

ORANICE APARECIDA BÉGA

INOCULAÇÃO DE MUDAS DE
Pinus taeda POR *Scleroderma*

Dissertação submetida à consideração da Comissão Examinadora como requisito parcial à obtenção do Título de "Mestre em Ciências — M.Sc.", no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA
1989

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

P A R E C E R

Os membros da Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata ORANICE APARECIDA BÉGA, sob o título "INOCULAÇÃO DE MUDAS DE Pinus taeda POR Scleroderma ." para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. Área de concentração: SILVICULTURA, após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Dissertação completando assim os requisitos necessários para receber o grau e o Diploma de Mestre em Ciências Florestais.

Observação:

O critério de aprovação da Dissertação e Defesa da mesma a partir de novembro de 1980 é apenas, APROVADA ou NÃO APROVADA.

Curitiba, 27 de fevereiro de 1989

Prof.M.Sc. Edilson Batista de Oliveira
Primeiro Examinador

Prof.Dr. Mario Takao Inoue
Segundo Examinador

Prof.Dr. Antonio Jose de Araujo
Presidente da Comissão



À

ORIEDES, minha mãe
MANOEL, meu pai
e meus irmãos pelo
carinho e estímulo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

Ao orientador Prof. Dr. Antonio José de Araujo, pela efetiva orientação na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Mário Takao Inoue pelas valiosas sugestões e co-orientação.

Aos pesquisadores Edilson Batista de Oliveira e Sérgio Gaiad pela indispensável contribuição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da EMBRAPA pela liberação de recursos humanos e materiais, com os quais foi possível realizar este trabalho.

Ao meu irmão Odisnei e a minha cunhada Tarcisa, pelo constante incentivo e apoio na minha formação profissional.

Às minhas cunhadas Ivone e Rosana pela colaboração e estímulo.

Aos meus amigos Cleonice, Emerson, Fátima, Geny, Juran-
di e Sandra pela força e amizade e por acreditarem na realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Agrônomo Dr. Alfredo José Fernandes, Diretor da Escola de Agronomia e Zootecnia, da Universidade do Oeste Paulista, pelo apoio recebido para o término deste trabalho.

Aos funcionários, do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Adilson, Alfeu, Coelho, Eliane, Marta, Vera pela colaboração recebida.

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Agrárias e do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas pela atenção e auxílio na busca de material bibliográfico.

Ao Reinaldo e a Lurdinha, da Secretaria do Curso de Pós-Graduação pela atenção e contribuições prestadas.

Aos professores, funcionários e amigos que colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DA AUTORA

ORANICE APARECIDA BÊGA, filha de Manoel Bêga e Oriedes Valério Bêga, nasceu em Santo Inácio, Paraná, a 13 de outubro de 1959.

Concluiu o curso primário e ginásial no Colégio Dr. Manoel Firmino de Almeida em Santo Inácio, PR, o secundário na Escola Normal Colegial D. Pedro I também em Santo Inácio, PR.

Iniciou, em 1979, o curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, graduando-se em 1982.

Em março de 1983 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, a nível de mestrado na Área de Concentração de Silvicultura, na Universidade Federal do Paraná, concluindo os créditos em julho de 1985.

Desde agosto de 1988 é professora da Universidade do Oeste Paulista, em Presidente Prudente.

S U M Á R I O

	<u>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</u>	viii
	<u>LISTA DE TABELAS</u>	ix
	<u>RESUMO</u>	xi
1	<u>INTRODUÇÃO</u>	1
2	<u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	4
2.1	CLASSIFICAÇÃO DA MICORRIZA	4
2.1.1	Ectomicorrizas	4
2.1.2	Endomicorrizas	6
2.1.3	Ectoendomicorrizas	6
2.2	BENEFÍCIOS DA MICORRIZA EM ESPÉCIES FLORESTAIS..	7
2.3	FATORES QUE AFETAM O DESENVOLVIMENTO MICORRÍZICO	8
2.4	TIPOS DE INÓCULO DO FUNGO MICORRÍZICO	9
2.4.1	Solo de povoamentos antigos	10
2.4.2	Mudas micorrizadas	10
2.4.3	Esporos e corpos de frutificação	11
2.4.4	Cultura pura	12
3	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	14
3.1	PROCEDÊNCIA E TRATAMENTO DAS SEMENTES	14
3.2	COLETA E PREPARO DOS INÓCULOS	15
3.3	SUBSTRATO	16
3.4	DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO	18

3.4.1	Delimitação Experimental e Análise Estatística	18
3.4.2	Instalação do Experimento	19
3.4.3	Avaliações	19
3.5	ISOLAMENTO DO FUNGO	20
3.5.1	Meio de Cultura MMN (MELIN-NORKRANS MODIFICADO)	22
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	23
4.1	MICORRIZAÇÃO	23
4.2	GERMINAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA, ALTURA E DIÂMETRO ...	30
4.3	CLOROFILA E CAROTENO	32
4.4	NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO (NPK FOLIAR)	34
4.5	PESO SECO DA RAIZ, PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL	35
4.6	AVALIAÇÃO DOS SUBSTRATOS TESTADOS	37
4.7	CONSIDERAÇÕES SOBRE A ÉPOCA DE CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	39
4.8	ISOLAMENTO DO FUNGO	39
5	<u>CONCLUSÕES</u>	41
	<u>SUMMARY</u>	43
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA

1	MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, ALTURA E DIÂMETRO	32
2	MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, CLOROFILA E CAROTENO	33
3	MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO	35
4	MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, PESO SECO DA RAIZ, DA PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL	37

LISTA DE TABELAS

TABELA

1	FORMULAÇÃO DO MEIO DE CULTURA MMN	22
2	MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO DOS INÓCULOS ESTUDADOS	23
3	ANÁLISE QUÍMICA DO SUBSTRATO 1	24
4	ANÁLISE QUÍMICA DO SUBSTRATO 2	25
5	ANÁLISE QUÍMICA DOS SUBSTRATOS NO INÍCIO DO EXPERI- MENTO	25
6	QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MICORRIZAÇÃO ...	27
7	MÉDIAS DE GERMINAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA, ALTURA E DIÂME- TRO DO COLO E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F) PA- RA OS CONTRASTES	31
8	MÉDIAS DE CLOROFILA E CAROTENO E OS NÍVEIS DE SIGNI- FICÂNCIA (PROB. > F)	32
9	MÉDIAS DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO E OS NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F)	34
10	MÉDIAS DO PESO SECO DA RAIZ, DA PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F) PA- RA OS CONTRASTES	35

TABELA

11	NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA DO TESTE t PARA OS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO SIMPLES ESTUDADOS	36
12	MÉDIAS DE GERMINAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA, ALTURA, DIÂMETRO, MICORRIZAÇÃO, CLOROFILA, CAROTENO, NITROGÊNIO, FÓSFORO, POTÁSSIO, PESO SECO DA RAIZ, DA PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA DO TESTE F	38

RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade verificar os efeitos do fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp na infecção do sistema radicular de mudas de *Pinus taeda* produzidas em recipientes plásticos rígidos ("dibbling tube"), em casa de vegetação. Foram utilizados como inóculos, basidiosporos e basidiocarpos de *Scleroderma* sp e também solo de povoamento antigo. Os inóculos foram coletados na fazenda Canguiri, no Município de Piraquara de propriedade da Universidade Federal do Paraná. Foram testados dois substratos com diferentes proporções de turfa e vermiculita: substrato 1 (1 parte de vermiculita + 2 partes de turfa) e substrato 2 (3 partes de vermiculita + 2 partes de turfa). Os substratos receberam uma adubação de NPK (6-15-6), na dosagem de 1 g por tubete, através de irrigação, antes da sementeira. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, e quatro repetições. Nas parcelas foram testados os três inóculos e a testemunha e nas subparcelas os substratos. Foram avaliadas as seguintes variáveis: germinação, sobrevivência, altura, diâmetro, porcentagem de micorrização, pesos secos da raiz, da parte aérea e total, nitrogênio, fósforo e potássio foliar, clorofila e caroteno. Dentre os inóculos, os basidiocarpos revelaram ser tão eficientes quanto o solo de povoamento antigo, na produção de ectomicorrizas em mudas de *Pinus taeda*. Os substratos não apresentaram diferenças significativas para as diversas características avaliadas. A baixa porcentagem de micorrização verificada sugere que a fertilidade do substrato pode ter influenciado no grau de infecção das mudas. Foram feitas tentativas de isolamento do fungo em meio de cultura MMN, entretanto, as bifurcações micorrízicas não se desenvolveram.

1 INTRODUÇÃO

Observações e experimentos em diferentes partes do mundo mostraram que as plantas, principalmente da família *Pinaceae*, não crescem normalmente sem micorrizas. Portanto, é necessário um apropriado desenvolvimento micorrízico em mudas de *Pinus*, sobretudo em áreas onde as condições do meio são adversas, especialmente quanto à fertilidade do solo.

Na literatura estrangeira há informações detalhadas sobre o assunto, enquanto que, no Brasil, as pesquisas estão se iniciando. Os fungos ectomicorrízicos foram introduzidos, provavelmente, através de esporos em sementes, mudas envasadas ou solo de povoamentos florestais. Há também a possibilidade de algumas espécies já existirem no País.

