

# Ectomicorrizas: A Face Oculta das Florestas

Fotos e Ilustrações cedidas pelos autores

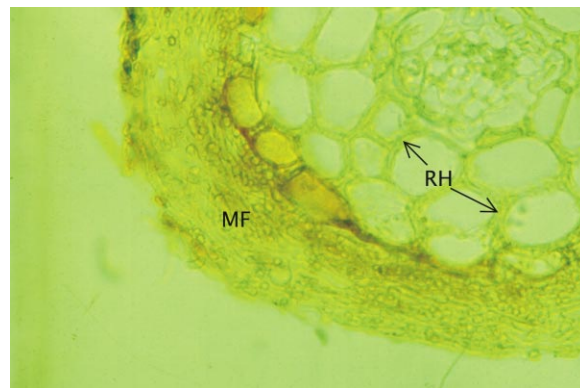
## Aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção florestal

### INTRODUÇÃO

**E**stima-se que, no Brasil, as áreas reflorestadas com pinho e eucalipto correspondam a mais de 4,8 milhões de hectares (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2002), área em que ocorrem muitos processos e interações ecológicas que passam despercebidos aos olhos desatentos. Silenciosamente, as árvores dos plantios desenvolvem uma série de relações ecológicas com diversas populações de macro- e microrganismos. À primeira vista, os sinais desses processos e interações são praticamente imperceptíveis e, mesmo quando se manifestam, não são capazes de nos remeter ao seu verdadeiro papel. Quando, por exemplo, observamos o aparecimento de vários tipos de cogumelos nos plantios de pinho e eucalipto, mal nos damos conta de que essas estruturas se encontram conectadas a uma rede extensa de filamentos fúngicos, os quais estão ligados às raízes das árvores. Esta associação entre fungos do solo e as raízes de algumas espécies arbóreas é denominada ectomicorriza (do grego, *ektos* = externo; *mykes* = fungo; *rhiza* = raiz). Em geral, durante a formação das ectomicorrizas, as raízes sofrem profundas alterações morfológicas e fisiológicas, passando a funcionar de forma integrada e

harmoniosa com o fungo, com ganhos na adaptabilidade e na sobrevivência dos simbioses.

Registros fósseis indicam que as associações ectomicorrízicas surgiram há pelo menos 50 milhões de anos atrás (Lepage et al., 1997). Por meio da comparação do RNA 18S de alguns fungos ectomicorrízicos, estudiosos admi-



**Figura 1.** Corte transversal de ectomicorriza formada por *Pisolithus tinctorius* no sistema radicular de *Pinus pumila*, evidenciando o manto fúngico (MF) envolvendo as células da epiderme radicular e a rede de Hartig (RH) formada nos espaços intercelulares da epiderme e do córtex

tem o aparecimento desses organismos há cerca de 130 milhões de anos, durante o período cretáceo (Berbee & Taylor, 1993), mas os registros fósseis de ectomicorrizas desta época jamais foram encontrados. Os fungos mais próximos aos basidiomicetos ectomicorrízicos são saprofitos, sugerindo que, na origem, a

#### Maurício Dutra Costa

Eng. Agrônomo; DS em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa (UFV); Professor Adjunto de Microbiologia do Solo [mdcosta@ufv.br](mailto:mdcosta@ufv.br)

#### Olinto Liparini Pereira

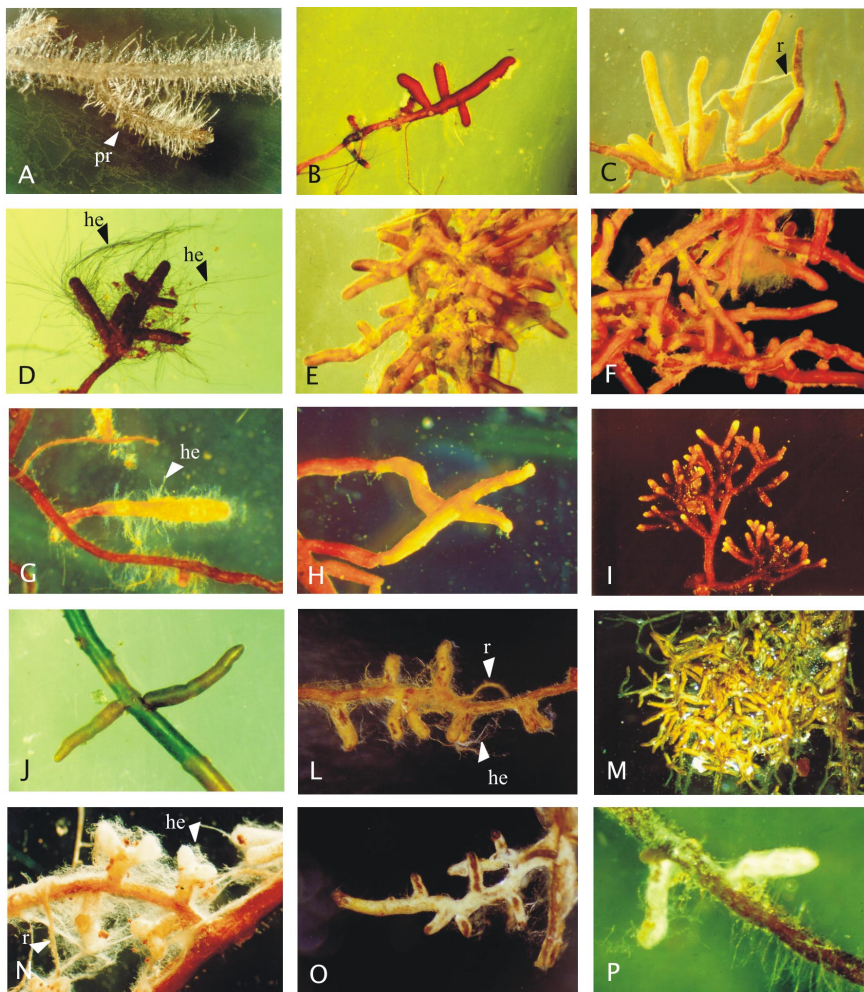
Eng. Agrônomo, MS em Microbiologia Agrícola, UFV [liparini@bol.com.br](mailto:liparini@bol.com.br)

#### Maria Catarina Megumi Kasuya

Eng. Agrônomo, DS em Agricultura, Hokkaido University, Japão; Professor Adjunto de Microbiologia do Solo [mkasuya@ufv.br](mailto:mkasuya@ufv.br)

#### Arnaldo Chaer Borges

Eng. Agrônomo, PhD em Microbiologia do Solo, North Carolina State University at Raleigh, EUA; Professor Titular de Microbiologia do Solo [cbaer@ufv.br](mailto:cbaer@ufv.br)



**Figura 2.** (A) Raiz não colonizada mostrando a abundância de pêlos radiculares. (B-P) Diferentes tipos morfológicos de ectomicorrizas coletadas em diversas espécies de hospedeiros florestais. (pr) = pêlos radiculares; (r) = rizomorfo; (he) = hifas emanadas

associação decorreu da interação entre plantas e este tipo de fungo (Malloch, 1987; Brundrett, 2002).

