

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS POR MONOCÁRIOS E DICÁRIOS DE *Pisolithus* sp. E INTERAÇÕES NUTRICIONAIS EM *Eucalyptus grandis*⁽¹⁾

Marcelo Alexandre Silva⁽²⁾, Maurício Dutra Costa⁽³⁾, Rodrigo Barros Rocha⁽⁴⁾ & Arnaldo Chaer Borges⁽⁵⁾

RESUMO

A germinação de basidiósporos de *Pisolithus* spp. dá origem a monocários, caracterizados por possuírem um único núcleo haplóide por célula. No campo, o eucalipto associa-se a micélios dicarióticos de *Pisolithus* spp., não havendo relatos sobre a capacidade dos monocários em estabelecer a associação ectomicorrízica com a planta hospedeira nessas condições. Embora os monocários de *Pisolithus* sp. sejam capazes de formar a associação ectomicorrízica *in vitro*, nada se sabe sobre a capacidade dessas estirpes em promover a absorção de nutrientes e o crescimento do eucalipto. O objetivo deste trabalho foi estudar a formação de ectomicorrizas por isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp. em *Eucalyptus grandis*, sob condições de casa de vegetação, bem como investigar as relações entre o estabelecimento da associação e o crescimento e a absorção de P, Ca, Mg, K, Cu e Zn pelas plantas. Caracterizou-se, também, a produção de massa seca micelial e a absorção de nutrientes pelos isolados fúngicos *in vitro*. Os isolados monocarióticos e dicarióticos testados variaram na produção de massa seca micelial e na capacidade de absorção de nutrientes. Em geral, os monocários apresentaram maiores índices de eficiência de utilização de nutrientes do que os dicários. Todos os isolados monocarióticos e dicarióticos formaram ectomicorrizas típicas quando associados com *E. grandis*. A presença dos isolados fúngicos monocarióticos associados às raízes laterais resultou em aumento do diâmetro radial das células da epiderme radicular, característico das ectomicorrizas de eucalipto, indicando que os monocários, à semelhança dos dicários, são capazes de produzir reguladores de crescimento. As médias de percentagem de colonização das raízes pelos isolados monocarióticos e dicarióticos variaram de 12 a 76 %. A absorção de Ca, Mg e K foi estimulada de forma expressiva pela presença das ectomicorrizas, com aumentos de até 760 vezes, demonstrando a relevância dessa associação no suprimento desses macronutrientes, especialmente o Ca. Alguns isolados monocarióticos são tão eficientes quanto os dicários na colonização radicular e na absorção de nutrientes. A caracterização dos monocários de *Pisolithus* sp. é necessária para se estabelecer a seleção e o cruzamento dos isolados com características desejáveis, visando ao

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor. Recebido para publicação em março de 2006 e aprovado em junho de 2007.

⁽²⁾ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa – UFV. CEP 36570-000 Viçosa (MG). Bolsista do CNPq. E-mail: m_alexandresilva@yahoo.com.br

⁽³⁾ Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia, UFV. CEP 36570-000 Viçosa (MG). E-mail: mdcosta@ufv.br

⁽⁴⁾ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, UFV. E-mail: rbrgenetica@yahoo.com.br

⁽⁵⁾ Professor Titular do Departamento de Microbiologia, UFV. E-mail: chaer@ufv.br

melhoramento genético e à maior eficiência da associação simbiótica. Este trabalho constitui o primeiro relato das interações nutricionais entre monócários de *Pisolithus* sp. e a planta hospedeira.

Termos de indexação: macronutrientes, micronutrientes, compatibilidade, nutrição vegetal.

SUMMARY: FORMATION OF ECTOMYCORRHIZAE BY MONOKARYONS AND DIKARYONS OF *Pisolithus* sp. AND NUTRITIONAL INTERACTIONS IN *Eucalyptus grandis*

*The germination of *Pisolithus* spp. basidiospores originates monokaryons, characterized by having a single haploid nucleus per cell. In the field, eucalypts are associated with dikaryons of *Pisolithus* spp., there being no reports on the capacity of monokaryons to establish the ectomycorrhizal association with the host plant under such conditions. Although *Pisolithus* spp. monokaryons have been shown to form ectomycorrhizas in vitro, there is no information on the ability of these strains to promote nutrient uptake and growth of eucalypts. The objective of this study was to investigate the formation of ectomycorrhizae by monokaryotic and dikaryotic isolates of *Pisolithus* sp. in *Eucalyptus grandis* under greenhouse conditions, and the relationships between the establishment of ectomycorrhizae and the host plant growth and uptake of P, Ca, Mg, K, Cu, and Zn. The fungal isolates were highly variable in dry mycelial mass production and in their ability to take up macro- and micronutrients. Generally, the nutrient use efficiency of monokaryons was higher than that of dikaryons. All tested monokaryotic and dikaryotic isolates were able to form typical ectomycorrhizae when associated with *E. grandis*. The presence of monokaryotic isolates associated with the lateral roots of *E. grandis* resulted in typical increases in the radial diameter of the root epidermal cells, characteristic of eucalypt ectomycorrhizae, indicating that monokaryons, similarly to dikaryons, are capable of producing growth regulator compounds. The mean root colonization percentage of the monokaryotic and dikaryotic isolates varied from 12 to 76 %. The Ca, K, and Mg uptake was highly stimulated by the presence of ectomycorrhizae, with up to 760-fold increases, suggesting that the association must play a significant role in supplying the host with these nutrients, especially Ca. Some monokaryotic isolates are as efficient as the dikaryons at promoting root colonization and nutrient uptake. The characterization of *Pisolithus* sp. monokaryons is a basic requirement for the selection and crossing of isolates with desirable traits, aiming at the genetic improvement of fungal strains and a higher efficiency of the ectomycorrhizal association. This is the first report on the nutritional interactions between *Pisolithus* sp. monokaryons and the host plant.*

Index terms: macronutrients, micronutrients, compatibility, plant nutrition.

INTRODUÇÃO

Os solos brasileiros apresentam, geralmente, limitações ao estabelecimento e ao crescimento das plantações, como baixa fertilidade, elevada acidez, baixa capacidade de troca catiônica, entre outros atributos. O alto requerimento de nutrientes pelo eucalipto, associado a essas características do solo, torna a fertilização uma técnica fundamental para sustentabilidade das florestas (Barros & Novais, 1996; Pampolina et al., 2002; Xu et al., 2002). A absorção de nutrientes pode alcançar valores (kg ha^{-1}) de até cerca de 1.200 para Ca, 1.000 para N e 700 para K, dependendo da espécie, da taxa de crescimento e da qualidade do sítio (Attiwill & Adams, 1996).

Em florestas plantadas, o P é usualmente o elemento limitante ao crescimento, especialmente na fase inicial, provavelmente por sua baixa mobilidade

no solo e alta adsorção aos oxi-hidróxidos de Fe e de Al (Barros & Novais, 1990, 1996; Bã et al., 1999; Xu et al., 2002). As respostas do eucalipto à aplicação de fertilizantes à base de P e de K têm sido bem mais acentuadas (Prezotti et al., 1988; Barros & Novais, 1990; Faria et al., 2002) do que as obtidas pelo emprego do N e do Ca. A resposta à aplicação de Ca ainda permanece sem completo entendimento, mas supõe-se que pode estar ligada à decomposição de resíduos florestais (Attiwill & Adams, 1996).

Os microrganismos do solo possuem papel primordial na decomposição e ciclagem de nutrientes contidos nos resíduos florestais. Dentre estes, os fungos ectomicorrízicos, quando associados ao sistema radicular, beneficiam as plantas, principalmente quando estas crescem em solos de baixa fertilidade (Harley & Smith, 1983). O fungo possibilita o aumento do volume de solo explorado pelas raízes e, conseqüente-

mente, das quantidades de nutrientes e de água absorvidos, contribuindo para sustentabilidade de florestas plantadas (Cairney & Chambers, 1997; Smith & Read, 1997).

As ectomicorrizas contribuem efetivamente para absorção de Ca, K, Mg e micronutrientes pela planta hospedeira em razão do menor diâmetro das hifas, as quais podem explorar pequenos poros inacessíveis às raízes (Wallander et al., 2002).

Vários aspectos da simbiose têm sido estudados, sobretudo aqueles relacionados à absorção de nutrientes pouco móveis no solo, como o P e o Zn (Bä et al., 1999; Xu et al., 2002). Trabalhos sobre a absorção de P pelas ectomicorrizas demonstram que a maior exploração do solo pelo micélio extra-radicular, juntamente com a excreção de ácidos orgânicos e enzimas, melhora a nutrição das plantas (Wallander, 2000a; Landeweert et al., 2001).

