucalipto**. Piracicaba, Potafós, 2001. 23p.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3 ed. London: Academic Press and Elsevier, 2008. 800p.

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

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

SOUZA, L.A. *et al.* New isolates of ectomycorrhizal fungi and the growth of eucalypt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.2, p.235-241, 2008.

SOUZA, E.L. *et al.* Efeito da inoculação com isolados de fungos ctomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* hill ex Maiden. **Ciência Florestal**, v.22, n.2, p.251-261, 2012.

SUN, Y. *et al.* Effects of ectomycorrhizal colonization and nitrogen fertilization on morphology of root tips in a *Larix gmelinii* plantation in northeastern China. **Ecological Research**, v.25, p.296-302, 2010.

THOMSON, B.D. *et al.* The survival and development of inoculant ectomycorrhizal fungi on roots of outplanted *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant and Soil**, Netherlands, v.178, p.247-253, 1996.

TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annual Review of Phytopathology**, **15**, p.203-222, 1977.

TURJAMAN, M. *et al.* Ectomychorrhizal fungi promote growth of *Shorea balangeran* in degraded peat swamp forests. **Wetlands Ecol Manage**, v.19, p.331-339, 2011.

VIEIRA, R.F.; PERES, J.R.R. Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do solo**. v.12, p.231-235, 1988.

VOZZO, J.A.; HACKSKAYLO, E. Inoculation of *Pinus caribea* with ectomicorrhizal fungi in Puerto Rico. **Forests Science**, v.17, p.239-241, 1971.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Propagação clonal pela estaquia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272p.

WILCOX, H.E. Mycorrhizal associations. In: NAKAS, J.P.; HAGEDORN, C. (Ed.). **Biotechnology of plant-microbe interactions**. New York: McGraw-Hill, 1990. p.227-255.

**APÊNDICE A** - Quadrado médio e significância, obtidos na análise de variância dos dados coletados nas avaliações de altura, diâmetro do coleto, sobrevivência, massa seca, teores de clorofila a, b e total, índice de qualidade de Dickson, pontas de raiz colonizadas, teores e conteúdos de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, manganês, ferro e cobre.

Variáveis	Fontes de Variação			CV (%)
	Clone (C)	Fungo (F)	C x F	
	----- 60 dias -----			
Altura	318,7813*	13,5808*	4,4702	10,81
Diâmetro do coleto	0,0925	0,0666	0,0867	11,00
	----- 90 dias -----			
Sobrevivência	6990,3488*	716,8397*	506,7079	22,60
Altura	771,0664*	21,2665*	8,1394	9,35
Diâmetro do coleto	2,0000*	0,1645	0,0864	10,59
Clorofila a	98,8418*	17,5176	24,2894	13,36
Clorofila b	7,3728	3,6126	5,7395*	15,63
Clorofila total	157,7088*	35,9649	52,3270*	13,58
	----- 100 dias -----			
Massa seca da parte aérea (MSPA)	0,0200	0,9479*	0,5586*	20,63
Massa seca das raízes (MSR)	3,2513*	0,1975	0,2441	37,56
Massa seca total (MST)	4,0328*	1,6477*	1,1821*	20,98
Relação raiz/parte aérea	0,3281*	0,0365	0,0281	41,29
Pontas de raízes colonizadas	0,5202*	0,0239	0,0216	33,87
Índice de qualidade de Dickson (IQD)	8,6528*	50,5423	50,2590	32,14
Teor de fósforo	0,4232	0,2402	0,3040	13,16
Conteúdo de fósforo	8,9465	10,4865*	6,4903	21,84
Teor de potássio	166,3878*	0,2604	0,3392	27,20
Conteúdo de potássio	1257,1121*	9,2229*	4,7242*	27,70
Teor de cálcio	0,0084	0,3492	0,2909	28,83
Conteúdo de cálcio	1,3099	8,4103	5,1412	35,29
Teor de magnésio	0,2644*	0,0361	0,0274	27,70
Conteúdo de magnésio	2,4917*	0,8661*	0,5689	33,67
Teor de zinco	45,4808	69,7702	73,9927	31,81
Conteúdo de zinco	0,0006	0,0018	0,0010	37,94
Teor de manganês	244,5729	1186,8334	1466,1162	20,38
Conteúdo de manganês	0,0001	0,0362*	0,0313*	27,77
Teor de ferro	1126,9791	3227,0372	3496,8500*	31,36
Conteúdo de ferro	0,0013	0,0511*	0,0251	34,91
Teor de cobre	1103,5099	788,8598	834,0377	220,08
Conteúdo de cobre	0,0002	0,0003*	0,0003*	44,07