Houve a disseminação sem, no entanto, ser conhecida sua identidade, eficiência simbiótica e capacidade de formar micorrizas em diferentes locais (TOMAZELLO FILHO & KRUGNER⁴¹).

O inóculo micorrízico utilizado no Brasil consiste da incorporação de acículas e/ou solo de povoamentos mais velhos, nos canteiros de produção de mudas. Esta prática, apesar de ser a mais utilizada no momento, apresenta algumas desvantagens, tais como dificuldade na obtenção e transporte do inóculo a longa distância, risco de disseminação de agentes de doenças, pragas e ervas daninhas e ainda, o desconhecimento

total sobre o fungo micorrízico que está sendo inoculado (TRAPPE⁴²).

A técnica de inocular, utilizando-se corpos de frutificação ou esporos de fungos micorrízicos em solos de viveiros tem sido usada de forma ampla em trabalhos experimentais. Este método apresenta muitas vantagens, como a facilidade de transporte do inóculo a grandes distâncias e a minimização de enfermidade (MIKOLA²⁶).

Para um bom desenvolvimento micorrízico das mudas é também muito importante o meio de crescimento, seja ele solo natural ou as várias misturas artificiais como, por exemplo, turfa e vermiculita, pois as condições do solo afetam o crescimento da planta e influencia o crescimento do fungo micorrízico (REID & HACSKAYLO³⁴).

O fungo ectomicorrízico *Scleroderma* pode ser encontrado na maioria dos reflorestamentos de *Pinus* no Estado do Paraná. TOMAZZELO & KRÜGNER afirmam que este gênero ocorre também em outros estados do sul do Brasil⁴¹.

Dentre as espécies plantadas, *Pinus taeda* é uma das mais utilizadas, por possuir características tecnológicas desejáveis pelas indústrias de papel e celulose, bem como para uso em serrarias.

Os reflorestamentos tendem, de maneira crescente, a serem instaladas em áreas degradadas ou marginais, as quais geralmente possuem baixa fertilidade do solo. Portanto, um conhecimento mais aprofundado sobre a relação simbiótica entre *Pinus taeda* e *Scleroderma*, se faz necessário.

Esta pesquisa visou determinar a eficácia de inoculação através de basidiosporos, basidiocarpos e solo de povoa-

mento antigo em dois diferentes substratos, em condições de casa de vegetação, objetivando uma futura utilização em ampla escala.

São objetivos deste trabalho:

- a) determinação do tipo de inóculo mais eficaz para o desenvolvimento micorrízico em *Pinus taeda*;
- b) determinação do melhor substrato para produção de mudas inoculadas com *Scleroderma*;
- c) isolamento e cultivo do fungo *Scleroderma* sp em meio seletivo para a produção de inóculo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A mais antiga associação simbiótica conhecida é a que existe entre fungos e algas formando os líquens. Há cerca de um século ficou também conhecida a associação simbiótica entre fungos e raízes (WENT & STARK⁴³).

FRANK* citado por MEYER²⁵, HARLEY⁷, MARKS & FOSTER¹⁴, SHTERENBERG & KOSTYUK³⁶, foi um dos pioneiros na pesquisa sobre esta simbiose, e quem concebeu o termo micorriza em 1885. Ele fez uma das melhores descrições preliminares sobre sua estrutura. Conforme sua teoria, o fungo micorrízico absorve água e nutrientes minerais do solo e os transloca à árvore, que em troca fornece o alimento necessário ao fungo.

2.1 CLASSIFICAÇÃO DA MICORRIZA

A classificação das micorrizas é baseada no arranjo de hifas do fungo no tecido da raiz (MARX & BRYAN²⁰). São classificadas em três grandes grupos: ectomicorrizas, endomicorrizas e ectoendomicorrizas (MARKS & FOSTER¹⁴).

2.1.1 Ectomicorrizas

As ectomicorrizas ocorrem naturalmente em importantes espécies florestais em várias regiões do mundo (MARK & BRYAN²⁰).

* FRANK, A.B. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber.Deutsch. Bot.Ges., 3, 1885.

São obrigatórias para a sobrevivência e nutrição de algumas espécies, como por exemplo, do gênero *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Carpinus*, *Fagus* e *Quercus*. Plantios destas espécies podem fracassar na ausência do fungo ectomicorrízico (MEYER²⁵). Nas *Pinaceae* são especialmente importantes, com todas as espécies sendo ectomicorrízicas (MARX & BRYAN²⁰).

O prefixo *ecto* significa que o fungo micorrízico se desenvolve nos espaços intercelulares do tecido da raiz (MARX¹⁶). Formam a chamada rede de Hartig, que é a principal característica das ectomicorrizas (MARKS & FOSTER¹⁴). Os tecidos meristemático e vascular da raiz não são infectados (MARX¹⁶).

O desenvolvimento da ectomicorriza inicia-se através da infecção com esporos ou hifas do fungo simbiote na rizosfera. O crescimento do fungo é estimulado, rapidamente, pelos exudados da raiz. Assim, as hifas envolvem toda a raiz, formando uma densa manta fúngica visível (MARX¹⁶).

Segundo ZAK, a ectomicorriza é geralmente uma estrutura distinta, diferindo claramente de uma raiz não micorrizada. É distinguida pela cor, forma, textura e várias características microscópicas particulares⁴⁵.

De acordo com MARX & BRYAN, os compostos que regulam o crescimento que são produzidos tanto pelo fungo como pela raiz, normalmente causam às células da raiz um aumento de crescimento, que resulta em mudança morfológica na sua estrutura. A estrutura das ectomicorrizas pode ser: simples, monopodial, bifurcada, coralóide ou em outras configurações. A maioria das ectomicorrizas têm coloração marrom, preta, cinza, branca, amarela, vermelha, ou uma combinação destas cores²⁰.

A maior parte dos fungos que formam ectomicorrizas em árvores florestais, são os Basidiomicetos, apesar de certos Ascomicetos e Gasteromicetos também serem simbióticos (HARLEY⁷).

2.1.2 Endomicorrizas

Nesta classe o fungo cresce no interior das células da raiz, não formando a rede de Hartig (PEYRONEL *et alii*³²). As hifas do fungo atravessam a parede celular e adentram as células corticais da raiz. Ali podem desenvolver estruturas especializadas em absorção, chamadas arbúsculos ou vesículas. Para designar este tipo é usado o termo *vesicular-arbuscular* abreviado como VA (MARX¹⁶).

Os fungos que formam endomicorrizas nas árvores são principalmente os Ficomicetos (HARLEY⁷).

2.1.3 Ectoendomicorrizas

Esta classe possui características tanto de ecto como de endomicorrizas. O fungo forma a rede de Hartig e também penetra no interior das células da raiz (PEYRONEL *et alii*³²). MARKS & FOSTER ressaltam que esta classe possui nas raízes infectadas uma grosseira rede de Hartig, uma manta delgada, e uma dicotomia pobre¹⁴. Estes mesmos autores em 1967 observaram que a penetração intracelular ocorre mais freqüentemente em tecidos que estão morrendo, onde as células corticais estão em colapso.

Esta associação micorrízica parece ser de menor importância ecológica que as outras duas classes anteriormente citadas (MARX & BRYAN²⁰).

2.2 BENEFÍCIOS DA MICORRIZA EM ESPÉCIES FLORESTAIS

Os fungos ectomicorrízicos beneficiam o crescimento e desenvolvimento das árvores de várias maneiras (MARX¹⁶). Plantas micorrizadas possuem uma maior superfície radicular para absorção de nutrientes e água do que plantas não micorrizadas (MARX & BRYAN²¹).

BOWEN & THEODOROU consideram que os fungos micorrízicos, beneficiam as plantas na absorção seletiva e acúmulo de íons e substâncias orgânicas, que dificilmente estariam disponíveis para plantas não micorrizadas¹. Segundo MARX, para que isto ocorra, estes fungos quebram certos complexos minerais e substâncias orgânicas encontradas no solo, transformando-os em nutrientes assimiláveis pelo vegetal. A absorção e o acúmulo são feitos através da manta fúngica. Elementos como nitrogênio, potássio e cálcio são absorvidos, acumulados e então translocados para os tecidos da raiz do hospedeiro¹⁶.

ZAK* citado por MARK sugere que raízes com micorrizas ectotróficas são menos susceptíveis do que as raízes não micorrizadas, à infecção causada por patógenos de raiz. Postula que o fungo micorrízico pode proteger as raízes das árvores dos seguintes modos:

- a) utilizando carboidratos e outros compostos da raiz e assim reduzindo a sua atratividade aos patógenos;
- b) promovendo uma barreira mecânica aos patógenos através da manta fúngica;
- c) secretando antibióticos que inibem ou matam os patógenos potenciais;

* ZAK, B. Role of micorrhizae in root disease. Annual. Rev. Phytopathology, 2: 377-92, 1964.

d) atraindo, durante a associação micorrízica com a raiz do hospedeiro, uma população de organismos antagônicos na rizosfera da planta^{15,17}.

Ectomicorrizas aumentam a tolerância de árvores à seca, à altas temperaturas e toxinas (orgânicas e inorgânicas), e a extremos de pH causados por alto nível de enxofre ou alumínio (MARK & BRYAN²⁰).