A solubilização de minerais, como o feldspato e a biotita, realizada por fungos ectomicorrízicos, por meio da exsudação de ácidos orgânicos ou pela acidificação do pH da rizosfera, pode disponibilizar Ca, Mg e K para a planta (Jentschke et al., 2000; Wallander, 2000b). Ashford et al. (1999) encontraram altos teores de P e K nos vacúolos das células fúngicas e na rede de Hartig, confirmando o alto fluxo de nutrientes entre os simbiontes. A superfície das hifas fúngicas e os rizomorfos contêm quantidades expressivas de Ca e K, sobretudo na forma de cristais de oxalato (Malajczuk & Cromack, 1982; Costa, 2002). A excreção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido oxálico, capaz de solubilizar minerais primários, demonstra que os fungos ectomicorrízicos podem ter papel importante na pedogênese e, assim, contribuir para disponibilização desses nutrientes de fontes inorgânicas (Wallander, 2000b; Wallander et al., 2002; Hagerberg, 2003).

Os fungos ectomicorrízicos pertencem a distintas famílias dos filos Basidiomycota e Ascomycota e são, portanto, um grupo polifilético (Brundrett, 2002). Predominam geralmente em espécies arbóreas, como as das famílias Fagaceae, Pinaceae e Myrtaceae, e variam em compatibilidade e eficiência, dependendo das espécies simbiontes e das condições ambientais.

O filo Basidiomycota apresenta duas fases distintas no ciclo de vida. A primeira inicia-se com a germinação do basidiósporo, formando o micélio monocariótico, o qual possui apenas um núcleo por célula (Kope & Fortin, 1990; Costa, 2002). A segunda fase é caracterizada pelos eventos morfogênicos, que originam o micélio dicariótico, que possui dois núcleos por célula (Kope & Fortin, 1990; Sales, 2001; Costa, 2002). Em ambientes naturais, o fungo basidiomiceto *Pisolithus* spp., associado ao eucalipto, apresenta-se na fase dicariótica; na literatura consultada não há relatos da interação das plantas com monocários nos sítios de plantio. A formação de ectomicorrizas por monocários de *Pisolithus* sp. em associação com eucalipto já foi obtida em síntese *in vitro*, porém sem

considerações sobre a absorção de nutrientes pelas plantas colonizadas (Costa, 2002).

A elucidação da formação de ectomicorrizas por isolados monocarióticos de *Pisolithus* sp. e suas interações com *Eucalyptus* contribuirá para seleção de monocários eficientes, os quais poderão ser cruzados, visando à produção de dicários híbridos com maior eficiência simbiótica. O objetivo deste trabalho foi estudar a formação de ectomicorrizas por isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp. em *Eucalyptus grandis*, sob condições de casa de vegetação, bem como investigar as relações entre o estabelecimento da associação e o crescimento e a absorção de P, Ca, Mg, K, Cu e Zn pelas plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com seis isolados monocarióticos (35, 94, 147, 248, M5 e M11) e quatro isolados dicarióticos (H4111, M5M11, PT90A e RV82) de *Pisolithus* sp. pertencentes à coleção de fungos ectomicorrízicos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, MG. Os isolados M5, M11 e M5M11 são doações oriundas da coleção de culturas fúngicas da Universidade Federal de Lavras, MG. As sementes de *E. grandis* foram obtidas do setor de Silvicultura do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri, contendo meio de cultura Melin-Norkrans modificado (MNM) (Marx, 1969), à temperatura de 25 °C, por 30 dias.

Crescimento e absorção de nutrientes por monocários e dicários de *Pisolithus* sp.

Três discos de ágar de 9 mm de diâmetro, com micélio dos isolados, foram retirados das bordas de colônias em crescimento ativo, cultivados em meio MNM por 30 dias, a 25 °C, e inoculados em frascos erlenmeyer com 50 mL de solução MNM. Os frascos foram incubados em BOD, a 25 °C, por 30 dias, sem agitação. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições. Findo o período de incubação, o micélio fúngico foi coletado em tamis de malha de 1 mm, lavado com água destilada e, posteriormente, seco a 72 °C até peso constante.

A massa micelial seca foi mineralizada de acordo com o método descrito por Silva (1999). A concentração de P no extrato foi medida em espectrofotômetro, de acordo com Braga & Defelipo (1974). As concentrações de Ca, Mg, Cu e Zn foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica, e a de K, por fotometria de chama (AOAC, 2005).

Produção das plântulas

Sementes de *E. grandis* foram desinfestadas superficialmente pela imersão em etanol a 70 % por um minuto e em H₂O₂ a 20 % por seis minutos,

seguida de cinco enxágües com água destilada autoclavada. Após desinfestação, as sementes foram semeadas em areia lavada e autoclavada e germinadas à temperatura ambiente. As plântulas foram transferidas para casa de vegetação e cultivadas por 30 dias até atingirem a altura de 5 cm. Durante o período de cultivo, foram irrigadas semanalmente com solução de Clark (1975) diluída, com 1/4 da força, e, diariamente, com água destilada.

Instalação e condução do experimento

As plântulas de tamanho adequado foram transplantadas para potes plásticos com medidas de 15 x 10 x 10 cm, contendo 1,1 kg de areia lavada e autoclavada como substrato. Cada pote recebeu somente uma plântula, sendo a raiz inoculada com três discos de ágar de 9 mm de diâmetro, contendo micélio obtido das culturas cultivadas em meio MNM por 30 dias. Foram utilizadas cinco repetições para cada isolado, além do controle sem a inoculação fúngica, em delineamento inteiramente casualizado.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por um período de 105 dias, sendo irrigadas a cada três dias com 30 mL de solução nutritiva, segundo Brundrett et al. (1996). Elas foram irrigadas periodicamente com água destilada em quantidade suficiente para manutenção de, aproximadamente, 60 % da capacidade de campo.

Colonização radicular e morfologia das ectomicorrizas

Após 105 dias de cultivo, as plantas foram coletadas e as raízes amostradas, cortando-se fragmentos de, aproximadamente, 1 cm de comprimento. As amostras foram preservadas em FAA 5:90:5 (formaldeído: etanol: ácido acético).

A porcentagem de colonização ectomicorrízica foi medida por meio da comparação entre o número de fragmentos colonizados e o de não-colonizados, de acordo com o método descrito por Brundrett et al. (1996).

Para avaliação das estruturas ectomicorrízicas microscópicas, as raízes armazenadas em FAA foram transferidas para solução de glicerol a 2 % e mantidas nesse meio por duas horas. Em seguida, as ectomicorrizas foram emblocadas com Tissue Freezing Medium^{TD} e seccionadas em cortes de espessura de 20 µm, em criomicrotomo Leica CM 1850, a -30 °C. Os cortes foram coletados e corados com azul de Toluidina contendo glicerol (1:1). Para avaliação da morfologia externa das ectomicorrizas, fragmentos de raiz frescos, não fixados, contendo essas estruturas foram observados sob lupa estereoscópica Olympus SZH10. As ectomicorrizas foram fotografadas com câmera Olympus PM C353X.

Produção de massa seca e absorção de nutrientes por *E. grandis*

A parte aérea das plantas foi destacada do sistema radicular, seca em estufa à temperatura de 72 °C até

peso constante e posteriormente moída em moinho Willey com peneira de 0,25 mm de malha. A mineralização da parte aérea das plantas e as análises de nutrientes foram realizadas utilizando-se 100 mg de massa seca moída, seguindo os procedimentos analíticos já descritos.

A eficiência de utilização dos nutrientes (EUN) foi calculada dividindo-se o quadrado da massa seca (g) pelo conteúdo do nutriente (mg) (Siddiqi & Glass, 1981).

O ganho na produção de massa seca decorrente de inoculação fúngica foi calculado pela relação: ganho = $[M_{inoc} / M_{cont}]$, em que M_{inoc} = massa seca da parte aérea da planta inoculada e M_{cont} = massa seca da parte aérea da planta-controle, não-inoculada.

O ganho no conteúdo de nutrientes decorrente de inoculação fúngica foi calculado pela seguinte relação: ganho = $[C_{inoc} / C_{cont}]$, em que C_{inoc} = conteúdo do elemento na parte aérea da planta inoculada e C_{cont} = conteúdo do elemento na parte aérea da planta-controle, não-inoculada.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelos testes de Tukey e Scott-Knott a 5 %. Quando pertinentes, foram utilizadas técnicas multivariadas de análise de agrupamento e variáveis canônicas. Para análise de agrupamento, utilizou-se a distância generalizada de Mahalanobis (Cruz & Regazzi, 1997) e o algoritmo de Tocher (Rao, 1952 citado por Cruz & Regazzi, 1997).