Diversos benefícios decorrem da associação da planta hospedeira com fungos ectomicorrízicos. Os filamentos fúngicos, denominados hifas, retiram das árvores compostos orgânicos necessários à sobrevivência do fungo e à produção de novos cogumelos ou basidiocarpos (Smith & Read, 1997). Em contrapartida, as plantas tornam-se mais bem nutridas e apresentam maior sobrevivência e longevidade no campo (Harley et al., 1983). Além desses efeitos diretos sobre os membros da simbiose, os fungos ectomicorrízicos desempenham importante papel nos ciclos de alguns elementos químicos nos ecossistemas florestais, particularmente no ciclo do nitrogênio e do fósforo (Chambers &

Cairney, 1999). Esses fungos são capazes de promover a mineralização de formas orgânicas dos nutrientes e de solubilizar minerais por meio da produção de ácidos orgânicos, tornando esses elementos mais disponíveis para as plantas (Högberg et al., 1999; Landerweert et al., 2001). A ocorrência de ectomicorrizas altera de forma decisiva o ambiente da rizosfera, levando a novos equilíbrios populacionais, muitas vezes desfavoráveis aos patógenos do sistema radicular (Garbaye, 1991).

As ectomicorrizas ocorrem em cerca de 3% das fanerógamas (Meyer, 1973) e, em regiões temperadas, em 90% das espécies florestais. Já no Brasil, muitas plantas arbóreas de importância econômica, usadas na produção de madeira, carvão e celulose, como o *Pinus*, o *Eucalyptus* e a *Acacia mangium*, são

capazes de associar-se simbioticamente com fungos, resultando na formação de ectomicorrizas. Tal fato sugere enorme potencial de aplicação de fungos ectomicorrízicos visando melhorias na produção das florestas com o mínimo de dano ao ambiente. Sob esse escopo, as pesquisas científicas focalizam os aspectos genéticos, fisiológicos e ecológicos da simbiose ectomicorrízica, bem como o desenvolvimento de tecnologias de inoculação de fungos em viveiros e a manutenção ou aumento da diversidade de fungos ectomicorrízicos nos sítios de plantio. Os avanços na área dão-se a passos largos, com fronteiras já consolidadas na área de biologia molecular, genética clássica e genômica.

Este artigo visa dar aos leitores uma breve introdução a esse fascinante lado oculto das florestas, trazendo alguns dos principais conceitos da área e alguns resultados de pesquisa sobre ectomicorrizas.

### MORFOLOGIA DE ECTOMICORRIZAS

As ectomicorrizas caracterizam-se por apresentarem uma camada de hifas, o manto, que recobre as células da epiderme radicular; a rede de Hartig, formada pelo crescimento das hifas nos espaços intercelulares da epiderme e do córtex; e uma rede de filamentos que interligam as micorrizas ao solo e aos basidiocarpos [Figuras 1, 2 e 3] (Smith & Read, 1997).

Em geral, o manto apresenta apenas uma camada de hifas, podendo, às vezes, formar falso tecido parenquimatoso com duas ou mais camadas. Sua organização influencia a absorção de água e nutrientes e a susceptibilidade da planta aos patógenos do solo, funcionando como barreira mecânica contra a penetração de patógenos (Peterson & Bonfante, 1994; Smith & Read, 1997). As hifas do manto são, também, capazes de sintetizar compostos de reserva como o glicogênio, polifosfatos e proteínas (Chalot et al., 1991; Peterson & Bonfante, 1994).

A espessura do manto varia de espécie a espécie e de isolado a isolado, sendo indicativa do grau de compatibilidade entre o fungo e a planta hospedeira. O manto pode apresentar de 20 a 100  $\mu\text{m}$  de espessura, com valores mais frequentes entre 30 e 40  $\mu\text{m}$  (Ingleby et al., 1993; Agerer, 1994). Nesta faixa, a massa de micélio presente nesta estrutura pode constituir de 25 a 40% da matéria seca da ectomicorriza (Ingleby et al.,

1990, Agerer, 1992; Smith & Read, 1997). As variações na estrutura do manto, as ornamentações da superfície, a coloração e a presença de rizomorfos são usadas, juntamente com testes químicos e imunológicos, para a caracterização das ectomicorrizas e identificação do fungo associado (Ingleby et al., 1990, Agerer, 1992 e Smith & Read, 1997). Entretanto, poucos são os fungos que podem ser identificados com base somente nessas características, necessitando-se do corpo de frutificação para esse fim (Peterson e Bonfante, 1994).

A partir do manto, as hifas estendem-se externamente em todas as direções, conectando-se com o solo, com basidiocarpos hipógios e epígeos e com outras plantas (Figura 2). Há, portanto, a formação de extensa rede de conexões, possibilitando a troca de nutriente orgânicos e inorgânicos entre diferentes organismos. A expansão das hifas aumenta sobremaneira o volume de solo explorado pela planta hospedeira associada ao fungo ectomicorrízico, resultando em maior absorção de nutrientes e água.

A rede de Hartig é constituída de ramificações das hifas entre as células da epiderme e do córtex da raiz, aumentando a interface de contato entre os simbiontes (Figura 1). Esta estrutura constitui o sítio onde acontecem as trocas de metabólitos entre a planta hospedeira e o fungo. Na associação ectomicorrízica entre *Amanita muscaria* e *Picea abies*, as hifas da rede de Hartig formam estruturas com morfologia semelhante a um leque, as quais contêm citoplasma denso com grande número de mitocôndrias e com o retículo endoplasmático rugoso frequentemente distribuído na mesma direção de extensão da hifa, sugerindo que a transferência ativa de solutos entre o hospedeiro e o fungo dá-se nesta estrutura (Kottke & Oberwinkler, 1987). Em geral, a rede de Hartig encontra-se limitada aos espaços intercelulares da epiderme das angiospermas, enquanto, nas gimnospermas, a rede de Hartig pode

estender-se por várias camadas do córtex sem, no entanto, ultrapassar o limite imposto pela endoderme radicular.

As hifas e os rizomorfos que surgem a partir das ectomicorrizas constituem as estruturas ligadas à absorção de água e de nutrientes a partir do solo [Figura 2] (Duddridge et al., 1980; Thomson et al., 1994; Augé, 2001). Os rizomorfos podem absorver água e transportá-la a distâncias significativas. O movimento de água através dos rizomorfos ocorre às mesmas taxas de transporte de água do xilema, indicando que a translocação de água dentro dessas estruturas fúngicas ocorrem em favor de um gradiente de potencial hídrico estabelecido pela planta.

