

JAMIL DE MORAIS PEREIRA

JAMIL DE MORAIS PEREIRA

Atividade da Redutase do Nitrato e Associação
Ectomicorrizica em Mudras de Eucalyptus grandis
em Resposta ao Nitrato

Atividade da Redutase do Nitrato e Associação
Ectomicorrizica em Mudras de Eucalyptus grandis
em Resposta ao Nitrato

Trabalho de Conclusão de Curso de Microbiologia
Agrícola, para obtenção do Título
de "Bacharel em Ciências"

VICOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
JANEIRO-1993

JAMIL DE MORAIS PEREIRA

JAMIL DE MORAIS PEREIRA

Atividade da Redutase do Nitrato e Associação
Ectomicorrízica em Mudas de *Eucalyptus grandis*
em Resposta ao Nitrato

Atividade da Redutase do Nitrato e Associação
Ectomicorrízica em Mudas de *Eucalyptus grandis*
em Resposta ao Nitrato

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Microbiologia
Agrícola, para Obtenção do Título
de "Magister Scientiae".

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Microbiologia
Agrícola, para Obtenção do Título
de "Magister Scientiae".

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

Prof. Paulo Roberto Trindade

Prof. Paulo Roberto Trindade

VICOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
JANEIRO- 1993

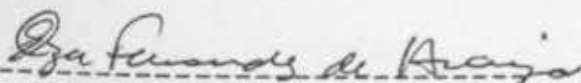
Prof. Paulo Roberto Trindade
Presidente do Banca Examinadora

JAMIL DE MORAIS PEREIRA

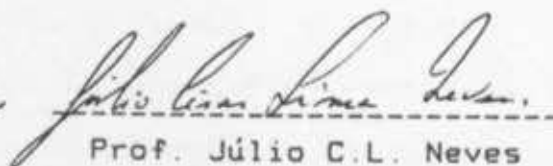
Atividade da Redutase do Nitrato e Associação
Ectomicorrízica em Mudas de Eucalyptus grandis
em Resposta ao Nitrato

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Microbiologia
Agrícola, para Obtenção do Título
de "Magister Scientiae".

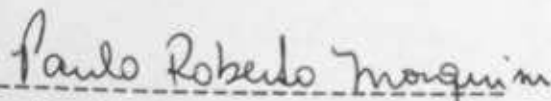
APROVADA: 9 de abril de 1992



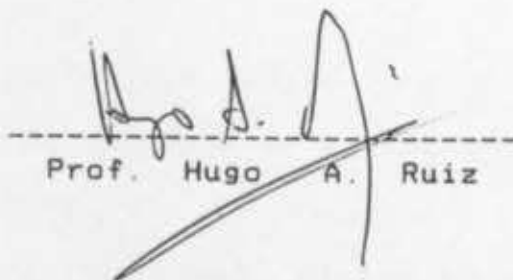
Prof. Elza F. de Araújo
(Conselheiro)



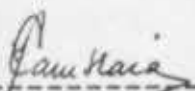
Prof. Júlio C.L. Neves



Prof. Paulo R. Mosquim



Prof. Hugo A. Ruiz



Prof. José Cambráia
(Presidente da Banca Examinadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Aos meus pais,

Aos meus irmãos,

À Verônica.

A Professora Rosa Maria Castro Machado, pela orientação, pelas ensinamentos, dedicação e amizade.

Aos Professores José Coimbra e Elza Fernandes de Araújo, pela colaboração na redação deste trabalho e pela inestimável atenção e incentivo.

Aos Professores Hugo Alberto Ruiz, Jilão César Lima e Silva, Paulo Roberto Nepomuceno e Náirya Fátima de Barros, pela atenção, pelas críticas e sugestões.

Aos Professores Maria Carolina Jardim, Wilson Gleanny Silva, Walter Vieira Guimarães, Arnaldo César Borges, Sérgio Nilton Alves Cassol, Maria Cristina Santos Vazetti, Jorge Luiz Cavalcante Costa e Virajéia Maria Alves Chaves.

pelos ensinamentos, apoio e considerações

Aos colegas Maria Carlota Horici, Ester da Moura
Rios, Maria Helena Brusque, Euláudio Souza Dias, João
Baltazar, Sérgio Neves, Aldo Vitor Trindade, Dimer Kloubert
Filho e Anáize Borges Henriques, pela amizade e cooperação
agradáveis

Aos funcionários Benito Cavilha, José Estevão, José
Cecílio, Estênia Roberto, Paulo Sultana, José Carlos,
Carla Torres, Berling e Sebastião, pelo apoio e amizade

A mãe, Cleusa Maria e família, pela amizade e
consideração

AGRADECIMENTOS

Aos Irmãos da Igreja Presbiteriana do Vale do Sul,
pela amizade e cooperação agradáveis

À Universidade Federal de Vicosa e à Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela
oportunidade de realizar este curso.