Foram criados ideótipos para facilitar a interpretação dos dados. Os ideótipos são genótipos índices de menor e maior desempenho criados como referência na análise de dispersão gráfica das variáveis canônicas. Para definir o número de observações constituintes dos ideótipos, adotou-se a média do número de repetições dos experimentos. O ideótipo de pior desempenho é aquele que apresenta as menores observações para todas as variáveis, e o de melhor desempenho, o que apresenta as maiores observações para todas as variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento e absorção de nutrientes por monocários e dicários de *Pisolithus sp.*

Os isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus sp.*, após 30 dias de cultivo a 25 °C em 50 mL de solução Melin-Norkrans modificada (MNM), apresentaram massa seca variando de 0,022 a 0,061 g (Quadro 1). Os isolados monocarióticos 35, 248, M5 e M11 foram os que se destacaram ($p < 0,05$) e acumularam maior massa micelial nas condições experimentais definidas. Os dados de acúmulo de massa micelial evidenciam a existência de variação entre os isolados fúngicos no que se refere à capacidade

de absorver os nutrientes da solução e convertê-los em biomassa micelial. Esse comportamento pode variar também de acordo com o meio de cultivo utilizado (Hung & Chien, 1978; Ho, 1987). Vários estudos apontam a existência de variação intra e interespecífica entre fungos ectomicorrízicos em relação às características culturais e de crescimento, à colonização da planta hospedeira, à utilização de diferentes fontes de N, entre outras (Gay & Debaud, 1987; Burgess et al., 1993; Oliveira et al., 1994; Rosado et al., 1994b; Burgess et al., 1995b; Kropp, 1997; Sales, 2001; Costa, 2002). As populações monocarióticas apresentam larga variação para essas características resultantes de eventos de recombinação gênica durante a meiose (Rosado et al., 1994a; Kropp, 1997; Sales, 2001; Costa, 2002), constituindo material básico para programas de melhoramento fúngico visando à aplicação no setor florestal. Em síntese, os resultados obtidos corroboram os relatos da literatura e evidenciam a variação na capacidade de conversão de nutrientes em biomassa micelial pelos monocários e dicários testados.

A concentração de P no micélio dos isolados variou de 7,9 a 20,9 mg g⁻¹, sendo a média dos isolados dicarióticos superior à dos monocarióticos (p < 0,05) (Quadro 1). Em três dos quatro isolados em que a massa micelial acumulada foi maior – isolados 248, M5 e M11 – as concentrações de P foram distintamente menores (p < 0,05) do que as dos outros isolados. No entanto, as maiores concentrações de P no micélio, tanto em monocarióticos (147) como em dicarióticos (H4111 e PT90A), não resultaram em maior quantidade de biomassa micelial, uma vez que nesses

isolados as eficiências de utilização de nutrientes foram menores (p < 0,05) do que as dos demais. Esses resultados demonstram que o P absorvido pode ter outros destinos na célula. *Pisolithus tinctorius* associado a *Eucalyptus pilularis* armazena o P absorvido nos vacúolos celulares, na forma de polifosfatos, podendo translocá-lo em seguida para a planta hospedeira (Ashford et al., 1999). Em termos de EUN, os isolados monocarióticos M5 e M11 foram os mais eficazes na utilização do nutriente para produção de biomassa micelial (Quadro 1). Estudos comprovam que os fungos ectomicorrízicos aumentam a absorção e translocação de P (Trajano et al., 2001; Xu et al., 2002; Pampolina et al., 2002), contribuindo em alguns casos com até 70 % de todo o P absorvido pelas plantas (Brandes et al., 1998). A magnitude da translocação do elemento possivelmente deve variar de acordo com a capacidade do fungo de imobilizar o nutriente na biomassa. Os isolados de maior eficiência de utilização, para uma mesma quantidade de nutriente absorvida, poderão reter mais fortemente o nutriente no micélio, não o translocando para a planta. Assim, é de interesse selecionar isolados capazes de absorver grandes quantidades de P, de forma a não limitar a translocação para a planta hospedeira.

A concentração de Ca no micélio dos isolados variou de 2,2 a 3,9 mg g⁻¹ (Quadro 1). Esses valores encontram-se dentro da faixa de concentração desse elemento em rizomorfos de *Rhizopogon* sp. associado a *Pinus muricata* (Wallander et al., 2002). O Ca é um dos principais elementos encontrados em rizomorfos e hifas dos fungos ectomicorrízicos (Malajczuk & Cromack, 1982; Wallander et al., 2002).

Quadro 1. Produção de massa seca micelial (MS), concentração, conteúdo e eficiência de utilização de nutrientes (EUN) em isolados monocarióticos (MONO) e dicarióticos (DI) de *Pisolithus* sp., após cultivo em solução Melin-Norkrans modificada, a 25 °C, por 30 dias

Isolado	MS	Concentração						Conteúdo						EUN ⁽¹⁾					
		P	Ca	Mg	K	Cu	Zn	P	Ca	Mg	K	Cu	Zn	P	Ca	Mg	K	Cu	Zn
MONO	g	mg g ⁻¹						μg g ⁻¹						g ² mg ⁻¹					
35	0,047 a	14,8 b	3,0 b	4,3 a	375,4 a	64,4 b	186,8 b	0,69 a	0,13 b	0,20 a	17,18 a	3,03 a	9,06 a	3,21 c	17,00 b	11,04 c	0,13 c	729,04 b	243,81 b
94	0,027 c	17,5 b	3,0 b	3,3 b	306,7 b	77,5 b	268,7 a	0,40 d	0,07 d	0,08 c	8,50 b	1,79 b	6,61 b	1,82 d	10,41 b	9,11 c	0,08 c	407,26 c	110,28 b
147	0,022 c	20,9 a	3,3 a	2,9 b	366,2 a	67,1 b	257,0 a	0,39 d	0,08 c	0,09 c	7,20 b	1,80 b	7,22 b	1,24 d	6,05 b	5,37 c	0,06 c	268,88 c	67,03 b
248	0,056 a	11,6 c	3,9 a	3,2 b	293,5 b	49,6 b	150,7 b	0,65 a	0,22 a	0,18 a	15,72 a	2,83 a	8,73 a	4,82 b	14,25 b	17,42 b	0,20 b	1108,12 b	359,22 a
M5	0,061 a	9,2 c	2,3 b	2,7 b	268,1 b	66,7 b	136,2 b	0,56 b	0,14 b	0,16 a	16,86 a	4,21 a	8,60 a	6,64 a	26,57 a	23,25 b	0,22 b	883,84 b	432,67 a
M11	0,055 a	7,9 c	2,4 b	1,4 c	116,6 c	18,5 b	120,3 b	0,43 d	0,12 c	0,07 c	6,39 b	1,03 b	6,69 b	7,03 a	25,20 a	43,21 a	0,47 a	2936,90 a	452,16 a
Média	0,046 A	13,2 B	3,0 A	3,0 B	284,3 B	56,5 B	181,6 A	0,53 A	0,14 A	0,14 A	12,38 A	2,50 A	7,89 A	3,99 A	15,11 A	15,11 A	0,17 A	846,40 A	268,18 A
DI																			
H4111	0,028 c	19,8 a	3,8 a	4,4 a	405,5 a	138,5 a	195,5 b	0,51 c	0,10 c	0,12 b	10,42 b	3,52 a	4,78 b	1,53 d	7,84 b	6,53 c	0,07 c	222,72 c	164,01 b
M5M11	0,041 b	14,7 b	2,2 b	3,1 b	310,6 b	48,6 b	126,5 b	0,59 b	0,09 c	0,12 b	12,81 a	1,94 b	5,02 b	2,84 c	18,67 a	14,00 c	0,13 c	866,50 b	334,86 a
PT90A	0,030 c	18,9 a	3,0 b	4,0 a	367,1 a	130,3 a	250,7 a	0,55 b	0,08 c	0,12 b	11,00 b	3,66 a	6,72 b	1,63 d	11,25 b	7,5 c	0,08 c	245,90 c	133,92 b
RV82	0,040 b	16,8 b	4,0 a	4,3 a	435,4 a	57,6 b	193,2 b	0,66 a	0,16 b	0,17 a	17,47 a	2,24 b	7,35 b	2,42 c	10,00 b	9,41 c	0,09 c	714,28 b	217,68 b
Média	0,035 B	17,3 A	3,3 A	3,9 A	380,7 A	86,9 A	187,6 A	0,58 A	0,11 B	0,14 A	13,39 A	2,71 A	6,04 B	2,11 B	11,13 B	8,75 B	0,09 B	452,02 B	202,81 B
CV (%)	23,1	26,8	28,7	16,6	32,5	49,9	36,6	14,5	24,3	27,6	32,1	47,4	31,2	33,0	47,8	50,3	45,5	45,2	49,9

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 %. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

⁽¹⁾ Valores de EUN encontram-se multiplicados por 1000 para facilitar a notação.