As ectomicorrizas podem assumir formas diversas (nodular, piramidal, bifurcada, coralóide, entre outras), com cores determinadas pela cor do micélio

do fungo simbiote (preto, vermelho, amarelo, castanho, branco, etc) [Figura 2]. A formação de ectomicorrizas inibe a formação de pêlos radiculares, os quais são substituídos pelas hifas do fungo (Figura 2). Esta inibição envolve a secreção de compostos indólicos pelo fungo, tais como o ácido indolacético e a hipaforina, os quais regulam a morfogênese radicular (Ditengou et al., 2000; Ditengou & Lapeyrie, 2000).

A formação de ectomicorrizas no campo depende de vários fatores do ambiente, tais como a disponibilidade de nutrientes, o pH do solo ou do substrato, a temperatura, a disponibilidade de água e a aeração, a intensidade luminosa, a fisiologia da planta hospedeira, as interações com microrganismos do solo, a toxicidade de certos pesticidas, e, também, o tipo e modo de aplicação do inóculo ectomicorrízico (Kropp & Langlois, 1990; Kasuya, 1988 e 1995; Costa et al., 1997; Smith & Read, 1997; Rodrigues et al., 1999; Alves et al., 2001; Augé, 2001).

Nas condições de viveiro, é desejável que sejam produzidas mudas saudáveis e vigorosas, sendo o

uso liberal de fertilizantes e água a prática adotada para atingir esse objetivo. No entanto, níveis de nutrientes crescentes e acima dos valores ótimos para a formação de ectomicorrizas podem resultar na produção de mudas sem micorrizas na época do transplante para o campo. As mudas chegam a apresentar bom tamanho e adequada coloração das folhas, mas são de baixo valor para o reflorestamento devido à falta de ectomicorrizas ou a uma relação parte aérea: raiz inadequada (Mikola, 1989).

### FUNGOS E PLANTAS ECTOMICORRÍZICAS NO BRASIL

As ectomicorrizas são formadas principalmente pelos fungos das subdivisões Basidiomycota e Ascomycota (Figura 3). Embora menos comuns,



**Figura 3.** Basidiocarpos de fungos ectomicorrízicos, produzidos durante a associação do fungo com raízes de árvores hospedeiras compatíveis. (A) *Boletus*; (B) *Russula*; (C) *Tricholoma*; (D) *Suillus*; (E) *Scleroderma*; (F) *Rhizopogon*; (G) *Geastrum*; (H) *Pisolithus*

outros fungos anamórficos ou pertencentes à subdivisão Zygomycota podem também formar ectomicorrizas. Nos plantios de eucalipto do Brasil, relata-se a ocorrência de corpos de frutificação de *Pisolithus*, *Clavaria*, *Scleroderma bovista*, *S. uruguayensis* e *Telephora terrestris* (Schwan, 1984, Guimarães, 1993, Coelho et al., 1997). Em plantios de *Pinus*, as espécies de fungos ectomicorrízicos mais frequentemente encontradas são *Inocybe lanuginella*, *Scleroderma fuscum*, *Suillus granulatus*, *Rhizopogon nigrescens*, *R. reatii* e *R. roseolus* (Krüger & Tomazello Filho, 1981; Kasuya, 1988). Recentemente, a ocorrência de basidiocarpos de *Scleroderma verrucosum* foi observada em pomares de noz-pecã, *Carya illinoensis*, no Estado de Minas Gerais (Ribeiro, 2001).

No estado de São Paulo, há relato da ocorrência de esporocarpos de *Tulostoma* spp., próximo ao sistema radicular de diferentes espécies nativas do cerrado brasileiro. Em *Kielmeyera coriacea* e *Xylopia aromatica*, em associação com *Tulostoma beccarianum*, observa-se a presença de manto fúngico e rede de Hartig em raízes dessas espécies, confirmando-se a ocorrência de ectomicorrizas (Balseira & Milanez, 2002). Ectomicorrizas são, também, observadas em outras espécies do cerrado, como a *Bauhinia holophila* (Fabaceae) e a *Campomanesia coerulea* (Myrtaceae) (Thomazini, 1974).

Embora o número de espécies de plantas que formam ectomicorrizas seja relativamente baixo (3% das fanerógamas; Meyer, 1973), várias espécies de fungos são formadoras de ectomicorrizas (cerca de 6.000 espécies; Molina et al., 1992). Em florestas na América do Norte já foram identificadas mais de 2.100 espécies fúngicas (Marx et al., 1982) e, na Austrália, mais de 2.000 (Castellano & Bougher, 1994). Com os avanços na área de biologia molecular, algumas técnicas vêm sendo empregadas para a identificação do fungo associado a micorrizas individuais (Kikushi et al., 2000) ou mesmo para se determinar a composição e a dinâmica da população de espécies fúngicas ectomicorrízicas em plantios ou florestas naturais (Glen et al., 2001a; 2001b; Glen et al., 2002). No Brasil, os levantamentos de espécies vegetais e fúngicas, nativas e ectomicorrízicas, são incipientes, sugerindo a urgência em se identificar os recursos genéticos

disponíveis e o papel da simbiose ectomicorrízica nos ecossistemas do cerrado, nas florestas nativas e nos plantios com espécies exóticas (Figura 4).

### **BENEFÍCIOS DA ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA**

A essencialidade da associação ectomicorrízica para o crescimento e o desenvolvimento de algumas espécies florestais em condições naturais é demonstrada pelo clássico exemplo dos plantios de pinho em Porto Rico. A introdução dessa planta só foi possível com a introdução concomitante de fungos ectomicorrízicos compatíveis (Vozzo & Hacksaylo, 1971). As ectomicorrizas são associações mutualistas nas quais ambos os parceiros derivam benefícios da vida em simbiose. A associação com as plantas hospedeiras permite ao micobionte extrair destas os carboidratos necessários ao crescimento das hifas e à formação dos basidiocarpos ou cogumelos, bem como completar seu ciclo de vida (Smith & Read, 1997). Os benefícios da associação ectomicorrízica para as plantas estão bem documentados, justificando o enorme interesse biotecnológico neste tipo de associação. Em geral, a associação com fungos ectomicorrízicos propicia aumentos no crescimento, na absorção de nutrientes e de água pela planta hospedeira [Figura 5] (Marschner & Dell, 1994; Augé, 2001), maior tolerância a patógenos radiculares (Marx, 1972; Cordier et al., 1998), maior tolerância a metais pesados (Brunner & Frey, 2000) e maior tolerância a extremos de temperatura (Marx et al., 1970; Marx & Bryan, 1971). Vários mecanismos já foram propostos para explicar esses benefícios para a planta hospedeira.