\*Significativo a 5 % de probabilidade. CV – Coeficiente de variação.

**APÊNDICE B** – Conteúdos de fósforo, magnésio e ferro na parte aérea das mudas dos clones PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*, inoculados com isolados de *Pisolithus* sp. e não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada no substrato de produção das mudas em viveiro comercial.

Tratamentos	Conteúdo de P			Conteúdo de Mg			Conteúdo de Fe		
	PT3335	PT3336	Média	PT3335	PT3336	Média	PT3335	PT3336	Média
-----mg planta <sup>-1</sup> -----									
Comercial	6,2	10,1	8,1b <sup>1</sup>	0,99	1,75	1,37	0,29	0,30	0,29b
Controle	9,4	10,2	9,8b	1,25	2,04	1,65	0,30	0,31	0,31b
D5	9,3	9,8	9,5b	1,80	2,27	2,03	0,43	0,41	0,42a
D10	9,7	9,4	9,6b	2,05	1,98	2,01	0,33	0,36	0,35b
D15	9,5	10,9	10,2b	2,03	2,54	2,28	0,33	0,41	0,37b
D16	9,6	7,2	8,4b	1,89	1,22	1,55	0,34	0,19	0,27b
D29	9,6	10,5	10,0b	1,72	2,65	2,19	0,34	0,31	0,33b
D58	10,7	9,0	9,9b	2,15	1,88	2,02	0,34	0,47	0,41a
D62	9,1	11,0	10,1b	1,86	2,17	2,02	0,40	0,33	0,37b
D63	10,7	12,2	11,5a	1,97	2,07	2,02	0,49	0,42	0,45a
D85	10,2	11,1	10,6b	1,93	2,34	2,13	0,36	0,47	0,41a
D88	8,3	10,7	9,5b	1,40	2,57	1,99	0,30	0,40	0,35b
D95	9,8	9,9	9,8b	1,97	1,79	1,88	0,44	0,32	0,38b
D106	10,7	8,7	9,7b	1,98	1,82	1,90	0,50	0,47	0,49a
D118	10,6	9,5	10,0b	1,73	1,81	1,77	0,44	0,37	0,40a
D170	9,9	11,3	10,6b	1,89	2,20	2,04	0,33	0,56	0,44a
D184	9,4	8,9	9,1b	2,09	1,50	1,79	0,36	0,33	0,34b
D198	9,6	9,7	9,7b	1,63	1,78	1,71	0,39	0,21	0,30b
D206	9,2	11,2	10,2b	1,99	2,18	2,09	0,37	0,36	0,37b
D216	13,6	12,5	13,1a	2,66	2,90	2,78	0,58	0,54	0,56a
Média	9,8	10,2	10,0	1,85B <sup>1</sup>	2,07A	1,96	0,38	0,38	0,38

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade e médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste t ao nível de 5 % de significância.

**APÊNDICE C** - Conteúdo de potássio (A e B), manganês (C e D) e cobre (E e F) nas folhas das mudas dos clones PT3335 e PT3336, híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*, inoculados com isolados de *Pisolithus* sp. e não inoculados com (Controle) e sem (Comercial) redução da adubação fosfatada no substrato de produção das mudas em viveiro comercial.