Esse nutriente tem importante função na constituição da parede celular das células fúngicas, sendo requerido em grande quantidade (Wallander et al., 2002). Abundantes quantidades de cristais de oxalato de Ca estão presentes na superfície das hifas e rizomorfos, fato que confirma a inferência de que os fungos ectomicorrízicos exercem relevante papel na aquisição do nutriente pelas plantas associadas (Malajczuk & Cromack, 1982; Wallander, 2000b; Wallander et al., 2002; Hagerberg, 2003). Novamente, os dados demonstram que os isolados se distinguem ($p < 0,05$) no que se refere à EUN, sendo os monocários, M5 e M11, e o seu correspondente dicariótico, M5M11, os que apresentam a maior eficiência de utilização do elemento (Quadro 1).

A concentração de Mg no micélio dos isolados variou de 1,4 a 4,4 mg g⁻¹ (Quadro 1). Contudo, os monocários são os que apresentam as maiores EUNs. Nesse caso, destaca-se o isolado M11 como o mais eficiente na utilização de Mg para produção de biomassa micelial (Quadro 1). Em alguns casos específicos, a contribuição dos fungos ectomicorrízicos na absorção de Mg pode chegar a 4 % do total absorvido pela planta (Jentschke et al., 2000). Sabidamente, os fungos ectomicorrízicos acumulam esse elemento no micélio, com posterior transferência para as plantas (Jentschke et al., 2000), variando nessa capacidade de acordo com o seu genótipo e a interação fungo-planta.

A concentração de K no micélio dos isolados variou de 116,6 a 435,4 mg g⁻¹ (Quadro 1). Entre os monocários, nos isolados 35 e 147, a concentração de K correspondeu a valores encontrados para três dos quatro dicários – H4111, PT90A e RV82 (Quadro 1). No que se refere à EUN, o isolado monocariótico M11 foi o que apresentou a maior eficiência de utilização de K para produção de biomassa (Quadro 1). Grandes quantidades de K são encontradas nos vacúolos das células fúngicas e na região de contato de *P. tinctorius* associado a *E. pilularis* (Ashford et al., 1999), comprovando o papel de fungos ectomicorrízicos na aquisição desse nutriente. Os fungos ectomicorrízicos podem contribuir em alguns casos com 5 % do total de K absorvido pela planta hospedeira (Jentschke et al., 2000).

Em resumo, conclui-se que os isolados monocarióticos foram, em geral, mais eficientes na utilização dos macronutrientes avaliados para produção de biomassa ($p < 0,05$), comparados aos dicarióticos. Em destaque, o isolado monocariótico M11 foi o mais eficiente na utilização de P, Ca, Mg e K. A EUN constitui-se em importante propriedade para seleção de isolados destinados ao uso em programas de micorrização controlada de mudas de eucalipto. Os isolados selecionados deverão apresentar as maiores EUNs, associadas à elevada capacidade de transferir nutrientes para o hospedeiro.

Os isolados apresentaram concentração de Cu no micélio variando de 18,5 a 138,5 µg g⁻¹ (Quadro 1), e o isolado monocariótico M11 foi o que apresentou maior

EUN (Quadro 1). O Cu tem importante função na ativação de enzimas e participa de componentes da cadeia transportadora de elétrons, porém sua mobilidade no solo é baixa. Nesse caso, a presença de fungo ectomicorrízico pode contribuir para exploração de maior volume de solo e, também, para melhorar a absorção do nutriente pela planta (Van Tichelen et al., 2001).

A concentração de Zn no micélio dos isolados variou de 120,3 a 268,7 µg g⁻¹ (Quadro 1). O Zn, nas células fúngicas, participa da ativação de enzimas e tem papel crucial na estabilidade das membranas (Adriaensen et al., 2003), mas sua mobilidade no solo é baixa. Os fungos ectomicorrízicos podem melhorar a absorção desse nutriente, principalmente pela maior exploração do solo proporcionada pelas hifas e rizomorfos. A EUN foi superior nos isolados monocarióticos ($p < 0,05$), comparados aos dicarióticos (Quadro 1). Os isolados monocarióticos 248, M5 e M11 e o dicariótico M5M11 foram os mais eficientes na utilização do Zn para produção de biomassa.

Em análise de agrupamento, os 10 isolados de *Pisolithus* sp. formaram quatro grupos distintos. Os isolados 35, 94, 147, H4111, M5M11, PT90A e RV82 formaram o maior grupo. Os isolados M5, M11 e 248 constituíram três grupos distintos. Os isolados monocarióticos 35, 94 e 147 assemelharam-se aos dicarióticos do grupo na produção de massa micelial, conteúdo e eficiência de utilização de nutrientes quando cultivados em solução Melin-Norkrans modificada.

As correlações positivas entre o teor de P e os de K e Mg demonstram a importância do P para o crescimento do fungo e os benefícios na absorção de outros nutrientes (Quadro 2). O teor de K correlacionou-se positivamente com o de Mg e Cu (Quadro 2). Esse nutriente (K) tem a importante função de osmorregulação das células fúngicas, sendo a referida correlação possivelmente relacionada ao fato de o Mg e Cu serem importantes na ativação de enzimas e também participarem de componentes da cadeia transportadora de elétrons. Também, o conteúdo de Zn correlacionou-se positivamente com o de Ca (Quadro 2).

Colonização radicular e morfologia das ectomicorrizas

Todos os isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp. testados foram capazes de formar ectomicorrizas típicas quando associados com *E. grandis* sob condições de casa de vegetação (Figura 1).

As ectomicorrizas formadas pelos isolados monocarióticos apresentaram forma monopodial-piramidal, ausência de pêlos radiculares, manto recobrendo a superfície das raízes laterais, geralmente com coloração amarelo-dourada, e rede de Hartig limitada aos espaços intercelulares da epiderme radicular (Figura 1).

Quadro 2. Valores de correlação fenotípica entre os conteúdos de nutrientes no micélio de isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp., após 30 dias de cultivo em 50 mL de solução MNM

Variáveis	Nsim	prob (t)	rfe	r (5 %)	r (1 %)
P vs Mg	4980	0,0001 ⁺⁺	0,9293 ^{**}	0,5628	0,7248
P vs K	4973	0,0017 ⁺⁺	0,8568 ^{**}	0,5498	0,7205
Ca vs Zn	4965	0,0489 ⁺	0,6312 [*]	0,5910	0,7645
Mg vs K	4976	0,0003 ⁺⁺	0,9137 ^{**}	0,5327	0,7010
K vs Cu	4855	0,058 ⁺	0,6126 [*]	0,5277	0,7288

⁺⁺, ⁺ Significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste t. ^{**}, ^{*} Significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste de Mantel com 5.000 simulações. Nsim: número de simulações com estimativas de correlações fenotípicas válidas (-1 e 1). rfe = correlações fenotípicas; r (1 %) e r (5 %) = valores-limite da distribuição Z da estatística de Mantel a 1 e 5 %.