A absorção de nutrientes pela planta gera uma zona de reduzida concentração de nutrientes ao redor das raízes, especialmente para aqueles elementos químicos de baixa mobilidade no solo. As hifas fúngicas, associadas às raízes da planta hospedeira, são capazes de ultrapassar essa região de baixa concentração de nutrientes, indo explorar regiões além do alcance das raízes. Os fungos ectomicorrízicos têm também a habilidade de tornar disponíveis certas formas de nutrientes presentes no solo que estão naturalmente indisponíveis para os vegetais. As hifas fúngicas são capazes de secretar ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico e o oxálico, capazes de solubilizar o fósforo precipitado com Al, Fe e Ca, tomando-o dispo-



**Figura 4.** Coleta de basidiocarpos de fungos ectomicorrízicos em floresta de eucalipto para posterior identificação e isolamento em cultura pura

nível para a planta (Lapeyrie et al., 1991; Heinrich et al., 1988; Landerweert et al., 2001). A maior reserva de fósforo do solo corresponde ao fósforo orgânico, ligado a compostos de carbono, o qual pode ser disponibilizado para as plantas pela ação de enzimas fosfatases produzidas pelo fungo (Costa, 1997). Além desses mecanismos, a produção de proteinases extracelulares e a maior longevidade das raízes associadas aos fungos ectomicorrízicos contribuem significativamente para a melhor nutrição vegetal (Smith & Read, 1997; Dahm & Strzelczyk, 1995; Chambers & Cairney, 1999).

As plantas associadas aos fungos ectomicorrízicos são mais capazes de absorver água do solo, tornando-se mais resistentes à seca (Augé, 2001). A maior absorção de água dá-se pelo aumento do volume de solo explorado pelas hifas fúngicas, a maior área de absorção das hifas comparadas à das raízes, o transporte de água a longas distâncias pelos rizomorfos, ao maior acesso das hifas a microporos do solo preenchidos com água, entre outros mecanismos (Duddridge et al., 1980; Thomson et al., 1994; Smith & Read, 1997;



**Figura 5.** Crescimento de *Eucalyptus grandis* inoculado com diferentes isolados de *Pisolithus* sp. (M5, 35, PT 90A). C = controle, sem inoculação

Augé, 2001).

Freqüentemente, tem-se observado que as plantas associadas aos fungos ectomicorrízicos tornam-se mais tolerantes aos patógenos do sistema radicular (Perrin, 1985). Vários mecanismos já foram propostos para explicar esse fato, dentre os quais pode-se citar a presença do manto, barreira mecânica à penetração de patógenos, a produção de antibióticos e ácidos pelo fungo ectomicorrízico, a competição por sítios de infecção e por nutrientes, a indução de respostas de defesa na raiz, a melhoria do estado nutricional das plantas e modificação das condições da rizosfera que desencorajam o estabelecimento de patógenos (Perrin, 1987; Rasanayagam & Jeffries, 1992; Smith & Read, 1997).

A maior tolerância a metais pesados advém da secreção de compostos quelantes pelo fungo, reduzindo a disponibilidade do metal para as plantas, da ligação do metal ao micélio extramatricial, da adsorção do metal ao manto, da compartimentalização de metais em vacúolos fúngicos, da síntese de metalotioneínas e fitoquelatinas (Nogueira, 1996; Howe et al., 1997; Godbold et al., 1998; Marschner et al., 1998; Brunner & Frey, 2000).

As ectomicorrizas também fornecem proteção às plantas contra extremos de temperatura por meio de mecanismos ainda não conhecidos, mas que podem advir da síntese de proteínas *heat-shock* e dos efeitos indiretos da melhor nutrição e da modificação das relações hídr-

cas nas plantas micorrizadas (Marx et al. 1970; Marx & Brian 1971; Augé, 2001).

As ectomicorrizas constituem um componente importante para a ciclagem de nutrientes e contribuem para o equilíbrio dos fluxos desses elementos em ecossistemas florestais (Fitter, 1991; Smith & Read, 1997; Buscot et al., 2000). Em conjunto, esses atributos favorecem o estabelecimento e o desenvolvimento de plantas exóticas, como o *Pinus* e o *Eucalyptus*, especialmente em sítios com condições ambientais adversas. Nos locais de plantio, a utilização de mudas inoculadas com isolados fúngicos eficientes pode contribuir para aumentar a produtividade florestal e reduzir a necessidade do uso de fertilizantes.

#### **ESPECIFICIDADE FUNGO-HOSPEDEIRO**

As associações ectomicorrízicas comumente apresentam especificidade fungo-hospedeiro, manifestada principalmente entre gêneros e, em alguns casos, até mesmo entre espécies (Molina et al., 1992; Oliveira et al., 1994). O crescimento de *Eucalyptus dunii*, *E. citriodora*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* e *E. cloesiana* varia quando mudas dessas espécies são inoculadas com diferentes isolados de fungos ectomicorrízicos dos gêneros *Pisolithus*, *Scleroderma* e *Paxillus* (Comerlato, 1991). Testes com 31 isolados de *Pisolithus* sp., originários de diferentes regiões geográficas e hospedeiros, mostraram grande

variação na colonização das raízes de *E. grandis* e de *E. urophylla* (Pereira et al., 1997). Todos os isolados provenientes de eucalipto formaram micorrizas com ambas as espécies de *Eucalyptus*, o mesmo ocorrendo com 10 dos 11 isolados provenientes de *Pinus* sp. e dois provenientes de hospedeiros desconhecidos. Embora os isolados provenientes de *Pinus* tenham formado micorrizas em eucalipto, a percentagem de colonização foi extremamente baixa. As características mais contrastantes entre as micorrizas formadas pelos isolados provenientes de *Eucalyptus* sp. e de *Pinus* sp., quando inoculados em eucalipto, foram a coloração e a forma das micorrizas. Em um trabalho subsequente, utilizando esses mesmos isolados de *Pisolithus* observou-se que os fungos originalmente isolados de *Pinus* formavam micorrizas tanto em *Pinus oocarpa* como em *P. taeda*. Porém, nenhum dos isolados de eucalipto formou micorriza com essas espécies vegetais (Pereira & Kasuya, 1999; Pereira et al., 2000). Estudos utilizando as técnicas de RAPD-PCR (Junghans et al., 1998), PCR-RFLP de rDNA (Gomes et al., 1999), ITS (internal transcribed spacer) e DNA mitocondrial (Gomes et al., 2000) têm sugerido que esses isolados pertencem a diferentes espécies fúngicas que diferem grandemente na compatibilidade com *Pinus* e *Eucalyptus*.

Também, alguns isolados de *Pisolithus* são compatíveis com plantas clonais obtidas de árvores maduras, mas são praticamente incompatíveis com plantas clonais obtidas a partir de mudas jovens, sugerindo que o estágio de desenvolvimento e maturidade das plantas influenciam a compatibilidade entre o fungo e a planta hospedeira (Tonkin et al., 1989).