2.3 FATORES QUE AFETAM O DESENVOLVIMENTO MICORRÍZICO

Segundo MARX & BRYAN para se discutir estes fatores é necessário separar aqueles que afetam a árvore daqueles que afetam o fungo simbiote²⁰.

Os principais fatores que influenciam a susceptibilidade das raízes da planta à infecção micorrízica são a intensidade luminosa e a fertilidade do solo (MARX¹⁶, MARKS & FOSTER¹⁴). MARX ressalta também que a intensidade de luz e a disponibilidade de nutrientes influenciam o grau de desenvolvimento micorrízico¹⁶.

BJORKMAN* citado por SLANKIS observa que, o pré-requisito para formação de micorriza é um excesso de açúcar solúvel na raiz. Este excedente é produzido quando disponibilidade moderada de nitrogênio e fósforo se combina com alta intensidade luminosa³⁸.

A alta intensidade de luz e uma baixa a moderada fertilidade do solo acentuam o grau de desenvolvimento micorrízico. Extremos destas condições, como por exemplo, baixa

* BJORKMAN, E. The effect of strangulation on the formation of mycorrhiza in pine. Sv. Bot. Tidskr., 38(1), 1944.

intensidade luminosa e excessiva fertilidade do solo reduzem, ou podem até eliminar o desenvolvimento da micorriza (MARX & BRYAN²⁰).

Desfoliação parcial das plantas ou baixa intensidade luminosa reduzem a fotossíntese, diminuindo a quantidade de carboidratos solúveis que são translocados para as raízes, deste modo reduzindo o desenvolvimento micorrízico (MARX¹⁶; HACSKAYLO⁶).

Fatores que podem afetar diretamente o fungo simbiote, são aqueles que regulam a sobrevivência de propágulos infectivos (hifas ou esporos) ou o crescimento do simbiote da raiz (MARX & BRYAN²⁰, RAMBELLI³³). Extremos de temperatura, pH e umidade do solo ou presença de microorganismos antagônicos influenciam a sobrevivência do simbiote e assim, afetam o potencial micorrízico do solo (MARX¹⁶, MARKS & FOSTER¹⁴).

SLANKIS acentua que o mecanismo de formação da simbiose é mais complexo do que se possa inicialmente pensar. Em adição aos fatores nutricionais, os hormônios de crescimento do fungo simbiote são também envolvidos. Na sua opinião o relacionamento simbiótico, em ectomicorrizas, é baseado em uma condição fisiológica específica das raízes, que desenvolvem uma interação entre as auxinas do fungo e os metabólitos da raiz da planta hospedeira^{38,39}.

2.4 TIPOS DE INÓCULO DO FUNGO MICORRÍZICO

De acordo com MIKOLA, quatro tipos de inóculo têm sido utilizados para inoculação micorrízica:

- a) solo de povoamentos antigos;
- b) mudas micorrizadas;

- c) esporos e corpos de frutificação;
- d) cultura pura²⁷.

2.4.1 Solo de povoamentos antigos

O solo de florestas naturais, plantações ou viveiros é um tipo de inóculo micorrízico amplamente usado. A técnica de aplicação do inóculo varia de acordo com a prática do viveiro (MIKOLA²⁷).

Segundo MIKOLA a inoculação pode ser feita através da incorporação de solo micorrizado. O inóculo é espalhado sobre o canteiro e misturado completamente com o solo, manual ou mecanicamente. Quando a produção de mudas é feita em recipiente, o inóculo é misturado ao substrato antes do preenchimento dos mesmos. A quantidade suficiente do inóculo é de 10% do volume²⁸. Este tipo de inoculação tem o risco de disseminação de agentes fitopatogênicos, pragas e ervas daninhas (TRAPPE⁴²).

2.4.2 Mudanças micorrizadas

Consiste no transplante de mudas micorrizadas em canteiros de viveiros não infestado. Esta prática tem demonstrado ser um meio efetivo de inoculação (TRAPPE⁴²).

Segundo ROELOFFS*, citado por MIKOLA, foi na Indonésia que mudas micorrizadas foram usadas, pela primeira vez, como inóculo de novos viveiros²⁷.

De acordo com TRAPPE este método pode ser útil para manter a população de alguns fungos em viveiros, pelo menos

* ROELOFFS, J.W. Over Kungsymatige Verjonging van *Pinus merkusii* Jungh et de Vr. en *Pinus khasya* Royle. Tectona, 23: 874-905, 1930.

onde rotações de culturas de cobertura ou aplicações repetidas de biocidas não são necessárias para evitar doenças de viveiro e problemas com ervas daninhas⁴².

O uso de plantas vivas, como inóculo micorrízico em grande escala, não é comum. Uma das causas é que no transporte deste tipo de inóculo, de uma região para outra, são necessários cuidados especiais com as mudas. Isto não ocorre com o transporte de inóculo na forma de solo micorrizado (MIKOLA²⁸).

2.4.3 Esporos e corpos de frutificação

De acordo com ROBERTSON* citado por MIKOLA, o fungo micorrízico se dissemina facilmente na natureza, através de esporos e corpos de frutificação²⁷.

Esporocarpos maduros de fungo micorrízico são usados de várias maneiras para fornecer inóculo. Estes, verdes ou secos, são normalmente cortados em pedaços pequenos e misturados no solo de viveiro (BOWEN & THEODOROU¹).

Esporos podem ser usados na inoculação de maneira mais variada do que esporocarpos. Os esporos podem ser salpicados ou espalhados sobre o solo ou incorporados a ele. Hipoteticamente, eles podem até ser aplicados na irrigação (TRAPPE⁴²).

Teoricamente, o método de aplicar esporos para a inoculação do fungo micorrízico apresenta muitas vantagens, especialmente no transporte do inóculo a grandes distâncias. O peso e o volume são muito pequenos e o risco de disseminação

* ROBERTSON, N.F. Studies of the micorrhiza of *Pinus sylvestris*. I. The pattern of development of micorrhizal roots and its significance for experimental studies. New Phytol., 53: 253-83, 1954.

de doenças é reduzido ao mínimo. O esporo permanece vivo e viável durante um ano em condições secas (MIKOLA²⁶).

Embora basidiosporos de algumas espécies de fungo tenham provado ser inóculo efetivo, por razões ainda ignoradas, tentativas com outras espécies tem fracassado, no que se refere à produção de micorrizas (TRAPPE⁴²). Diferentes espécies ou ecótipos, devem requerer diferentes práticas de manejo para que a inoculação tenha sucesso (MIKOLA²⁷).

2.4.4 Cultura pura

Técnicas de inoculação com culturas puras, de fungos micorrízicos selecionados, estão sendo desenvolvidas por muitos pesquisadores há mais de 30 anos (MARX *et alii*²¹, TRAPPE⁴²). Teoricamente, o uso de culturas puras de fungos micorrízicos deveria ser o melhor método de inoculação.

Com o uso de culturas puras pode-se eleger as espécies de fungo e o risco de introdução de doenças é eliminado (MIKOLA²⁶). Pode-se também, através de trabalhos experimentais, conhecer quais as espécies de fungos são simbiotes mais benéficos, a forma de cultivar as espécies superiores para produzir quantidade suficiente de inóculo e o modo de efetuar a inoculação em condições práticas de viveiro ou de campo. Em todos estes aspectos os conhecimentos são ainda muito deficientes e por isso, a inoculação com cultura pura é pouco usada na silvicultura (MIKOLA²³).

Por outro lado, muitos trabalhos científicos têm utilizado cultura pura. A experiência comum de pesquisadores de todo mundo, mostra que muitos fungos micorrízicos crescem pouco ou não crescem na maioria dos métodos de cultura pura

experimentados. Desta maneira, o uso prático do inóculo puro é limitado até o presente. Alguns dos fungos que crescem bem em cultura pura têm também provado ser altamente benéficos para a sobrevivência e crescimento de mudas em campo (TRAPPE⁴²).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIA E TRATAMENTO DAS SEMENTES

Foram utilizadas neste trabalho sementes de *Pinus taeda* de procedência da Fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, Paraná.

. Teste de Germinação

No laboratório de sementes do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da EMBRAPA, foi feito teste para verificar a porcentagem de germinação das sementes. Como resultado, observou-se 68,2% de germinação.

. Quebra de Dormência e Desinfecção das Sementes

As sementes foram mergulhadas em água durante 48 horas em geladeira comum, à temperatura de 3°C. Após esse período foram eliminadas as sementes sobrenadantes, juntamente com a água. A quebra de dormência foi feita de acordo com as recomendações da Klabin do Paraná, que consiste em colocar as sementes em um recipiente, mantendo sempre a umidade, tendo o cuidado de processar um revolvimento diário das mesmas, sempre à temperatura de 2-5°C.

Para eliminar focos de contaminação por esporos de outros fungos micorrízicos, patogênicos ou saprófitas, as semen-

tes foram submetidas ao tratamento usual com Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) a 30% por 60 minutos, conforme o recomendado por MAGHEMBE & REDHEAD¹³.

Após estes tratamentos as sementes foram semeadas nos recipientes, na quantia de 2-3 sementes por recipiente e cobertas com vermiculita.

3.2 COLETA E PREPARO DOS INÓCULOS

O inóculo micorrízico consistindo de solo de povoamento antigo, corpos de frutificação de *Scleroderma* e esporos de *Scleroderma*, foram coletados em povoamento de *Pinus elliottii* com 20 anos de idade, na Fazenda Canguiri, no Município de Piraquara, de propriedade da Universidade Federal do Paraná.