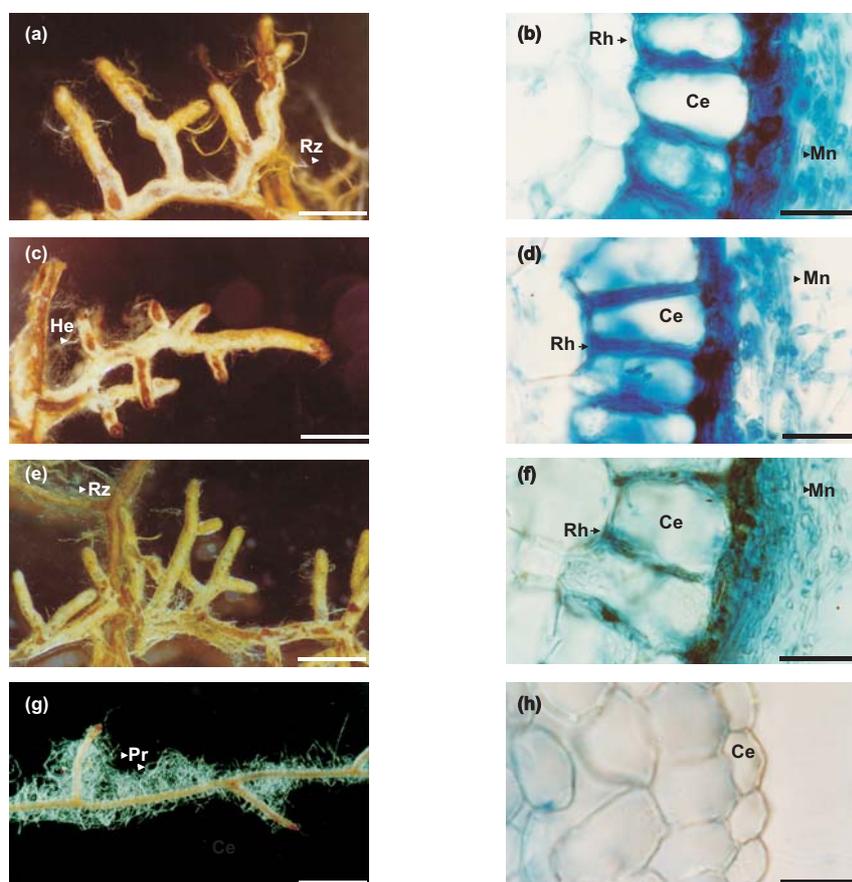


Figura 1. Morfologia externa e seções transversais de ectomicorizas formadas por isolados monocarióticos (35; 94) e dicarióticos (PT90A) de *Pisolithus* sp. em *Eucalyptus grandis*. Isolado: A, B = 35; C, D = 94; E, F = PT90A; G, H = controle, raiz não-inoculada. Observar pêlos radiculares (Pr). (A, C, E) Observar as hifas emanadas (He) e rizomorfos (Rz) nas raízes colonizadas. (B, D, F) Observar a constituição da rede de Hartig (Rh) e do manto (Mn), bem como o aumento do diâmetro radial das células da epiderme (Ce) das ectomicorizas. Barras: a, c, e, g = 1 mm; b, d, f, h = 20 μm.

A espessura do manto variou de 24 a 30 μm (Quadro 3), observando-se abundante presença de hifas e rizomorfos associados às ectomicorizas, os quais

são importantes na aquisição de nutrientes do solo (Figura 1). A espessura do manto formado pelos monocários e dicários não é uma característica que

Quadro 3. Colonização radicular em plantas de *Eucalyptus grandis* por isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp., após 105 dias de cultivo em casa de vegetação, espessura do manto e dimensões das células epidérmicas das ectomicorrizas formadas

Isolado	COL ⁽¹⁾	Manto ⁽²⁾	Célula da epiderme ⁽²⁾		
			Comprimento	Largura	
	%	μm			
Monocarióticos	35	67,3 a	28 ± 2,7	28 ± 4,2	16 ± 2,7
	94	67,3 a	26 ± 2,3	29 ± 3,3	13 ± 1,7
	147	63,4 a	29 ± 5,3	30 ± 5,8	15 ± 3,3
	248	62,2 a	27 ± 5,3	38 ± 5,9	17 ± 2,8
	M5	69,6 a	29 ± 4,8	26 ± 2,6	11 ± 2,1
	M11	12,4 b	26 ± 4,4	27 ± 3,1	13 ± 1,0
	Média	60,0 A	27 ± 1,3	30 ± 4,3	14 ± 2,2
Dicarióticos	H4111	62,4 a	26 ± 5	26 ± 6,3	11 ± 2,2
	M5M11	66,6 a	28 ± 3,9	30 ± 4,3	14 ± 1,8
	PT90A	71,6 a	30 ± 3,7	35 ± 4,2	16 ± 2,9
	RV82	68,1 a	24 ± 3,5	27 ± 3,5	14 ± 3,5
	Média	67,2 A	27 ± 2,5	29 ± 4,0	14 ± 2,0
Controle ⁽³⁾	-	-	15 ± 1,8	8 ± 1,1	

⁽¹⁾ Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 %. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %. ⁽²⁾ Médias obtidas por meio da medição de 10 cortes transversais. ⁽³⁾ Controle = raiz não-colonizada.

permita distinguir a origem do micélio, uma vez que os valores não diferiram, porém sua presença indica a compatibilidade fungo-planta.

A presença dos isolados fúngicos associados às raízes acarretou aumento no diâmetro radial das células da epiderme radicular (Quadro 3), as quais, quando em associação, apresentaram 26 a 38 μm de comprimento e 11 a 17 μm de largura. Nas raízes não-colonizadas, as dimensões das células epidérmicas ficaram em torno de 15 μm de comprimento e 8 μm de largura. Essas alterações morfológicas associadas à formação das ectomicorrizas evidenciam a possível produção de reguladores de crescimento pelos isolados de *Pisolithus* sp. Os fungos ectomicorrízicos são capazes de produzir fitormônios, como auxinas (AIA), que aumentam a produção de raízes laterais e, conseqüentemente, os sítios de infecção (Gay & Debaud, 1987; Gay et al., 1994). A produção de auxinas pelos monocários de *Hebeloma cylindrosporum* associado a *Pinus* sp. já foi relatada, havendo ampla variabilidade genética entre esses isolados (Gay & Debaud, 1987).

Os valores de percentagem de colonização ectomicorrízica em plantas de *E. grandis* inoculadas com os isolados fúngicos não diferiram entre si ($p < 0,05$), excetuando-se a referente ao isolado monocariótico M11, e variaram de 12,3 a 75,8 % (Quadro 3). Não foi observada colonização ectomicorrízica nas plantas não-inoculadas. A formação de

ectomicorrizas entre *E. grandis* e *Pisolithus* sp. não foi restrita ao estado dicariótico do fungo, sendo os monocários 35, 94, 147, 248, M5 e M11 capazes de estabelecer efetiva associação com as plantas.

Considerando os dados obtidos no presente trabalho, é possível admitir que a inexistência de relatos sobre a formação de ectomicorrizas por isolados monocarióticos de *Pisolithus* sp. nos sítios de plantio ou em florestas naturais resulta do reduzido esforço de amostragem e averiguação do número de núcleos por célula, nas hifas constituintes das ectomicorrizas, e da rápida fusão dos micélios monocarióticos oriundos da germinação de vários basidiósporos na rizosfera da planta hospedeira.

Produção de massa seca e absorção de nutrientes por *E. grandis*

Em média, as mudas de *E. grandis* inoculadas com os isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp. apresentaram, ao final de 105 dias de cultivo em casa de vegetação, massa seca da parte aérea superior à das plantas não-inoculadas (Quadro 4). Nos isolados monocarióticos M11 e M5, a menor capacidade de formar ectomicorrizas refletiu igualmente no baixo crescimento das plantas (Quadro 4). Em associação com *E. grandis*, os isolados monocarióticos M5 e M11 foram os que apresentaram menores ganhos em massa seca das plantas; no entanto, o correspondente

dicariótico, M5M11, foi efetivo em promover melhor crescimento das plantas, demonstrando que o cruzamento de monocários pode resultar na produção de dicários superiores (Quadro 4).

As concentrações de P na parte aérea das plantas inoculadas e não-inoculadas não diferiram ($p < 0,05$), variando de 0,3 a 0,6 mg g⁻¹ (Quadro 4), embora tenha sido expressiva a variação no aumento do teor de P na parte aérea das plantas. A inoculação das plantas com os isolados de *Pisolithus* sp. mostrou ganhos significativos na absorção de P, devido sobretudo à maior exploração do substrato. Esse fato já foi comprovado em outros estudos (Trajano, 1998; Pampolina et al., 2002). Alguns isolados monocarióticos, como M5 e M11, exibiram sintomas característicos de deficiência de P, confirmando a alta variabilidade dos monocários na capacidade de absorção do nutriente. Fato a ser observado é que esses isolados monocarióticos foram os mais eficientes na utilização de P em condições *in vitro* e, provavelmente, são poucos eficazes na translocação do elemento para a planta hospedeira, acumulando-o na biomassa micelial.

A concentração de Ca da parte aérea das plantas inoculadas variou de 3,4 a 5,7 mg g⁻¹ (Quadro 4). O teor de Ca da parte aérea foi maior nas plantas inoculadas com isolados dicarióticos ($p < 0,05$) (Quadro 4), resultando em ganho de valores de até 764 vezes o do controle. As plantas inoculadas com os isolados fúngicos mostraram ganhos extremamente altos, comparado aos do controle, demonstrando que os fungos ectomicorrízicos têm papel relevante na absorção do nutriente e transferência para a planta.

Sugere-se que os fungos ectomicorrízicos sejam os responsáveis pela baixa resposta do eucalipto às fertilizações com esse elemento. A eficiência de utilização de Ca não diferiu entre os isolados ($p < 0,05$), excetuando-se para os monocários M5 e M11, sendo a média dos dicários superior à dos monocários ($p < 0,05$) (Quadro 4). Novamente, esses isolados foram caracterizados como eficientes na absorção do Ca em meio líquido, de onde se infere que a quantidade absorvida necessariamente não se relaciona com a transferência do nutriente para a planta hospedeira.