Os relatos de especificidade em nível de gênero, baseiam-se principalmente na ocorrência de determinados esporocarpos em associação a hospedeiros específicos, demonstrando a importância da planta para a finalização do ciclo de vida do fungo na natureza (Molina & Trappe, 1982). Em condições artificiais de laboratório, os fungos ectomicorrízicos podem se associar a vários hospedeiros. Entretanto, as ectomicorrizas formadas comumente desenvolvem características morfológicas anômalas ou apresentam-se menos desenvolvidas quando comparadas a ectomicorrizas obtidas a partir de isolados tipicamente associados ao hospedeiro no campo (Molina & Trappe, 1982). Hipotetiza-se que a gama de hospedeiros de fungos ectomicorrízi-

cos é bem mais limitada na natureza do que em inoculações “in vitro” (Harley & Smith, 1983). Na Austrália, apesar da enorme diversidade de fungos ectomicorrízicos associados a *Eucalyptus*, plântulas exóticas de pinho só prosperaram quando fungos específicos de pinho foram introduzidos nos viveiros australianos (Mikola, 1970).

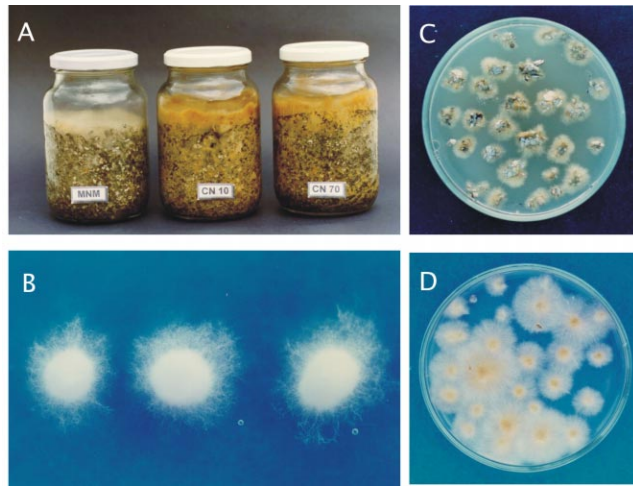
Assim como os recentes estudos sobre os mecanismos envolvidos em interações entre fungos fitopatogênicos e plantas hospedeiras, as questões relativas à especificidade e compatibilidade entre fungos ectomicorrízicos e seus hospedeiros, vêm sendo estudadas com mais profundidade pelo uso de técnicas modernas de bioquímica, microscopia eletrônica e genética molecular, a fim de melhor elucidar os mecanismos envolvidos no reconhecimento fungo-planta.

#### **PRODUÇÃO DE INOCULANTES DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS**

A inoculação de fungos ectomicorrízicos visando à produção de mudas mais vigorosas e resistentes às condições de estresse de campo é uma das principais aplicações biotecnológicas potenciais das ectomicorrizas. Várias formulações de inoculantes já foram desenvolvidas, cada uma delas apresentando algumas vantagens e desvantagens (Molina & Trappe, 1982; Brundrett et al., 1996; Costa et al., 1997; Rodrigues et al., 1999; Alves et al., 2001). Em geral os inoculantes apresentam formulações que permitem a sua aplicação diretamente no substrato de plantio das mudas, nos próprios tubetes ou similares, ou nas raízes nuas.

O uso de solo ou serapilheira contendo propágulos fúngicos é o tipo mais simples de inóculo. No entanto, este tipo de material é usado sem qualquer tratamento, podendo servir como fonte de patógenos, pragas e plantas invasoras para os viveiros ou áreas cultivadas.

Plantas micorrizadas naturalmente podem servir de fonte de inóculo para plantas não colonizadas nos viveiros, bastando, para isso, que o micélio associado às plantas colonizadas infectem as raízes das plantas não colonizadas. No entanto, a introdução dessas plantas nos



**Figura 6.** Inoculantes de fungos ectomicorrízicos: (A) Micélio em turfa:vermiculita; (B) Micélio em “beads” de alginato de cálcio. Teste de viabilidade de inoculantes em placas de Petri: (C) Inoculante turfa:vermiculita; (D) Inoculante “beads” de alginato de cálcio

viveiros pode ocasionar a disseminação de doenças e pragas, comprometendo o controle fitossanitário.

Os esporos ectomicorrízicos, produzidos em basidiocarpos, podem também ser usados na forma de pó, suspensão ou peletizados. As principais limitações deste tipo de inóculo são a sazonalidade da produção de basidiocarpos, a quantidade limitada de basidiocarpos disponíveis para a fabricação do inoculante, a viabilidade dos esporos e o tempo relativamente longo entre a inoculação e a formação de ectomicorrizas. Também, ao se fazer a inoculação com esporos, não há possibilidade de seleção dos melhores indivíduos fúngicos que irão formar ectomicorrizas com a planta hospedeira. No entanto, a facilidade de aplicação desse tipo de inoculante e o seu reduzido custo têm estimulado o uso de esporos nos viveiros e o desenvolvimento de pesquisas que visem contornar as principais limitações desse tipo de material.

O micélio vegetativo pode também ser utilizado em diversas formulações. Em geral, o fungo é cultivado em substrato líquido, triturado e aplicado como suspensão micelial. Os fragmentos oriundos da trituração podem, também, ser encapsulados em esferas de alginato de cálcio para a aplicação direta ao sistema radicular durante o transplantio ou para adição ao substrato de crescimento das mudas (Figura 6). Alternativamente, o micélio fúngico pode ser cultivado em