Todos os inóculos foram incorporados ao substrato antes do preenchimento dos recipientes, como recomenda MIKOLA²⁸.

. Basidiosporos

Foram retirados dos corpos de frutificação maduros, já secos, e armazenados em vidros à temperatura ambiente.

A incorporação foi na proporção de 10 g/3 l de substrato. Nesta proporção MAGHEMBE & REDHEAD¹³ chegaram à conclusão que basidiosporos de *Scleroderma dictyosporum* é um meio efetivo de inóculo ectomicorrízico para mudas de *Pinus caribaea*.

. Basidiocarpos

Somente basidiocarpos maduros e livres de danos causados por insetos ou animais foram usados. Logo após a coleta seus esporos foram retirados manualmente, na medida do possível, e em seguida colocados para secar em casa de vegetação

comum. Quando já secos foram batidos em liquidificador, para que fossem reduzidos a pequeno diâmetro. A proporção do inóculo foi de 10% do volume do substrato de acordo com BOWEN & THEODOROU¹.

. Solo de povoamento antigo

O solo foi retirado de uma profundidade de aproximadamente 10 cm, em seguida foi passado em peneira com malha de 5 mm para eliminar resíduos indesejáveis (pedras, raízes, etc...) e misturado na proporção de 10% do volume do substrato. De acordo com MIKOLA²⁸, esta quantidade de inóculo é suficiente.

3.3 SUBSTRATO

Foram usados como substratos duas diferentes misturas compostas de turfa e vermiculita. As mudas foram produzidas em recipientes do sistema "dibbling tube", que é composto por tubos de plástico rígido em bandejas de isopor.

. Misturas Utilizadas

Os substratos utilizados foram compostos de turfa e vermiculita combinados em duas diferentes proporções, sendo: 2 partes de turfa + 1 parte de vermiculita e 2 partes de turfa + 3 partes de vermiculita. Estas misturas foram usadas por CAMPINHOS *et alii*³, mostrando-se eficientes para produção de mudas de *Pinus* sp e *Eucalyptus* sp por semente em sistema "dibbling tube".

. Desinfecção e Inoculação

A turfa e a vermiculita foram fumigadas, separadamente com Brometo de Metila, à taxa de 200 g/m³ de substrato, antes de ser efetuada a inoculação e permaneceram cobertas, com polietileno, por 72 horas e em seguida deixados ao ar livre, de acordo com MAGHEMBE & REDHEAD¹³. Após 36 horas sem cobertura os substratos foram manuseados.

As misturas foram feitas nas proporções acima descritas e após inoculadas foram colocadas nos devidos recipientes e levadas à casa de vegetação. As bandejas que continham os substratos onde não foi adicionado nenhum tipo de inóculo (testemunha) foram levadas à casa de vegetação antes das bandejas que receberam inoculação, para evitar contaminação.

. Análise Química

Foram feitas duas análises químicas dos substratos, uma no início do experimento, sem adubação, e outra no final.

As análises químicas dos substratos foram feitas no laboratório de Solos e Nutrição Mineral do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, segundo Manual de Métodos de Análise de Solos da EMBRAPA⁴.

. Adubação

Foi efetuada, antes da semeadura uma única adubação através de irrigação, com NPK na formulação 6-15-6, com dosagem de um grama por recipiente, conforme CAMPINHOS *et alii* que fizeram oito aplicações, com a mesma dosagem de NPK na formulação (5-17-3) na produção de mudas de *Pinus*³.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

A pesquisa foi instalada em casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da EMBRAPA em Colombo, Paraná.

3.4.1 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, em parcelas subdivididas. Nas parcelas foram testadas os 3 tipos de inóculos e uma testemunha; nas subparcelas foram testados 2 substratos.

Os inóculos foram: basidiosporos (BP), basidiocarpos (BC), solo de pov. antigo (PA) e testemunha (sem inóculo) (T). Os tipos de substratos foram: S_1 (uma parte de vermiculita + 2 partes de turfa) e S_2 (3 partes de vermiculita + 2 partes de turfa).

O experimento teve 4 blocos. Cada parcela foi constituída por 48 mudas com bordadura simples, efetuando-se as medições nas 24 mudas centrais.

Para comparação entre inóculos, foi utilizado o teste F para contrastes ortogonais, comparando-se a micorrização média de PA + BC com a micorrização média de T + BP e também comparou-se PA com BC e T com BP. Esses contrastes foram estabelecidos em função da hipótese de ocorrência de micorrização inferior na testemunha e esporos, em relação a basidiocarpos e solo de povoamento antigo, e também pelo interesse em comparar a testemunha com basidiosporos e basidiocarpos com solo de povoamento antigo.

3.4.2 Instalação do Experimento

Foram utilizadas 16 bandejas com recipientes de plástico rígido do sistema "dibbing tube".

Foram semeadas 2-3 sementes por tubete e ao final de 40 dias foi realizado o raleamento e onde necessário a repicagem dentro da mesma parcela, de modo a obter-se uma muda por recipiente.

3.4.3 Avaliações

. Porcentagem de Germinação e Sobrevivência

A germinação foi avaliada 40 dias após a segunda semeadura, através da contagem. Uma primeira semeadura foi eliminada devido à baixa porcentagem de germinação, provavelmente influenciada pela baixa temperatura. A sobrevivência foi avaliada através de contagem no final do experimento.

O tempo de duração do experimento foi de cinco meses e meio (Junho à Novembro de 1985).

. Porcentagem de Micorrização

A avaliação foi feita no final do experimento, para 4 mudas por parcela, aleatoriamente escolhidas, através de estimativa visual, seguindo a metodologia de MARX & BRYAN¹⁹.

. Altura e Diâmetro do Colo

A altura foi medida em cm com auxílio de uma régua. Considerou-se altura, a medida desde o colo até a extremidade mais alta das acículas. O diâmetro do colo foi medido em mm utilizando-se um paquímetro. As duas variáveis foram avaliadas no final do experimento.

. Peso Seco da Raiz e da Parte Aérea

Foi avaliado no final do experimento, em estufa a 65°C, até obter peso constante, para 4 mudas por parcela. As mudas foram as mesmas utilizadas para a avaliação da porcentagem de micorrização.

. Estado Nutricional

A análise foliar foi feita no Laboratório de Solos e Nutrição Mineral do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da EMBRAPA.

Foram avaliados nitrogênio, fósforo e potássio, através de análise química foliar, no final do experimento, para uma amostra por parcela, composta de dez mudas aleatoriamente escolhidas.

. Determinação do Conteúdo de Clorofila

Para extração de clorofila das folhas foi usado o método descrito por RÖBBELEN* citado por INOUE⁹.

Avaliada no final do experimento, para uma amostra composta por duas mudas por tratamento por bloco. A concentração foi calculada em mg/g de peso seco de acículas.

3.5 ISOLAMENTO DO FUNGO

Foram efetuadas três tentativas de isolamento do fungo ectomicorrízico *Scleroderma*. Para cada tentativa utilizou-se

* RÖBBELEN, G. Untersuchungen an Strahlinduzierten Blattfarbmutanten von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Z.F. indust. Arbstammungs und Vererbungslehre, 88: 189-252, 1957.

200 tubos de ensaio. De acordo com MOLINA & PALMER o uso de tubos é melhor que placas de Petri, pois estão menos sujeitos à contaminação. Os mesmos autores afirmam que 200 tubos de ensaio por tentativa são suficientes²⁹. As tentativas de isolamento obedeceram as etapas utilizadas por ZAK & BRYAN⁴⁶ e ZAK & MARX⁴⁷. As etapas são as seguintes:

- a) coletar raízes micorrizadas no campo;
- b) lavar em água corrente;
- c) cortar em pedaços menores;
- d) colocar em frascos plásticos perfurados, que serão por sua vez, mergulhados em recipientes contendo um detergente comum na dosagem de 3 gotas/100 ml por 2 a 3 minutos;
- e) retirar os frascos do detergente;
- f) colocar em cloreto de mercúrio (HgCl_2) por um minuto;
- g) passar em água destilada e esterilizada por seis vezes, durante 10 minutos cada vez;
- h) colocar em placa de petri esterilizada;
- i) passar para outra placa esterilizada, de modo a retirar o excesso de água;
- j) cortar as bifurcações (micorrizas) da raiz com auxílio de um bisturi, em condições assépticas;
- k) passar para um tubo de ensaio, com ágar inclinado, contendo o meio de cultura MMN, descrito 3.6.1;
- l) colocar em estufa à temperatura de 25-26°C e observar o desenvolvimento do fungo.

Os tubos permaneceram na estufa por 4 semanas, de acordo com MOLINA & PALMER, o crescimento do fungo ocorre de

2 a 4 semanas após o isolamento²⁹. Nesse período foram feitas freqüentes observações para verificar se havia desenvolvimento do fungo.

3.5.1 Meio de Cultura MMN (MELIN-NORKRANS MODIFICADO)

Segundo MARX este meio proporciona condições nutricionais comparáveis com as do fungo micorrízico¹⁵. Seu pH deve situar-se entre 5,5 a 5,7.