O teor de Mg variou de 0,23 a 3,49 mg, com a média dos isolados dicarióticos superior à dos monocarióticos ($p < 0,05$) (Quadro 4). A parte aérea das plantas inoculadas apresentou significativos ganhos no teor de Mg, alcançando valores de até 698 vezes o do controle, comprovando que a associação simbiótica proporciona ganhos significativos na absorção de Mg, como já relatado em outros trabalhos (Arocena & Glowka, 2000; Jentschke et al., 2000). As plantas inoculadas com os dicários H4111, PT90A e RV82 foram as que se destacaram na utilização de Mg para o crescimento, comparados aos monocários ($p < 0,05$) (Quadro 4).

A parte aérea das plantas apresentou teor de K variando de 6,7 a 9,8 mg g⁻¹ (Quadro 4). O teor de K não diferiu entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$), exceto para os monocários M5 e M11. O aumento do teor de K na parte aérea das plantas inoculadas foi significativo comparado ao do controle, chegando a até cerca de 619 vezes. As plantas inoculadas com os dicários H4111, PT90A e RV82 apresentaram maior eficiência de utilização de K ($p < 0,05$) (Quadro 4).

Quadro 4. Produção de massa seca da parte aérea (MS), concentração, conteúdo e eficiência de utilização de nutrientes (EUN) em *Eucalyptus grandis* inoculado com isolados monocarióticos (MONO) e dicarióticos (DI) de *Pisolithus* sp., após 105 dias de cultivo em casa de vegetação

Isolado	Concentração						Conteúdo						EUN ⁽¹⁾													
	MS	P	Ca	Mg	K	Cu	Zn	P	Ca	Mg	K	Cu	Zn	P	Ca	Mg	K	Cu	Zn							
	g	mg g ⁻¹					µg g ⁻¹					mg					µg					g ² mg ⁻¹				
Controle	0,03 d	0,8 a	0,7 c	0,2 b	1,2 c	81,5 a	289,3 a	0,009 b	0,013 c	0,005 c	0,03 c	0,81 b	2,89 c	100 d	69,23 b	180,0 c	30,0 d	1.111 b	311 b							
35	2,23 a	0,6 a	4,0 b	1,5 a	7,9 b	8,5 b	49,9 b	1,32 a	8,86 a	3,33 a	17,71 a	19,18 a	111,45 a	3.767 b	561,27 a	1.493,4 b	280,8 b	259.275 a	44.620 a							
94	1,93 b	0,5 a	3,4 b	1,2 a	7,7 b	9,6 b	47,4 b	0,90 a	6,97 b	2,42 b	14,81 a	18,70 a	91,61 b	4.138 b	534,41 a	1.539,2 b	254,3 b	199.192 a	40.660 a							
147	1,48 b	0,5 a	4,3 b	1,3 a	9,1 a	18,3 b	50,7 b	0,78 b	5,70 b	1,87 b	12,86 a	24,28 a	72,65 b	2.808 c	384,28 a	1.171,3 b	170,3 c	90.214 b	30.150 a							
248	1,75 b	0,4 a	4,0 b	1,5 a	8,6 a	10,3 b	54,7 b	0,82 a	6,72 b	2,45 b	14,64 a	18,06 a	91,14 a	3.734 c	455,73 a	1.250,0 b	209,2 b	169.574 a	33.602 a							
M5	0,62 c	0,5 a	4,9 a	1,3 a	9,5 a	12,4 b	63,1 b	0,37 b	3,00 c	0,80 c	5,86 b	7,63 b	37,42 b	1.034 c	128,13 b	480,5 c	65,6 d	50.308 b	10.272 b							
M11	0,14 d	0,3 a	5,7 a	1,6 a	9,8 a	17,6 b	76,7 b	0,04 b	0,87 c	0,23 c	1,46 b	2,56 b	11,31 c	490 d	22,52 b	85,2 c	13,4 d	7.656 b	1.733 b							
Média	1,40 B	0,5 A	4,3 A	1,4 A	8,7 A	12,6 B	56,4 B	0,73 A	5,51 B	1,91 B	11,56 B	15,50 B	71,26 B	2.684 B	355,71 B	1.026,2 B	169,5 B	126.451 A	27.504 A							
DI																										
H4111	2,41 a	0,3 a	3,5 b	1,1 a	6,9 b	8,0 b	47,3 b	0,85 a	8,35 a	2,71 b	16,74 a	19,52 a	114,73 a	6.833 a	695,58 a	2.143,2 a	346,9 a	297.54 a	50.624 a							
M5M11	2,29 a	0,3 a	3,8 b	1,4 a	7,8 b	15,0 b	51,8 b	0,84 a	8,65 a	3,33 a	17,61 a	34,74 a	118,03 a	6.243 b	606,25 a	1.574,8 b	297,8 b	150.952 b	44.430 a							
PT90A	2,54 a	0,4 a	3,9 b	1,5 a	6,7 b	14,6 b	62,9 b	1,10 a	9,93 a	3,17 a	16,85 a	35,22 a	157,42 a	5.865 b	649,70 a	2.035,2 a	382,2 a	183.180 a	40.983 a							
RV82	2,65 a	0,4 a	3,6 b	1,3 a	7,0 b	7,1 b	51,7 b	1,03 a	9,61 a	3,49 a	18,58 a	18,87 a	134,89 a	6.818 a	730,74 a	2.012,2 a	377,9 a	372.151 a	52.060 a							
Média	2,47 A	0,4 A	3,6 B	1,3 A	7,1 B	11,2 B	53,5 B	0,95 A	9,22 A	3,17 A	17,44 A	27,11 A	131,27 A	6.422 A	661,70 A	1.924,6 A	349,82 A	225.04 A	46.476 A							
CV (%)	26,5	51,0	25,2	19,7	17,8	71,0	93,1	62,7	31,1	30,5	27,9	76,9	32,4	54,3	36,2	33,4	31,7	89,5	88,6							

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelos testes de Scott-Knott e Tukey a 5 %.

⁽¹⁾ Valores de EUN encontram-se multiplicados por 1000 para facilitar a notação.

As plantas de *E. grandis* inoculadas com os dicários de *Pisolithus* sp. foram, em geral, mais eficientes na utilização dos macronutrientes, comparadas às inoculadas com monocários. Contudo, alguns monocários foram capazes de contribuir efetivamente para absorção dos macronutrientes. De fato, a associação ectomicorrízica melhora a absorção dos principais elementos encontrados na solução do solo, Ca, Mg e K, além de nutrientes com baixa mobilidade, como o P. A prática de inoculação de mudas de eucalipto com fungos ectomicorrízicos selecionados em viveiros florestais irá contribuir para produção de plantas mais resistentes ao estresse ambiental, aumentando a sua sobrevivência, além de proporcionar ganhos para sua nutrição.

As médias de concentração de Cu na parte aérea das plantas inoculadas variaram de 7,1 a 18,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Quadro 4). O tratamento-controle apresentou maior concentração de Cu na parte aérea, comparado à das plantas inoculadas, sendo a biomassa produzida por essas plantas extremamente baixa, o que provavelmente causou toxidez nas plantas. O teor de Cu na parte aérea das plantas não diferiu ($p < 0,05$), exceto para os isolados M5 e M11. O aumento do conteúdo de Cu na parte aérea das plantas inoculadas alcançou valores de até 43 vezes o do controle.

A parte aérea das plantas inoculadas mostrou concentração de Zn variando de 47,3 a 76,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Quadro 4). O tratamento controle apresentou maior concentração de Zn, comparado à das plantas inoculadas, possivelmente devido ao efeito da concentração em pequena biomassa produzida. O teor

de Zn na parte aérea das plantas inoculadas com os dicários foi, geralmente, maior do que o dos monocários ($p < 0,05$), exceto para os isolados 35 e 248 (Quadro 4). O aumento do conteúdo de Zn na parte aérea alcançou valores de até 54 vezes o do controle.

A inoculação das plantas com os isolados de *Pisolithus* sp. proporcionou maior conteúdo e maior eficiência de utilização de Cu e Zn. Novamente, os monocários M5 e M11, que em condições *in vitro* foram os mais eficazes na absorção e na eficiência de utilização desses micronutrientes para produção de biomassa, quando associados a *E. grandis*, não resultaram em ganhos na absorção, possivelmente por acumularem os nutrientes na biomassa micelial e não os translocarem para as plantas.

Agrupando-se as plantas de *E. grandis* inoculadas com os isolados de *Pisolithus* sp. segundo as variáveis massa seca, colonização, conteúdo e eficiência de utilização de nutrientes da parte aérea, quatro grupos foram formados. O isolado monocariótico M11 e o controle formaram um grupo. Os isolados 35, 94, 248, H4111, M5M11 e RV82 formaram outro grupo, demonstrando similaridade entre monocários e dicários. Os isolados M5 e 147 formaram um grupo, e o dicário PT90A formou outro grupo isoladamente.