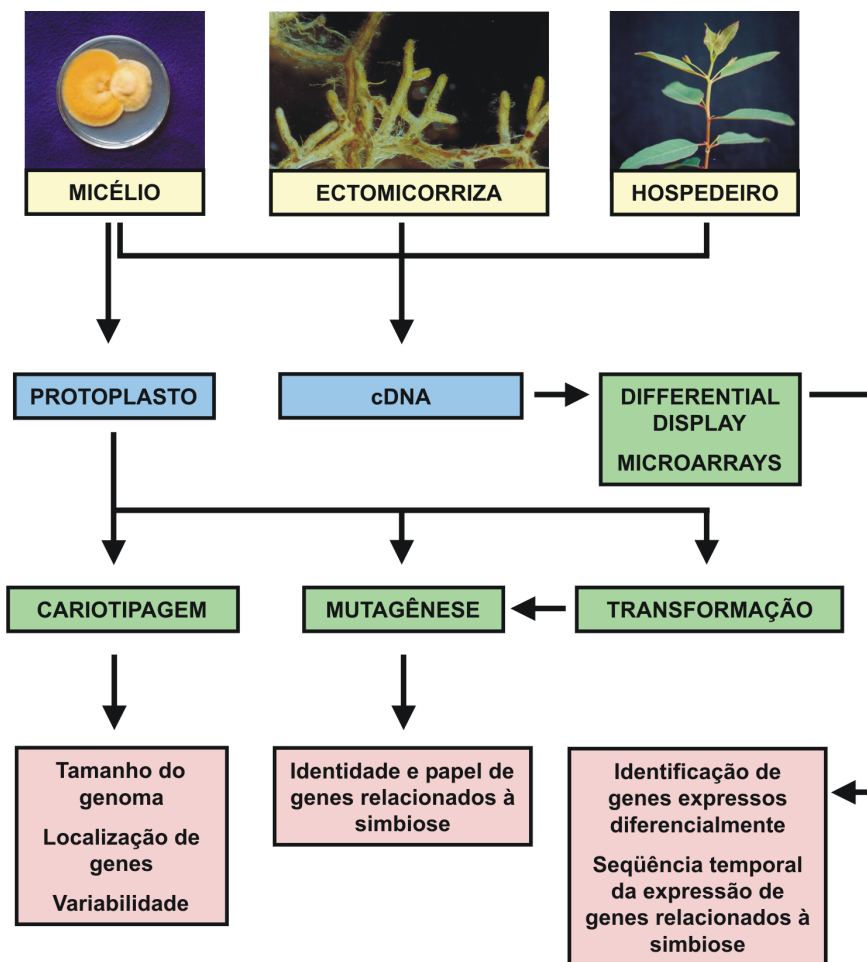
substratos sólidos constituídos da mistura de componentes como a turfa e a vermiculita [Figura 6] (Costa et al., 1997; Alves et al., 2001). Os inoculantes assim produzidos são aplicados misturados ao substrato de plantio das mudas a diferentes percentagens, promovendo ganhos no crescimento das mudas. A vermiculita presente nessas formulações oferece proteção mecânica ao micélio fúngico que cresce nos interstícios das lâminas desta argila, reduzindo grandemente as injúrias mecânicas impostas às hifas.

A produção de inóculo em escala industrial requer consideráveis investimentos tanto da parte de agências do governo como das empresas privadas do setor florestal. Embora a tecnologia para a produção de inoculantes de diversos tipos já exista, a produção em grande escala é limitada devido à reduzida de-

manda do mercado brasileiro e a inexistência de trabalhos no país que comprovem contundentemente ganhos significativos na produtividade de plantios comerciais iniciados com mudas micorrizadas. Além disso, a tecnologia de produção de mudas florestais em viveiros comerciais desenvolveu-se, em grande parte, sustentada pelo paradigma da intensa fertilização química, desencorajando a adoção de técnicas biotecnológicas alternativas, como a micorrização de mudas nos viveiros.

#### **PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS**

Fungos ectomicorrízicos têm sido usados para inoculação de mudas em viveiros florestais na Austrália, China, Estados Unidos, França, Brasil, entre outros países. Além, dos benefícios clássicos associados ao maior crescimento e sobrevivência de plantas micorrizadas no campo, o advento de técnicas moleculares abrem novas possibilidades de desenvolvimento de fungos ectomicorrízicos geneticamente modificados com várias aplicações potenciais. Os fungos ectomicorrízicos podem ser transformados de forma a expressarem toxinas inseticidas, tais como as proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* ou inibidores de proteínases, ambos de uso potencial na proteção das raízes contra pragas de coleópteros e lepidópteros no estágio



**FIGURA 7.** Estratégia geral para o estudo de genes relacionados à simbiose na associação entre *Pisolithus* sp. e a planta hospedeira *Eucalyptus* sp. (Adaptado de Costa *et al.*, 2002)

larval (Hiremath & Podila, 2000). Fungos ectomicorrízicos podem, também, ser modificados no sentido de expressarem determinadas características que venham a modificar micro-ambientes desfavoráveis ao redor das raízes devido à presença de poluentes ou metais pesados. Por exemplo, fungos geneticamente modificados capazes de expressar fatores quelantes de metais pesados na rizosfera da planta hospedeira podem contribuir para diminuição da absorção desses elementos. Além disso, fungos ectomicorrízicos geneticamente modificados podem atuar como agentes de controle biológico de doenças fúngicas e bacterianas por meio da expressão de genes específicos envolvidos na redução ou inibição das populações de patógenos.

A obtenção de fungos ectomicorrízicos melhorados geneticamente requer o desenvolvimento de técnicas de mutagênese e de transformação que

permitam gerar indivíduos com as características desejáveis (Figura 7). As técnicas de mutagênese com agentes químicos ou radiação ultravioleta requerem o desenvolvimento de protocolos otimizados para a produção de protoplastos. Já a irradiação de esporos, visando à produção de mutantes, mostra-se inviável até o presente devido às baixas taxas de germinação *in vitro* obtidas para muitos fungos ectomicorrízicos.

Algumas áreas de pesquisa, como o estudo dos genes relacionados à simbiose, mostram-se bastante desenvolvidas, abrindo novas perspectivas para o entendimento da associação e a possibilidade de manipulação genética de fungos ectomicorrízicos (Voiblet *et al.*, 2001). As técnicas de *differential display* e de *microarrays* são particularmente promissoras para determinar-se quais genes têm papel preponderante no estabelecimento da simbiose e quando estes são

expressos durante a diferenciação das ectomicorrizas (Figura 7).

A face oculta das florestas de eucalipto e pinho no Brasil, no que se refere a ectomicorrizas, está sendo desenhada com os cuidados e rigores da boa ciência para ampliar as possibilidades de aplicação dessa simbiose em benefício da sociedade.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERER, R. Characterization of ectomycorrhiza. In: NORRIS, J. R., READ, D. J. AND VARMA, A. K. (eds.) **Techniques for mycorrhizal research**. San Diego: Academic Press, 1992. p.25-74.
- ALVES, J. R.; SOUZA, O.; PODLECH, P. A.; GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L. O. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesp. agropec. bras.**, v.36, p.307-313, 2001.
- AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v.11, p.3-42, 2001.
- BASEIA, I. G. & MILANEZ, A. I. *Tulostoma* Persoon (Gasteromycetes) from the cerrado region, state of São Paulo, Brazil. **Acta bot. bras.**, v.16, p.9-14, 2002.
- BERBEE, M. L. & TAYLOR, J. W. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. **Can. J. Bot.**, v.71, p.1114-1127, 1993.
- BRUNDRETT M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture - ACIAR Monograph 32**. Canberra: Pirie Printers, 1996. 374p.
- BRUNDRETT, M. C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytol.**, v.154, p. 275-304, 2002.
- BRUNNER, I. & FREY, B. Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. **Environ. Poll.**, v.108, p.121-128, 2000.
- BUSCOT, F.; MUNCH, J. C.; CHARCOSSET, J. Y.; GARDES, M.; NEHLS, U.; HAMPP, R. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.24, p. 601-614, 2000.
- CASTELANO, M. A. & BOUGHER, N. L. Consideration of the taxonomy and biodiversity of Australian ectomycorrhizal fungi. In: ROBSON, A. D.; ABBOTT, L. K.; MALAJCZUK, N. (eds.) **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Netherlands: Kluwer Academic Publi-