A fórmula do meio de cultura MMN é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1. FORMULAÇÃO DO MEIO DE CULTURA MMN

Ingrediente	Solução estoque	Meio
CaCl ₂	10 g/l	5 ml
NaCl	5 g/l	5 ml
KH ₂ PO ₄	100 g/l	5 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	50 g/l	5 ml
MgSO ₄ 7 H ₂ O	30 g/l	5 ml
FeCl ₃ (1%)	1,66 g/100 ml	1,2 ml
Tianina HCl	0,1 g/100 ml	1,0 ml
Extrato de Malte	3 g/l	3,0 ml
Glicose	10 g/l	10 ml
Ágar	15 g/l	15 ml
Água destilada	1.000 ml	1.000 ml

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICORRIZAÇÃO

As médias de micorrização dos inóculos estudados são apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2. MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO DOS INÓCULOS ESTUDADOS

INÓCULOS	MICORRIZAÇÃO (%)
Basidiosporos	5,04
Basidiocarpos	20,78
Solo pov. antigo	19,24
Testemunha	13,82
Média	14,01

A micorrização média obtida neste estudo foi de 14,01% (Tabela 2). Ela pode ser considerada relativamente baixa quando comparada com trabalhos de outros autores (INOUE⁸, MAGHEMBE & REDHEAD¹³, MARX & ARTMAN¹⁸, OLIVEIRA³⁰) que obtiveram, para os melhores tratamentos, porcentagens de micorrização de até 60%.

A provável causa desta baixa micorrização pode ser atribuída a alta fertilidade dos substratos verificada no final do experimento. A análise química dos substratos são apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5.

TABELA 3. ANÁLISE QUÍMICA DO SUBSTRATO 1

INÓCULOS	pH	Alumínio m.e.%	Ca + Mg m.e.%	Fósforo p.p.m.	Potássio p.p.m.	Matéria orgânica (%)
Basidiosporos	6,1	-	33,0	85	609	23,0
Basidiocarpos	6,2	-	30,0	114	567	22,0
Solo pov. antigo	6,5	-	34,0	104	567	25,0
Testemunha	6,6	-	35,0	79	588	21,5

TABELA 4. ANÁLISE QUÍMICA DO SUBSTRATO 2

INÓCULOS	pH	Alumínio m.e.%	Ca + Mg m.e.%	Fósforo p.p.m.	Potássio p.p.m.	Matéria orgânica (%)
Basidiosporos	6,4	-	34,0	98	651	22,0
Basidiocarpos	6,2	-	36,0	117	483	19,0
Solo pov. antigo	6,5	-	33,0	137	651	24,0
Testemunha	6,6	-	28,0	151	777	21,5

TABELA 5. ANÁLISE QUÍMICA DOS SUBSTRATOS NO INÍCIO DO EXPERIMENTO

SUBSTRATOS	pH	Alumínio m.e.%	Ca + Mg m.e.%	Fósforo p.p.m.	Potássio p.p.m.	Matéria orgânica (%)
S ₁	5,3	1,3	15,0	16	31	26,0
S ₂	5,3	1,3	15,1	17	49	26,1

Esses resultados mostram que a adubação efetuada antes da semeadura aumentou os níveis de cálcio + magnésio, fósforo e potássio dos substratos de maneira significativa. A análise química dos substratos antes da adubação são apresentadas na Tabela 5.

A baixa micorrização possivelmente ocasionada pela alta fertilidade está de acordo com os resultados encontrados por MAGHEMBE & READHEAD¹³; MARX *et alii*²² e REID & HACSKAYLO³⁴, ou seja, de que altas taxas de nutrientes influenciam negativamente o desenvolvimento micorrízico do sistema radicular da muda.

A alta fertilidade do substrato influi na concentração interna de carboidratos solúveis na raiz, diminuindo a suscetibilidade das raízes para a infecção do fungo ectomicorrízico (HARLEY⁵).

De acordo com KRAMER & KOZLOWSKI, uma abundância ou carência de nutrientes no solo acarreta uma rápida utilização dos hidratos de carbono pela planta, não se verificando nas raízes quantidades suficientes dos mesmos capazes de estimular as relações microrganismo - planta¹⁰.

A análise de variância da micorrização é apresentada na Tabela 6.

Na análise dos resultados observa-se que não houve diferença significativa entre substratos e nem na interação dos inóculos e substratos. Para inóculos houve uma significância a nível de 7% entre os tratamentos.

As médias de micorrização no caso da inoculação por basidiocarpos (20,78%) e por solo de povoamento antigo (19,24%) além de muito próximas foram melhores, quando comparadas com

TABELA 6. QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA MICORRIZAÇÃO

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	F	PROB. > F
Inóculo	(3)	330.5083	3,3231	0,070
BC + PA vs. BP + T	1	673,2857	6,7696	0,027
BC vs PA	1	4.8628	0,0489	0,823
BP vs T	1	313.3769	3,1509	0,107
Resíduo A	9	99.4579		
Substrato	1	1.7720	0,0666	0,795
Inóculo x Substrato	3	60.1076	2,2581	0,133
Resíduo B	12	26.6182		

a micorrização causada pelos basidiosporos (5,04%) e a detectada na testemunha (13,82%), revelaram uma superioridade ao nível de 2,7% de significância.

Este resultado mostra que as práticas de inoculação usando basidiocarpos ou solo de povoamento antigo, são as mais eficientes em relação à micorrização.

A eficiência da técnica de inoculação por solo de povoamento antigo foi estudada por vários autores (INOUE⁸, HACSKAYLO⁵, MIKOLA²⁸, OLIVEIRA & BARROS³¹) que obtiveram resultado positivos.

WRIGHT trabalhando com mudas de *Pinus ponderosa* obteve uma boa micorrização do sistema radicular quanto utilizou como inóculo basidiocarpos do fungo ectomicorrízico *Xerocomus* sp.⁴⁴. Semelhantes resultados foram obtidos por MARK & KENNEY, usando como fonte de inóculo basidiocarpos de *Rhizopogon luteolus* em mudas de *Pinus radiata*²³.

Foi observado que não houve diferença significativa na porcentagem de micorrização do sistema radicular das mudas inoculadas com basidiocarpos (20,78%) ou solo de povoamento antigo (19,24%). Isto significa que a capacidade de infecção dos dois inóculos é semelhante. Esta semelhança pode ser explicada pelo fato de, solo de povoamento antigo levar em sua constituição uma grande variedade de inóculos micorrízicos, como o micélio e esporos de diferentes fungos, enquanto os basidiocarpos trazem consigo não só o tecido do fungo, mas também os esporos.

De acordo com MARX & KENNEY, a inoculação com basidiocarpos tem algumas vantagens sobre o inóculo de solo de povoa-

mento antigo. Além de conhecermos o fungo que estamos inoculando, não traz consigo fungos fitopatogênicos e o volume do inóculo é pequeno, o que facilita o transporte a grandes distâncias²³.

Desta forma, a inoculação com basidiocarpos, que obtém média muito próxima ao inóculo de solo de povoamento antigo, pode ser utilizada na infecção micorrízica de mudas de viveiro com a mesma eficiência e com as vantagens de facilidade de transporte e diminuição dos riscos de contaminação.

Basidiosporos e testemunha não apresentaram resultados significativamente diferentes para a porcentagem de micorrização.

Apesar da não significância, observou-se pelas médias dos tratamentos que a testemunha apresentou uma porcentagem de micorrização (13,82%) quase duas vezes superior à porcentagem apresentada por basidiosporos (5,04%).

Os estudos já realizados para a inoculação micorrízica, através de esporos, com a infecção do sistema radicular de mudas produzidas em viveiro ou casa de vegetação nos mostram que nem sempre, os resultados são positivos.

Isto, provavelmente, está relacionado à falta de conhecimento dos fatores que governam a germinação dos basidiosporos (LAMB & RICHARDS¹¹) e também por não se saber a quantidade de inóculo ideal a ser adicionada no substrato. Um excesso de esporos pode causar a inibição do seu desenvolvimento, talvez pela emissão de toxinas expelidas por ele próprio (MARX *et alii*²⁴). BULMER relata que a porcentagem de germinação de esporos de algumas espécies de fungos, mesmo sob condições ideais de laboratório é muito baixa². Diferentes espécies requerem diferentes práticas de manejo (TRAPPE⁴²).

No presente trabalho, a inoculação com basidiosporos não foi efetiva. Novos estudos no sentido de encontrar a quantidade ideal a ser inoculada, bem como, os fatores que governam a germinação dos basidiosporos revelam-se como necessários. Pesquisas neste sentido são justificadas pelo pouco volume, fácil manuseio e armazenamento deste inóculo.

A porcentagem de micorrização encontrada nas mudas que não receberam nenhum tipo de inóculo (testemunha), deixou claro que houve contaminação das mudas neste tratamento.

A contaminação pode ser explicada pelo fato do experimento ter sido instalado, em casa de vegetação, onde o controle da temperatura é feito pela abertura ou fechamento do teto e das janelas laterais. Com isso, ficou facilitado que esporos, oriundos da parte exterior, infectassem as mudas. Isto não invalida os resultados já que a produção de mudas em larga escala pelas empresas, normalmente, é feita em viveiro ao ar livre, onde a contaminação é fato normal.