O teor de P mostrou correlação positiva com o dos demais nutrientes avaliados na parte aérea das plantas (Quadro 5). Foram observadas correlações positivas para absorção dos principais nutrientes presentes na solução do solo, como Ca, K e Mg, os quais são absorvidos predominantemente por fluxo em massa, comprovando o importante papel dos fungos

Quadro 5. Valores de correlação fenotípica entre os conteúdos de nutrientes na parte aérea de *Eucalyptus grandis* inoculado com isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp., após 105 dias de cultivo em casa de vegetação

Variável	Nsim	prob (t)	rfe	r (5 %)	r (1 %)
P vs Ca	4792	0,0001 ⁺⁺	0,9306 ^{**}	0,5943	0,793
P vs K	4881	0,0006 ⁺⁺	0,8924 ^{**}	0,5715	0,7747
P vs Mg	4851	0,0002 ⁺⁺	0,9241 ^{**}	0,5543	0,7763
P vs Zn	4854	0,0011 ⁺⁺	0,8731 ^{**}	0,5805	0,7665
P vs Cu	4445	0,0422 ⁺	0,6464 [*]	0,5546	0,7029
Ca vs K	4995	0 ⁺⁺	0,9771 ^{**}	0,5807	0,8213
Ca vs Mg	4998	0 ⁺⁺	0,9812 ^{**}	0,5403	0,7513
Ca vs Zn	4997	0 ⁺⁺	0,9863 ^{**}	0,5549	0,7569
Ca vs Cu	4894	0,0063 ⁺⁺	0,7928 ^{**}	0,5691	0,7253
K vs Mg	4994	0 ⁺⁺	0,9871 ^{**}	0,549	0,8347
K vs Zn	4996	0,0001 ⁺⁺	0,9347 ^{**}	0,5502	0,7823
K vs Cu	4889	0,0098 ⁺⁺	0,7651 ^{**}	0,5485	0,7144
Mg vs Zn	4990	0,0517 ⁺⁺	0,6252 [*]	0,5598	0,7794
Mg vs Cu	4881	0,0091 ⁺⁺	0,7701 ^{**}	0,5309	0,7183
Zn vs Cu	4895	0,0036 ⁺⁺	0,8224 ^{**}	0,5537	0,7241

⁺⁺, ⁺: Significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste t. ^{**}, ^{*}: Significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste de Mantel com 5.000 simulações. Nsim: número de simulações com estimativas de correlações fenotípicas válidas (-1 e 1). rfe = correlações fenotípicas; r (1 %) e r (5 %) = valores-limite da distribuição Z da estatística de Mantel a 1 e 5 %.

na aquisição desses elementos quando associados às raízes, como já relatado por Arocena & Glowa (2000). A maior absorção de Mg correlacionou-se positivamente com a absorção de K. A correlação positiva entre o teor de Ca e o de Cu, possivelmente, justifica-se pelo fato de o Ca proporcionar maior tolerância fisiológica a esse metal (van Tichelen et al., 2001).

A correlação positiva entre o teor de P no micélio dos isolados de *Pisolithus* sp. e o teor do elemento na parte aérea de *E. grandis* (Quadro 6) é interpretada como uma indicação de que a seleção dos isolados mais eficientes na absorção de P deve ser priorizada nos programas de inoculação em viveiros. A maior absorção de P pelos fungos possibilitou a melhor absorção dos demais nutrientes avaliados, como também observado por Jentschke et al. (2001). O maior teor de Mg no micélio fúngico correlacionou-se positivamente com o teor de P na parte aérea de *E. grandis* (Quadro 6), possivelmente pelo fato de o Mg ativar enzimas importantes produzidas pelos fungos, como fosfatases, as quais disponibilizam o P para absorção.

Na análise de agrupamento efetuada com base na EUN do micélio fúngico cultivado *in vitro* e nos conteúdos de nutrientes na parte aérea das plantas, os isolados 35, 94, 147, H4111, M5M11, PT90A e RV82 formaram o principal grupo, enquanto os isolados 248, M5 e M11 constituíram grupos distintos cada um.

O gráfico de dispersão de escores foi obtido em relação à EUN no micélio dos isolados de *Pisolithus* sp. e conteúdos de nutrientes na parte aérea das plantas de *E. grandis*, para avaliação da capacidade de translocação de nutrientes entre os simbiontes (Figura 2). Os isolados com menor EUN são os mais eficientes na translocação de nutrientes para *E. grandis*, aproximando-se do ideótipo II (Figura 2). Os isolados 248, M5 e M11, que produziram maior massa micelial em condições *in vitro*, foram também os mais eficientes na utilização de nutrientes quando associados às plantas, porém não são os que melhor translocam os nutrientes para o hospedeiro (Figura 2). A eficiência de utilização de nutrientes pelo micélio dos isolados e os conteúdos de nutrientes na parte aérea das plantas correlacionaram-se negativamente,

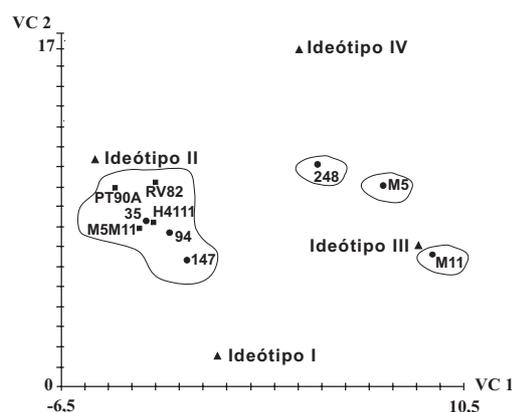


Figura 2. Dispersão dos escores de isolados de *Pisolithus* sp. em relação às duas primeiras variáveis canônicas, VC1 e VC2, calculadas a partir da EUN pelo micélio fúngico e conteúdos de nutrientes (P, Ca, Mg, K, Cu e Zn) na parte aérea de *Eucalyptus grandis*, cultivadas por 105 dias em casa de vegetação. Os ideótipos representam: I – menor eficiência de utilização de nutrientes pelo fungo e menores conteúdos de nutrientes na parte aérea das plantas; II – menor eficiência de utilização de nutrientes pelo fungo e maiores conteúdos de nutrientes na parte aérea das plantas; III – maior eficiência de utilização de nutrientes pelo fungo e menores conteúdos de nutrientes na parte aérea das plantas; IV – maior eficiência de utilização de nutrientes pelo fungo e maiores conteúdos de nutrientes na parte aérea das plantas. Pontos circundados pela mesma linha correspondem a isolados do mesmo grupo obtido pelo método de otimização de Tocher.

sem haver, no entanto, significância estatística (dados não mostrados).

Finalmente, a capacidade de alguns monocários de colonizar o sistema radicular do hospedeiro e de promover maior crescimento e absorção de nutrientes pela planta de forma tão eficiente quanto os dicários

Quadro 6. Valores de correlação fenotípica entre os conteúdos de nutrientes na parte aérea de *Eucalyptus grandis* e no micélio de isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp.

Variável	Nsim	prob (t)	Rfe	r (5 %)	r (1 %)
P vs P	4758	0,0513 ⁺	0,626*	0,5673	0,7405
Ca vs P	4990	0,056 ⁺	0,6165*	0,5259	0,7385
K vs P	4991	0,0666 ⁺	0,5968*	0,5467	0,7396
Mg vs P	4988	0,0443 ⁺	0,6413*	0,5706	0,7531

⁺⁺, ⁺: Significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste t. ^{**}, ^{*}: Significativo a 1 e 5 %, respectivamente, pelo teste de Mantel com 5.000 simulações. Nsim: número de simulações com estimativas de correlações fenotípicas válidas (-1 e 1). rfe = correlações; r (1 %) e r (5 %) = valores-limite da distribuição Z da estatística de Mantel a 1 e 5 %.

pode estar relacionada à herança de conjunto de alelos favoráveis a essas características durante a meiose. Embora alguns estudos de genética quantitativa da associação ectomicorrízica em outros sistemas tenham sido efetuados até o momento (Kropp, 1997; Rosado et al., 1994a,b), pesquisas futuras deverão ser realizadas visando à elucidação dos determinantes genéticos da interação entre monocários e dicários de *Pisolithus* sp. e o eucalipto.

CONCLUSÕES

1. Os isolados monocarióticos de *Pisolithus* sp. são capazes de formar ectomicorrizas típicas com *E. grandis*, sob condições de casa de vegetação.