- sher, 1994. p.37-46.
- CHALOT, M.; STEWART, G. R.; BRUN, A.; MARTIN, F.; BOTTON, B. Ammonium assimilation by spruce-*Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. **New Phytol.**, v.119, p.541-550, 1991.
- CHAMBERS, S. M. & CAIRNEY, J. W. G. *Pisolithus*. In: CAIRNEY, J. W. G. & CHAMBERS, S. M. (eds.) **Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 1-31.
- COELHO, F. C.; BORGES, A. C.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F.; MUCHOVEJ, R. M. C. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus grandise Eucalyptus camaldulensis*, nos municípios de Botucatu, São José dos Campos e São Miguel Arcanjo, São Paulo. **Rev. Árv.**, v.21, p.563-573, 1997.
- COMERLATO, A. G. Especificidade e eficiência de fungos ectomicorrízicos para *Eucalyptus*. Viçosa: UFV, 1991. 57 p. Dissert. (Mestrado em Microbiologia Agrícola)
- CORDIER, C.; POZO, M. J.; BAREA, J. M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 11, p.1017-1028, 1998.
- COSTA, F. A. Atividade de fosfatases ácidas em fungos ectomicorrízicos. Viçosa: UFV, 1997. 46p. Dissert. (Mestrado em Microbiologia Agrícola)
- COSTA, M. D., BORGES, A. C., KASUYA, M. C. M., QUEIROZ, M. V. Physiology and genetics of ectomycorrhiza formation in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. In: ALVAREZ V., V. H., SCHAEFER, C. E. G. R., BARROS, N. F., MELLO, J. W. V., COSTA, L. M. **Tópicos em ciência do solo/publicação da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. – vol. 2. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p.143-193.
- COSTA, M. D.; FERNANDES, R. C. R.; KASUYA, M. C. M.; BORGES, A. C. Produção de inoculante de *Pisolithus tinctorius* em mistura de turfa e vermiculita enriquecida com meios de cultura com diferentes relações C:N. XXVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Rio de Janeiro, Julho, 1997.
- DAHM, H. & STRZELCZYK, E. Impact of vitamins on cellulolytic, pectolytic and proteolytic activity of mycorrhizal fungi. **Symbiosis**, v.18, p.233-250, 1995.
- DITENGOU, F. A.; BÉGUIRISTAIN, T., LAPEYRIE, F. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. **Planta**, v.211, p.722-728, 2000.
- DITENGOU, F. A. & LAPEYRIE, F. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.13, p.151-158, 2000.
- DUDDRIDGE, J. A.; MALIBARI, A.; READ, D. J. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. **Nature**, v. 287, p.834-836, 1980.
- FITTER, A. H. Costs and benefits of mycorrhizas: implications for functioning under natural conditions. **Experientia**, v.47, p. 350-355, 1991.
- GARBAYE, J. Biological interactions in the mycorrhizosphere. **Experientia**, v.47, p.370-375, 1991.
- GLEN, M.; TOMMERUP, I. C.; BOUGHER, N. L.; O'BRIEN, P. A. Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of *Eucalyptus* species in Australian forests? **Mycorrhiza**, v.12, p.243-247, 2002.
- GLEN, M.; TOMMERUP, I. C.; BOUGHER, N. L.; O'BRIEN, P. A. Interspecific and intraspecific variation of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR-RFLP. **Mycol. Res.**, v.105, p.843-858, 2001a.
- GLEN, M.; TOMMERUP, I. C.; BOUGHER, N. L.; O'BRIEN, P. A. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* forests and plantations. **Mycol. Res.**, v.105, p.138-149, 2001b.
- GODBOLD, D.L.; JENTSCHKE, G.; WINTER, S. & MARSCHNER, P. Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. **Chemosphere**, v. 36, p.757-762, 1998.
- GOMES, E. A.; ABREU, L. M.; BORGES, A. C.; ARAÚJO, E. F. ITS sequences and mitochondrial DNA polymorphism in *Pisolithus* spp. isolates. **Mycol. Res.**, v.104, p.911-918, 2000.
- GOMES, E. A.; BARROS, E. G.; KASUYA, M. C. M.; ARAÚJO, E. F. Molecular characterization of *Pisolithus* spp. isolates by rDNA PCR-RFLP. **Mycorrhiza**, v.8, p.1897-202, 1999.
- GUIMARÃES, L. G. Caracterização de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus* spp. em Aracruz e São Mateus, Espírito Santo e Dionísio, Minas Gerais. Viçosa: UFV, 1993. 46p. Dissert. (Mestrado em Microbiologia Agrícola)
- HARLEY, J. L. H. & SMITH, S. E. **Mycorrhizal symbiosis**. New York, Academic Press Inc., 1983. 483p.
- HEINRICH, P. A., MULLIGAN, D. R., PATRICK, J. W. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. **Plant Soil**, v.109, p.147-149, 1988.
- HIREMATH, S. T. & PODILA, G. K. Development of genetically engineered mycorrhizal fungi for biological control. In: PODILA, G. K. & DOUDS JR., D. D. (eds) **Current advances in mycorrhizae research**. St. Paul: APS Press, 2000. p. 179-187.
- HÖGGER, P.; PLAMBOECK, A. H.; TAYLOR, A. F. S.; FRANSSON, P. M. A. Natural <sup>13</sup>C abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. **PNAS**, v.96, p. 8534-8539, 1999.
- HOWE, R.; EVANS, R. L. & KETTERIDGE, S. W. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. **New Phytol.**, v.135, p.123-131, 1997.
- INGLEBY, K.; MASON, P. A.; LAST, F. T.; FLEMING, L. V. **Identification of mycorrhizae**. London, Institute of Terrestrial Ecology Research Publication, 1990. 111p.
- JUNGHANS, D. T.; GOMES, E. A.; GUIMARAES, W. V.; BARROS, E. G.; ARAÚJO, E. F. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, v.7, p.243-248, 1998.
- KASUYA, M. C. M. Ecological and physiological studies on ectomycorrhizae of *Picea glehnii* (Fr. Scm.) Masters. Sapporo: Hokkaido University, 1995. 134p. Dissert. (Doutorado em Agricultura)
- KASUYA, M. C. M. Seleção de fungos ectomicorrízicos para utilização em programas de micorrização controlada em *Pinus*: estudos ecológicos e fisiológicos em síntese "in vitro". Viçosa: UFV, 1988. 61p. Dissert. (Mestrado em Microbiologia Agrícola)
- KIKUCHI, K.; MATSUSHITA, N.; GUERIN-LAGUETTE, A.; OHTA, A.; SUZUKI, K. Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers.