Embora não se possa afirmar qual fungo causou a contaminação, as características morfológicas das micorrizas encontradas nas mudas inoculadas e na testemunha foram semelhantes. Também, a abundante quantidade de basidiocarpos de *Scleroderma* sp encontrada nos povoamentos de *Pinus* sp próximo ao local onde estava instalado o experimento, leva a crer que, pelo menos boa parte desta contaminação foi provocada pelo próprio fungo estudado.

4.2 GERMINAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA, ALTURA E DIÂMETRO

As médias e os níveis de significância do teste F para contrastes são apresentadas na Tabela 7.

TABELA 7. MÉDIAS DE GERMINAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA, ALTURA E DIÂMETRO DO COLO E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F) PARA OS CONTRASTES

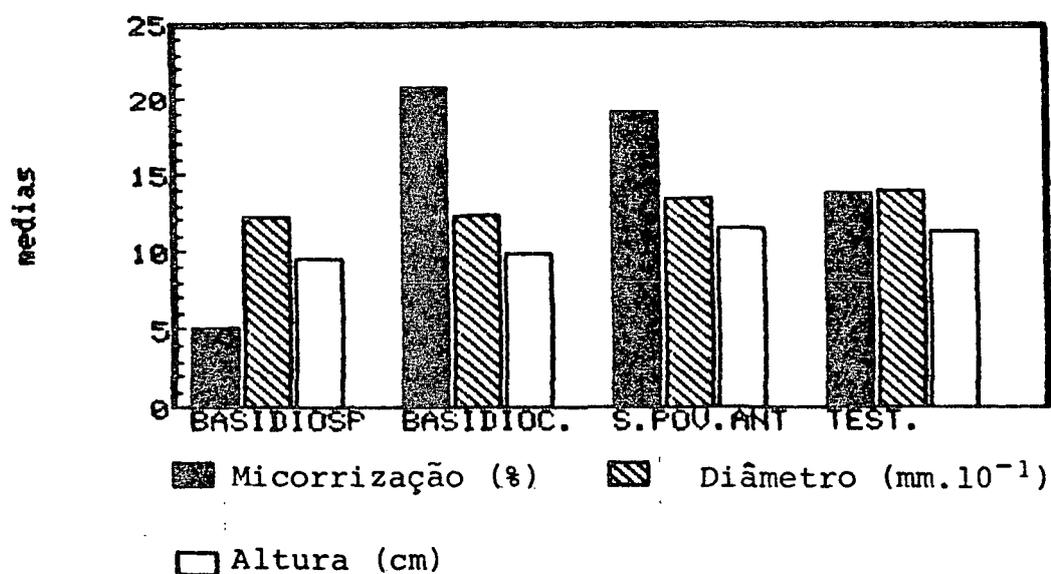
INÓCULOS	Germinação (%)	Sobrevivência (%)	Altura (cm)	Diâmetro do colo (mm)
Basidiosporos	85,53	98,14	9,62	1,22
Basidiocarpos	63,95	97,58	9,97	1,25
Solo pov. antigo	84,21	99,57	11,55	1,34
Testemunha	87,59	99,93	11,37	1,40
(BP + T) x (BC + PA)	0,04	0,75	0,70	0,79
BC x PA	0,03	0,50	0,13	0,64
BP x T	0,75	0,59	0,09	0,08

Observou-se que não houve diferença significativa para sobrevivência, altura e diâmetro, nos contrastes analisados. No entanto, para germinação, dois contrastes, foram significativos devido a influência da inoculação com basidiocarpos, onde ocorreu a menor germinação (63,95%) bem abaixo dos demais tratamentos que oscilaram entre 84,21% e 87,59%.

Nenhuma explicação pode ser oferecida para este fato. Nem a literatura consultada apresenta explicação para esta ocorrência.

As médias de micorrização, diâmetro e altura são apresentadas na Figura 1.

FIGURA 1. MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, ALTURA E DIÂMETRO



4.3 CLOROFILA E CAROTENO

As médias e os níveis de significância de F para contrastes são apresentadas na Tabela 8.

TABELA 8. MÉDIAS DE CLOROFILA E CAROTENO E OS NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F)

INÓCULOS	Clorofila (mg.g ⁻¹)	Caroteno (mg.g ⁻¹)
Basidiosporos	2,76	0,84
Basidiocarpos	2,90	0,68
Solo pov. antigo	2,56	0,68
Testemunha	2,65	0,50
Prob. > F	0,25	0,11

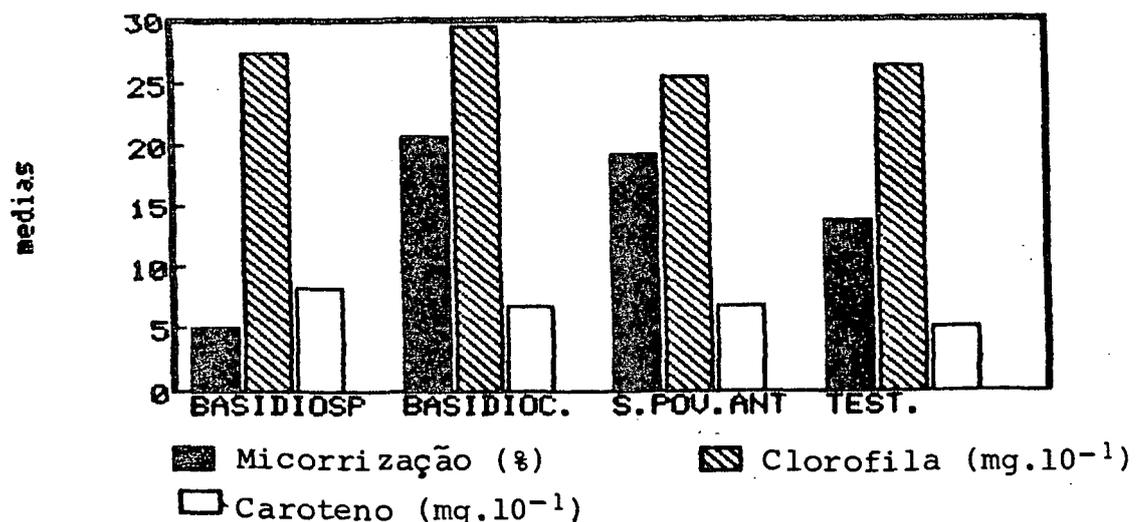
Os valores encontrados de F indicam que os inóculos testados não influenciaram de maneira diferenciada, a quantidade de clorofila e caroteno existente nas mudas.

Com relação a clorofila, SHEMAKHANOVA relata que existem muitos poucos trabalhos determinando o conteúdo de clorofila em plantas micorrizadas. Este autor trabalhando com mudas de *Pinus* sp e carvalho, de um e dois anos de idade, concluiu que para *Pinus* sp a quantidade de clorofila, em mudas com intenso desenvolvimento micorrízico, foi maior que em mudas não micorrizadas. Já para as mudas de carvalho, que não tinham um grande desenvolvimento micorrízico não foi detectada diferença no conteúdo de clorofila, entre as mudas micorrizadas e não micorrizadas³⁵.

O fato de o conteúdo de clorofila não diferir significativamente entre os tratamentos pode estar relacionado com baixa micorrização encontrada.

As médias de micorrização, clorofila e caroteno são apresentadas na Figura 2.

FIGURA 2. MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, CLOROFILA E CAROTENO



4.4 NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO (NPK FOLIAR)

As médias e os níveis de significância de F para contrastes, são apresentadas na Tabela 9.

TABELA 9. MÉDIAS DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO E OS NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F)

INÓCULOS	N (%)	P (%)	K (%)
Basidiosporos	1,65	0,10	1,81
Basidiocarpos	1,68	0,14	1,82
Solo pov. antigo	1,51	0,11	1,61
Testemunha	1,53	0,11	1,82
Prob. > F	0,22	0,11	0,12

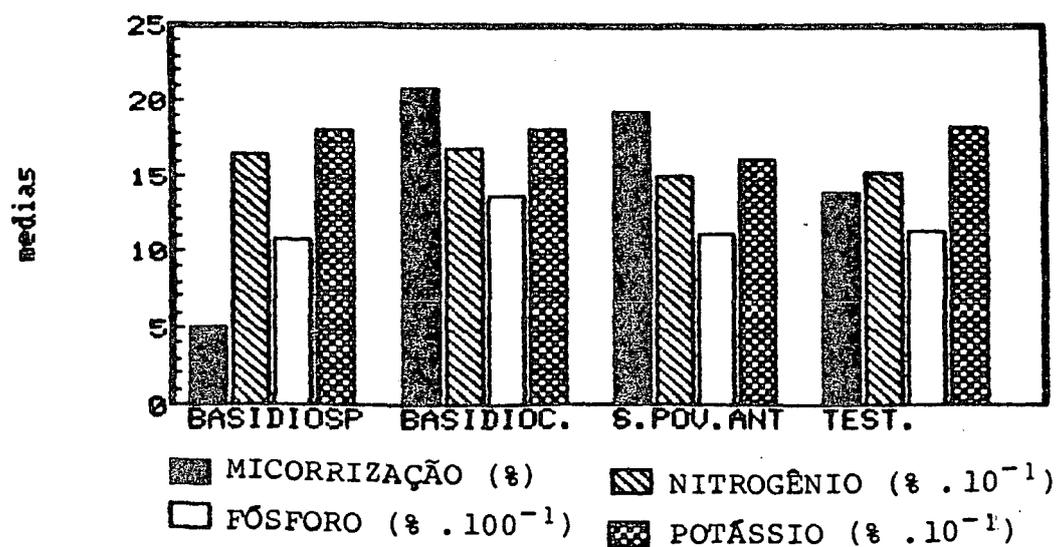
Os níveis de nitrogênio, fósforo e potássio obtidos pela análise foliar das mudas não apresentaram diferenças devido aos vários inóculos.