2. Em geral, a inoculação com os isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus* sp. aumentou a produção de massa seca e a absorção de nutrientes pelas plantas de *Eucalyptus grandis*.

3. Os isolados monocarióticos podem ser tão eficientes quanto os dicarióticos na absorção e transferência de nutrientes para a planta.

4. Os isolados monocarióticos e dicarióticos a serem selecionados para programas de melhoramento fúngico e de inoculação controlada em viveiros florestais devem ser aqueles com alta capacidade de acumular nutrientes no micélio em formas facilmente transferíveis para a planta. Essa característica refletiu-se em menor eficiência de utilização de nutrientes no micélio fúngico.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao CNPq a bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

LITERATURA CITADA

- ADRIAENSEN, K.; van der LELIE, D.; van LAERE, A.; VANGRONSVELD, J. & COLPAERT, J.V. A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytol.*, 161:549-555, 2003.
- AROCENA, J.M. & GLOWA, K.R. Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition. *For. Ecol. Manag.*, 133:61-70, 2000.
- ASHFORD, A.E.; VESK, P.A.; ORLOVICH, D.A.; MARKOVINA, A.L. & ALLAWAY, W.G. Dispersed polyphosphate in fungal vacuoles in *Eucalyptus pilularis*/*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas. *Fung. Genet. Biol.*, 28:21-33, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRYS – AOAC. Official methods of analyses. 12.ed. Washington, 2005. 1094p.
- ATTIWILL, P.M. & ADAMS, M.A. Nutrition of Eucalypts. Melbourne, CSIRO, 1996. 448p.
- BÄ, A.M.; SANON, K.B.; DUPONNOIS, R. & DEXHEIMER, J. Growth response of *Afzelia africana* Sm. seedlings to ectomycorrhizal inoculation in a nutrient-deficient soil. *Mycorrhiza*, 9:91-95, 1999.
- BARROS, N.F. & NOVAIS, R.F. Eucalypt nutrition and fertilizer regimes in Brazil. In: ATTIWILL, P.M. & ADAMS, M.A., eds. Nutrition of Eucalypts. Collingwood, CSIRO, 1996. p.335-355.
- BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F. Relação solo-eucalipto. Viçosa, MG, Folha de Viçosa, 1990. 330p.
- BRAGA, J.M. & DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extrato de solos e material vegetal. *R. Ceres*, 21:73-85, 1974.
- BRANDES, B.; GODBOLD, D.L.; KUNH, A.J. & JENTSCHKE, G. Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. *New Phytol.*, 140:735-743, 1998.
- BRUNDRETT, M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.*, 154:275-304, 2002.
- BRUNDRETT, M.C.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T. & MALAJCZUK, N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research, 1996. 374 p. (ACIAR Monograph, 32)
- BURGESS, T.; LAURENT, P.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. & MARTIN, F. Effect of the fungal isolate infectivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhiza. *Plant Soil*, 195:498-417, 1995.
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N. & GROVE, T.S. The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake by *Eucalyptus globules* Labill and *E. diversicolor* F. Muell. *Plant Soil*, 153:155-164, 1993.
- CAIRNEY, J. W.G. & CHAMBERS, S.M. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: A review of current knowledge. *Mycorrhiza*, 7:117-131, 1997.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *J. Agric. Food. Chem.*, 23:458-460, 1975.
- COSTA, M.D. Isolamento e caracterização de estirpes monocarióticas de *Pisolithus* sp. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2002. 149p. (Tese de Doutorado)
- CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético I. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1997. 390p.
- FARIA, G.E.F.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F.; NEVES, J.C.L. & TEIXEIRA, J.L. Produção e estado nutricional de povoamentos de *Eucalyptus grandis*, em segunda rotação, em resposta à adubação potássica. *R. Árvore*, 26:577-584, 2002.
- GAY, G. & DEBAUD, J.C. Genetic study on idole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: Inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. *Mycorrhiza*, 26:141-146, 1987.

- GAY, G.; NORMAND, L.; MARMEISSE, R.; SOTTA, B. & DEBAUD, J.C. Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytol.*, 128:645-657, 1994.
- HAGERBERG, D.; THELIN, G. & WALLANDER, H. The production of ectomycorrhizal mycelium in forest: Relation between forest nutrient status and local mineral sources. *Plant Soil*, 252:279-290, 2003.
- HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. *Mycorrhizal symbiosis*. London, Academic Press, 1983. 483p.
- HO, I. Comparasion of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rates, enzyme activity, and phytohormone production. *Can. J. Bot.*, 17:31-35, 1987.
- HUNG, L. & CHIEN, C. Physiological studies on two ectomycorrhizal fungi, *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus*. *Mycoscience*, 19:121-127, 1978.
- JENTSCHKE, G.; BRANDES, B.; KUHN, A.J.; SCHRÖDER, W.H.; BECKER, S. & GODBOLD, D.L. The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant Soil*, 220:243-246, 2000.
- JENTSCHKE, G.; BRANDES, B.; KUNH, A.J.; SCHRÖDER, W.H. & GODBOD, D.L. Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.*, 149:327-337, 2001.
- KOPE, H.H. Interactions of heterokaryotic and homokaryotic mycelium of sibling isolates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. *Mycologia*, 84:659-667, 1992.
- KOPE, H.H. & FORTIN, J.A. Germination and comparative morphology of basidiospores of *Pisolithus arhizus*. *Mycologia*, 82:350-357, 1990.
- KROPP, B.R. Inheritance of the ability for ectomycorrhizal colonization of *Pinus strobus* by *Laccaria bicolor*. *Mycologia*, 89:578-585, 1997.
- LANDEWEERT, R.; HOFFLAND, E.; FINLAY, R.D.; KUYPER, T.W. & van BREEMEN, N. Linking plants to rocks: Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol. Evol.*, 16:248-254, 2001.
- MALAJCZUK, N. & CROMACK, K. Accumulation of calcium oxalate in the mantle of ectomycorrhizal roots of *Pinus radiata* and *Eucalyptus marginata*. *New Phytol.*, 92:527-531, 1982.
- 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*, 59:153-163, 1969.
- OLIVEIRA, V.L.; SCHIMIDT, V.D.B.; GOMES, N.C. & MAIA, D.C. Spécificité de champignons ectomycorrhiziens vis-à-vis d' *Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. *Agronomie*, 14:57-62, 1994.
- PAMPOLINA, N.M.; DELL, B. & MALAJCZUK, N. Dynamics of ectomycorrhizal fungi in na *Eucalyptus globulus* plantation: Effect of phosphorus fertilization. *For. Ecol. Manag.*, 158:291-304, 2002.
- PREZOTTI, L.C.; DEFELIPO, B.V.; VENEGAS, V.H.A. & BARROS, N.F. Nível crítico de potássio no solo para a produção de mudas de eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo*, 12:65-70, 1988.
- ROSADO, S.C.S.; KROPP, B.R. & PICHÉ, Y. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. I. Host plant variability and heritability of ectomycorrhizal and roots traits. *New Phytol.*, 126:105-110, 1994a.
- ROSADO, S.C.S.; KROPP, B.R. & PICHÉ, Y. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. II. Fungal variability and heritability of ectomycorrhizal traits. *New Phytol.*, 126:111-117, 1994b.
- SALES, N.L.P. Modelo para estudo da diversidade genética em populações naturais de *Pisolithus* sp. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2001. 95p. (Tese de Doutorado)
- SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Utilization Index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *J. Plant Nutr.*, 4:289-302, 1981.
- SILVA, F.C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes/ Brasília, Embrapa Solo, Embrapa Informática Agropecuária. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999.370p.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*. London, Academic Press, 1997. 605p.
- TRAJANO, M.A.B.; KASUYA, M.C.M.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C. & NOVAES, R.F. Suprimento de fósforo e formação de micorrizas em mudas de eucalipto em sistema de raízes divididas. *R. Árvore*, 25:192-201, 2001.
- van TICHELEN, K.K.; COLPAERT, J.V. & VANGRONSVELD, J. Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytol.*, 150:203-213, 2001.
- WALLANDER, H. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 218:249-256, 2000a.
- WALLANDER, H. Use of strontium isotopes and foliar K content to estimate weathering of biotite induced by pine seedlings colonised by ectomycorrhizal fungi from two different soils. *Plant Soil*, 222:215-229, 2000b.
- WALLANDER, H.; JOHANSSON, L. & PALLON, J. PIXEL analysis to estimate the composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grow in contact with different minerals in forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 39:147-156, 2002.
- XU, D.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. & GONG, M. Effects of P fertilization on productivity and nutrient accumulation in a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* plantation in southern China. *For. Ecol. Manag.*, 161:89-100, 2002.