- Mycol. Res.**, v.104, p.1427-1430, 2000.
- KOTTKE, I. & OBERWINKLER, F. The cellular structure of the Hartig net: coenocytic and transfer cell-like organization. *Nord. J. Bot.*, v. 7, p. 85-95, 1987.
- KROPP, B. & LANGLOIS, C. G. Ectomycorrhizae in reforestation. **Can. J. For. Res.**, v.20, p.438-451, 1990.
- KRUGNER, T. L. & TOMAZELLO FILHO, M. Ocorrência de micorrizas de *Pinus* e identificação dos fungos associados. Piracicaba-SP, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1981. 7p. (circular técnica).
- LAPEYRIE, F., RANGER, J., VAIRELLES, D. Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. **Can. J. Bot.**, v.69, p.342-346, 1991.
- LANDERWEERT, R.; HOFFLAND, E.; FINLAY, R. D.; KUYPER, T. W.; van Bree-men, N. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. **Trends in Ecology and Evolution**, v.16, p.248-254, 2001.
- LEPAGE, B. A., CURRAH, R. S., STOCKEY, R. A., ROTHWELL, G. W. Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. **Am. J. Bot.**, v.84, p.410-412, 1997.
- MALLOCH, D. The evolution of mycorrhizae. **Can. J. Plant Pathol.**, v.9, p.398-402, 1987.
- MARCHNER, H. & DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant Soil**, v.159, p.89-102, 1994.
- MARSCHNER, P.; JENTSCHKE, G. & GODBOLD, D. L. Cation exchange capacity and lead sorption in ectomycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v. 205, p.93-98, 1998.
- MARX, D. H.; RUEHLE, J. L.; KENNEY, D. S.; CORDELL, C. E.; RIFFLE, J. W.; MOLINA, R.; PAWUK, W. H.; NAVRATIL, S.; TINUS, R. W.; GOODWIN, O. C. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. **For. Sci.**, v.28, 373-400, 1982.
- MARX, D.H. & BRYAN, W.C. Influence of ectomycorrhizae on survival and growth of aseptic seedlings of loblolly pine at high temperature. **For. Sci.**, v.17, p.37-41, 1971.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infection. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.10, p.426-434, 1972.
- MARX, D.H.; BRYAN, W.C. & DAVEY, C.B. Influence of temperature on aseptic synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on loblolly pine. **For. Sci.**, v.16, p.424-431, 1970.
- MEYER, F. H. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: MARKS, C.G. & KOZLOWSKI, T.T. (eds) **Ectomycorrhizae – Their ecology and physiology**. New York: Academic Press, 1973. p.79-105.
- MIKOLA, P. Mycorrhizal inoculation in afforestation. **Internat. Rev. For. Res.**, v.3, p.123-196, 1970.
- MIKOLA, P. The role of ectomycorrhizae in forest nurseries. **Agr. Ecosyst. Environ.**, v.28, p.343-450, 1989.
- MOLINA, R. & TRAPPE, J. M. Applied aspects of ectomycorrhizae. In: SUBBA RAO, N. S. (ed.) **Advances in agricultural microbiology**. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Company, 1982. p.305-324.
- MOLINA, R. & TRAPPE, J.M. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. **For. Sci.**, v.28, p.423-458, 1982.
- MOLINA, R.; MASSICOTE, H.; TRAPPE, J. M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: ALLEN, M.F. ed. **Mycorrhizal Functioning – an integrative plant-fungal process**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.357-423.
- NOGUEIRA, A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. (ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS EDCF, 1996. p.135-174.
- OLIVEIRA, V. L.; SCHMIDT, V. D.B.; GOMES, N. C.; MAIA, D. C. Specificidade de champignons ectomycorrhizais vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. **Agronomie**, v.14, p.57-62, 1994.
- PEREIRA, O. L. & KASUYA, M. C. M. Especificidade de isolados de *Pisolithus* spp. inoculados em mudas de *Pinus elliotii* e *P. oocarpa* em condições de casa de vegetação. V Congresso e Exposição internacional sobre florestas – FOREST'99. 15 de junho de 1999 – Curitiba – PR
- PEREIRA, O. L.; BORGES, A. C.; KASUYA, M. C. M. Caracterização morfológica de ectomicorizas formadas em *Pinus elliotii* e *P. oocarpa* por isolados de *Pisolithus* spp. FERTILIBIO, 2000. 22 a 26 de outubro de 2000. Santa Maria – RS.
- PEREIRA, O. L.; COSTA, M. D.; KASUYA, M. C. M. Formação de ectomicorizas em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* por isolados de *Pisolithus tinctorius*. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Rio de Janeiro, Julho, 1997.
- PERRIN, R. L'aptitude des mycorrhizes à protéger les plantes contre les maladies: panacée ou chimère? **Ann. Sci. For.**, v.42, p.453-470, 1985.
- PETERSON, R. L. & BONFANTE, P. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. **Plant Soil**, v.159, p.79-88, 1994.
- RASANAYAGAM, S. & JEFFRIES, P. Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. **Mycol. Res.**, v.96, p.971-976, 1992.
- RIBEIRO, J. J. O. Isolamento e caracterização de ectomicorizas em nogueira pecã. Viçosa: UFV, 2001. 31p. Dissert. (Mestrado em Microbiologia Agrícola)
- RODRIGUES, L. S.; KASUYA, M. C. M.; BORGES, A. C. Viability of fragmented mycelia of ectomycorrhizal fungi entrapped in calcium alginate gels. **Mycorrhiza**, v.8, p.263-266, 1999.
- SCHWAN, K. R. F. Caracterização, incidência e ecologia de micorrizas em viveiro e florestas de *Eucalyptus* spp. na região de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa: UFV, 1984. 55p. Dissert. (Mestrado em Microbiologia Agrícola)
- SMITH, S. E. & READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1997. 605p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Estatísticas: área plantada com pinus e eucalipto no Brasil (Ha)-2000. Disponível em: [http://www.sbs.org.br/area\\_plantada.htm](http://www.sbs.org.br/area_plantada.htm). Acesso em: 08 dez 2002
- THOMAZINI, L. I. Mycorrhiza in plant of cerrado. **Plant Soil**, v.41, p.707-711, 1974.
- THOMSON, B. D.; GROVE, T. S.; MALAJCZUK, N.; HARDY, G. E. St. J. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi to increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. **New Phytol.**, v.126, p.517-524, 1994.
- TONKIN, C. M.; MALAJCZUK, N.; MCCOMB, J. A. Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. **New Phytol.**, v.111, p.209-214, 1989.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNA. **Plant J.**, v.25, p.181-191, 2001.
- VOZZO, J. A. & HACKSKAYLO, E. Inoculation of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. **For. Sci.**, v.17, p.239-45, 1971. 🌲