Os níveis de nitrogênio, fósforo e potássio podem ser considerados adequados, quando comparados com os dados obtidos em outras coníferas (LEAF¹²).

MAGHEMBE & READHEAD trabalhando com mudas de *Pinus caribaea* inoculadas com basidiosporos de *Scleroderma dictyosporum*, em diferentes níveis de adubação, obtiveram resultados semelhantes, aos encontrados no presente estudo¹³.

As médias de micorrização, nitrogênio, fósforo e potássio são apresentadas na Figura 3.

FIGURA 3. MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO



4.5 PESO SECO DA RAIZ, DA PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL

As médias e os níveis de significância de F dos contrastes são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. MÉDIAS DO PESO SECO DA RAIZ, DA PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F) PARA OS CONTRASTES

INÓCULOS	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raiz (g)	Peso seco total (g)
Basidiosporos	0,78	0,24	1,02
Basidiocarpos	0,90	0,34	1,24
Solo pov. antigo	1,13	0,37	1,50
Testemunha	1,00	0,35	1,35
(BP + T) (BC + PA)	0,27	0,31	0,27
BC x PA	0,16	0,71	0,27
BP x T	0,18	0,17	0,16

A análise de variância e os contrastes não detectaram diferença entre os tratamentos para nenhum dos pesos secos avaliados. Entretanto, os coeficientes de correlação simples apresentaram alta significância entre micorrização e peso seco tanto da raiz, como da parte aérea e peso seco total. Os valores das correlações são apresentadas na Tabela 11.

TABELA 11. NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA DO TESTE t PARA OS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO SIMPLES ESTUDADOS

Correlações simples	Valor r	Valor t
Micorrização e peso seco raiz	0,63	4,49**
Micorrização e peso seco parte aérea	0,40	2,41*
Micorrização e peso seco total	0,49	3,11**

** - Significativo a 1%

* - Significativo a 5%

A correlação verificada entre a micorrização e o peso seco das mudas vem a confirmar os efeitos benéficos da micorrização sobre a produção de matéria seca encontrada em estudos anteriores (MAGHEMBE & READHEAD¹³, OLIVEIRA & BARROS³¹, THEODOROU & BOWEN⁴⁰, TRAPPE⁴²).

Em mudas, o peso seco é o indicador mais sensível da influência micorrízica (SINCLAIR & MARX³⁷). TRAPPE⁴², sugere pesar-se raiz e parte aérea separadamente, porque alguns fungos influenciam o desenvolvimento da raiz e da parte aérea diferentemente.

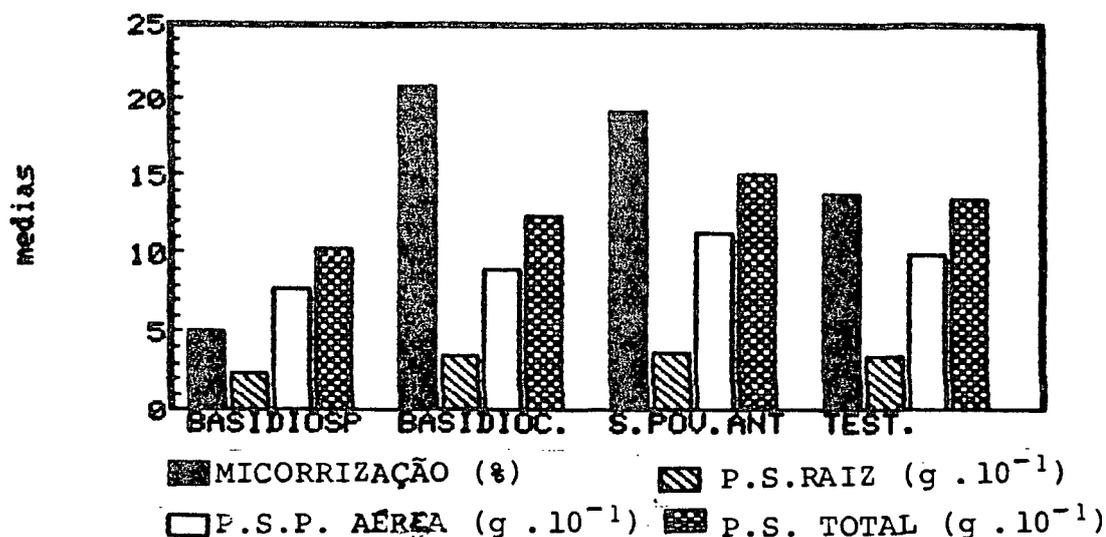
Conforme se observa na Tabela 11 houve uma maior influência da micorrização no peso seco da raiz do que no peso

seco da parte aérea. O peso seco total da muda, conseqüentemente, mostrou-se também influenciado pela micorrização, a nível de 1% de significância.

De acordo com SINCLAIR & MARX, esta influência é explicada pelo fato dos tecidos do fungo, também contribuírem, significativamente, no peso total das raízes em mudas micorrizadas³⁷.

As médias de micorrização, peso seco da raiz, da parte aérea e peso seco total são apresentadas na Figura 4.

FIGURA 4. MÉDIAS DE MICORRIZAÇÃO, PESO SECO DA RAIZ, DA PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL



4.6 AVALIAÇÃO DOS SUBSTRATOS TESTADOS

As médias das características avaliadas nos dois substratos testados e o valor de F são apresentados na Tabela 12.

As diversas características avaliadas mostraram não haver diferença significativa entre os dois substratos testados.

TABELA 12. MÉDIAS DA GERMINAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA, ALTURA, DIÂMETRO, MICORRIZAÇÃO, CLOROFILA, CAROTENO, NITROGÊNIO, FÓSFORO, POTÁSSIO, PESO DA RAIZ, DA PARTE AÉREA E PESO SECO TOTAL E NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA (PROB. > F)

SUBSTRATOS	Germi- nação (%)	Sobrevi- vência (%)	Altura (cm)	Diâmetro do colo (mm)	Micorri- zação (%)	Cloro- fila mg/g	Caro- teno mg/g	N (%)	P (%)	K (%)	Peso seco raiz (g)	Peso seco parte aérea(g)	Peso seco Total (g)
S ₁	84,03	99,87	10,32	1,24	20,21	2,66	0,72	1,58	0,11	1,77	0,31	0,88	1,19
S ₂	77,83	97,57	10,93	1,36	20,74	2,78	0,62	1,60	0,12	1,77	0,34	1,02	1,36
Prob. > F	0,28	0,09	0,21	0,03	0,80	0,59	0,17	0,72	0,59	0,99	0,63	0,10	0,27

Isto pode ser explicado pelo fato de que apesar do substrato 1 (33,33% vermiculita + 66,66% turfa) e do substrato 2 (60% vermiculita + 40% turfa) terem composições físicas diferentes, eles apresentaram uma composição química muito similar, com valores muito próximos para o pH, alumínio, cálcio + magnésio, fósforo e matéria orgânica. O conteúdo de potássio variou um pouco mais. A análise química de cada substrato está apresentada na Tabela 5.

4.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ÉPOCA DE CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Devido às condições climáticas do período de inverno na região de Curitiba, não é ideal a produção de mudas nesta época do ano. Contudo, as dificuldades na obtenção dos materiais fez com que a instalação do experimento só fosse possível no mês de maio, quando foi realizada a primeira semeadura.

A baixa temperatura deve ter influenciado na germinação das sementes, que ocorreu de maneira não uniforme. A porcentagem de germinação foi muito baixa, o que motivou uma segunda semeadura no mês de junho. Apenas as mudas resultantes da segunda semeadura foram consideradas, sendo eliminadas as da primeira semeadura.

A época de condução do experimento pode, portanto, ter influenciado outras variáveis avaliadas, como por exemplo a altura e o diâmetro das mudas, mas provavelmente não influenciou o índice de infecção.

4.8 ISOLAMENTO DO FUNGO

Efetuada o isolamento conforme descrito na seção 3.6 foram feitas por quatro semanas observações diárias do material

isolado, que permaneceu inalterado, sem nenhum crescimento visível do fungo ou qualquer outro microrganismo.

Os fungos ectomicorrízicos podem variar extremamente, no que se refere ao seu desenvolvimento em meio de cultura, isto devido à falta de conhecimento da exigência nutricional requerida por parte de cada espécie. Por isso, estudos nutricionais são necessários para conseguir induzir estas espécies a crescer em meios de cultura pura (MOLINA & PALMER²⁹).

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, conclui-se que:

- a) basidiocarpos revelaram ser tão eficientes quanto solo de povoamento antigo na micorrização do sistema radicular das mudas de *Pinus taeda*, sendo portanto o mais indicado devido às vantagens que proporciona;
- b) basidiosporos mostraram não ser capazes de infectar, o sistema radicular das mudas, de maneira eficiente;
- c) um maior grau de micorrização correlacionou-se positivamente com um maior peso seco de muda;
- d) considerando que tanto o substrato 1 (uma parte de vermiculita + duas partes de turfa) como o substrato 2 (três partes de vermiculita + duas partes de turfa) pode ser utilizado na produção de mudas com a mesma eficiência, o fator limitante na utilização dos mesmos passa a ser seus custos que devem ser determinados pelas empresas para melhor decidir sobre qual substrato adotar;

e) o baixo índice de micorrização verificado sugere que a fertilidade do substrato influenciou no grau de infecção das mudas;

f) as condições testadas não foram adequadas ao desenvolvimento do fungo no meio de cultura, através de isolamento via bifurcações micorrízicas.

SUMMARY

The purpose of this work was to study the effect of ectomycorrhizal fungus *Scleroderma* sp on the infection of roots of seedlings of *Pinus taeda* grown in rigid plastic containers (dibbling tube), in a greenhouse. There were utilized three kinds of inocula: basidiospores of *Scleroderma* sp, basidiocarps of *Scleroderma* sp and top soil of old pine plantation. The inocula were collected in the Canguiri Experimental Station, Municipality of Piraquara, state of Paraná. There were tested two substrates with different proportions of vermiculite and peat humus: substrate 1 (1 part of vermiculite + 2 parts of peat humus) and substrate 2 (3 parts of vermiculite + 2 parts of peat humus). One fertilization of NPK (6-15-6) 1 g per container, was applied through irrigation before sowing. The experimental design was randomized complete block with split-plot, with four repetitions. Plot treatments were three inocula and the control and the split-plots were the substrates. There were estimated the following variables: germination; survival; height; collar diameter; percentage of mycorrhizae; root, aerial and total dry weight; nitrogen, phosphorus and potassium content of needles; chlorophyll and carotene. Among the inocula basidiocarps were as efficient as soil of old pine plantation, in the production of ectomycorrhizae in seedlings of *Pinus taeda*. The substrates presented no significant difference for the various evaluated characteristics. The low mycorrhizal development detected suggests that substrate fertility has influenced in the degree of infection of the seedlings. It was attempted the isolation of the fungus in MMN culture media. However, the mycorrhizal bifurcations presented no development.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOWEN, E.D. & THEODOROU, C. Growth of ectomycorrhizae fungi around seeds and roots. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 107-50.
2. BULMER, R.G.S. Spore germination of forty-two species of puffballs. Micologia, 56: 630-32, 1964.
3. CAMPINHOS, E.; IKEMORI, Y.K. & MARTINS, F.C.G. Determinação de crescimento mais adequado à formação de mudas de *Eucalyptus* spp. (estaca e semente) e *Pinus* spp. (semente) em recipientes plásticos rígidos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, Curitiba, 1984. Anais. Curitiba, UFPR/IUFRO, 1984. p. 350-65.
4. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, 1979. v. 1.
5. HACSKAYLO, E. Inoculation of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizae fungi in Puerto Rico. Forest Science, 17 (2): 245-293, 1971.
6. _____. Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 207-30.
7. HARLEY, J.L. The biology of mycorrhizae. 2.ed. London, Leonard Hill, 1969. 334 p.
8. INOUE, M.T. Ensaio comparativo para dimensionar as influências causadas pela inoculação de fungos micorrízicos em mudas de *Pinus taeda* L. em relação a quantidade de inóculo presente no solo. Floresta, 4(1), 1972.

9. INOUE, M.T. Wachstumsverhalten von *Cedrela odorata* L. und *C. fissilis* Vell. (Meliaceae) in Jugendstadium in Abhängigkeit von Umweltfaktoren. Hamburg, 1976. 100 p. Dissertation. Univ. Hamburg.
10. KRAMER, P.J. & KOZLOWSKI, T.T. Raízes micorrizadas. In: _____. Fisiologia das árvores. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. p. 316-20.
11. LAMB, R.J. & RICHARDS, B.N. Survival potential of sexual and assexual spores of ectomycorrhizal fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 62: 181-91, 1974.
12. LEAF, A.L. Plant analysis as an aid in fertilizing forests. In: WALSH, L.M. & BEATON, J.D. Soil testing and plant analysis. Madison, Soil Science Society of American, 1974. p. 427-54.
13. MAGHEMBE, J.A. & REDHEAD, J.T. Growth and ectomycorrhizae development of *Pinus caribaea* seedlings inoculated with basidiospores of *Scleroderma dictyosporum* in fertilized nursery soil in Tanzania. Forest ecology and management, 8: 221-228, 1984.
14. MARKS, G.C. & FOSTER, R.C. Structure, morphogenesis, and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 1-41.
15. MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizae fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizae fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology, 59: 153-63, 1969.
16. _____. Mycorrhizae: a type of root infection beneficial to plant growth. s.n.t. 3 p.
17. _____. Mycorrhizae and feeder root diseases. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 351-82.

18. MARX, D.H. & ARTMAN, S.D. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in nursery soil infested with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* in Virginia. For. Ser. Res., 1978.
19. _____. & BRYAN, W.C. Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. Can. J. Bot., 48: 639-43, 1970.
20. _____. & _____. The significance of mycorrhizae to forest trees. In: Mycorrhizae. s.n.t. p. 107-17.
21. _____.; _____. & CORDELL, E.C. Growth and ectomycorrhizae development of pine seedlings in nursery soils infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. For. Sci., 22: 91-100, 1976.
22. _____.; HATCH, A.B. & MENDICINO, J.F. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. Can. J. Bot., 55: 1569-1574, 1977.
23. _____. & KENNEY, D.S. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: SHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizae research. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1982. p. 131-42.
24. _____.; MEXAL, J.G. & MORRIS, W.G. Inoculation of nursery seedbeds with *Pisolithus tinctorius* spores mixed with hydromulch increases ectomycorrhizae and growth of loblolly pines. South J. Appl. For., 3: 175-78, 1979.
25. MEYER, F.H. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forest. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 79-105.
26. MIKOLA, P. Forestacion de zonas rasas. Importancia y técnica de la inoculacion micorrizica. Unasyuva, 23: 35-48, 1968.
27. _____. Mycorrhizal inoculation in afforestation. Int. Rev. For. Res., 1970. p. 123-96.

28. MIKOLA, P. Application of mycorrhizal simbiosis in forestry practice. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 381-411.
29. MOLINA, R. & PALMER, J.G. Isolation, maintenance, and pure cultures manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: SCHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1982. p. 115-29.
30. OLIVEIRA, O.S. Efeitos da terra micorrizada sobre o desenvolvimento de mudas de *Pinus taeda* L. e *Pinus patula* Sch. & Cham. Curitiba, 1978. 53 p. Dissertação. Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.
31. _____. & BARROS, P.L.C. A influência das micorrizas na formação de mudas de "*Pinus caribaea*" Morelet var. *hondurensis*. Floresta, 12(1): 66-71, 1981.
32. PEYRONEL, B.; FASSI, B.; FONTANA, A.; TRAPPE, J.M. Terminology of mycorrhizae. Mycologia, 61: 410-11, 1969.
33. RAMBELLI, A. The rhizosphere of mycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 299-349.
34. REID, C.P.P. & HACSKAYLO, E. Evaluation of plant responsito inoculation. In: SCHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1982. p. 175-87.
35. SHEMAKHANOVA, N.M. The value of mycorrhiza for oak and pine seedlings. In: IMSHENETSKII, A.A. Mycotrophy in plants. Washington, USDA. National Science Foundation, 1967. p. 324-43.
36. SHTERENBERG, P.M. & KOSTYUK, P.N. Sventy years since the discovery of plant mycotrophy by F.M. Kamenskii. In: IMSHENETSKII, A.A. Mycotrophy in plants. Washington, USDA. Nationsl Science Foundation, 1967. p. 120-28.

37. SINCLAIR, W.A. & MARX, D.H. Evaluation of plant response to inoculation. In: SHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizae research. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1982. p. 165-171.
38. SLANKIS, V. On the factors determining the establishment of ectotrophic mycorrhiza of forest trees. Recent advances in botany, 1961. p. 1738-42.
39. _____. Hormonal relationships in mycorrhizae development. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 232-98.
40. THEORODOU, C. & BOWEN, G.D. Mycorrhizal responses of radiata pine in experiments with different fungi. Aust. For., 34: 183-91, 1970.
41. TOMAZELLO FILHO, M. & KRÜGNER, T.L. Aspectos da associação micorrízica em *Pinus* spp. IPEF, 3: 1-32, 1982.
42. TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizae inoculation nurseries. Ann. Rev. Phytopathology, 15: 203-22, 1977.
43. WENT, F.N. & STARK, N. Mycorrhiza. Bioscience, 18: 1035-39, 1968.
44. WRIGHT, E. Importance of mycorrhizae to ponderosa pine seedlings. For. Science, 3: 267-68, 1957.
45. ZAK, B. Classification of ectomycorrhizae. In: MARKS, G.C. & KOZLOWSKI, T.T. Ectomycorrhizae - their ecology and physiology. New York, Academic Pressm 1973. p. 43-78.
46. _____. & BRYAN, W.C. Isolation of fungal symbionts from pine mycorrhizae. For. Sci., 9: 270-78, 1963.
47. _____. & MARX, D.H. Isolation of mycorrhizal fungi from roots of indivisual slas pines. s.n.t. 1964.