À Professora Rosa Maria Castro Muchovej, pela
orientação, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Aos Professores José Cambraia e Elza Fernandes de
Araújo, pela colaboração na redação deste trabalho e pela
indispensável atenção e incentivo.

Aos Professores Hugo Alberto Ruiz, Júlio César Lima
Neves, Paulo Roberto Mosquim e Nairam Felix de Barros, pela
atenção, pelas críticas e sugestões.

Aos Professores Maria Catarina Megumi, Daison Olzany
Silva, Walter Vieira Guimarães, Arnaldo Chaer Borges,
Sérvio Túlio Alves Cassini, Maria Cristina Dantas Vanetti,
Jorge Luis Cavalcante Coelho e Virgínia Maria Alves Chaves,

pelos ensinamentos, apoio e consideração.

Aos colegas Maria Carlota Enrici, Ester de Moura Rios, Maria Helena Brumano, Eustáquio Souza Dias, João Batista Simão Pavesi, Aldo Vilar Trindade, Osmar Klauberg Filho e Anaíze Borges Henriques, pela amizade e convívio agradável.

Aos funcionários Danilo Coelho, José Reinaldo, José Cesário, Antônio Roberto, Paulo Santana, José Carlos, Carlos Torres, Berhing e Sebastião, pelo apoio e amizade.

À Leila Celeste Mafia e família, pela amizade e consideração.

Aos irmãos da Igreja Presbiteriana do Vale do Sol, pela amizade e convívio agradável.

Em especial à Verônica Soares de Paula, pelo carinho, incentivo constante, dedicação e companheirismo.

Aos meus pais e irmãos, pela consideração, apoio e incentivo.

Em março de 1982, iniciei, na Universidade Federal de Goiás, o curso de Mestrado em Microbiologia Aplicada, na área de Microbiologia de Água.

BIOGRAFIA

Jamil de Moraes Pereira, filho de Júlio de Moraes Pereira e Osória Alexandrina Pereira, nasceu na cidade de Iguape, São Paulo, no dia 12 de janeiro de 1963.

Em fevereiro de 1988, graduou-se em Agronomia pela Fundação Universidade Estadual de Maringá (FUEM), Maringá-Paraná.

Em março de 1988, iniciou, na Universidade Federal de Viçosa, o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na área de microbiologia do solo.

2.2	Avaliação da atividade do Nitryla (M.C. 1.4.1.1) em culturas de <i>Phaseolus linearis</i> isolados 1983 e 1987 - <i>Phaseolus linearis</i> e <i>Sclerotinia</i> sp.	12
3.2	Defecção de plantas rizomatosas de <i>Eragrostis arvensis</i>	14
3.4	Atividade da cultura do Nitryla (M.C. 1.4.1.1) em culturas de <i>Eragrostis arvensis</i> inoculadas com <i>Phaseolus linearis</i> isolados 1983 e 1987, em função de doses de Nitryla aplicadas	

4.1	Atividade da Redutase do Nitrato no Micélio de Fungos Micorrizícos	20
4.2	Colonização Micorrizíca	24
4.3	Produção de Matéria Seca da Parte Aérea e Raiz	22
4.4	Atividade da Redutase do Nitrato	26
4.5	Conteúdo de "N-NO ₃ ", N-Total e P da Parte Aérea das Plantas	31
4.6	Eficiência de Utilização de N e P na Parte Aérea das Plantas	38
5	REFERÊNCIAS E CONCLUSÕES	53

BIBLIOGRAFIA

viii
xi
xii
1
3
12
12
13
14

Página

LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
EXTRATO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Obtenção do Inóculo dos Isolados de <u>Pisolithus tinctorius</u> , <u>Scleroderma</u> sp. e <u>Paxillus involutus</u>	12
3.2. Atividade da Redutase do Nitrato (RN)(E.C.1.6.6.1) em Micélio de <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados IS83 e RS27, <u>Paxillus involutus</u> e <u>Scleroderma</u> sp	13
3.3. Obtenção de Plantas Micorrizadas de <u>Eucalyptus grandis</u>	14
3.4. Atividade da Redutase do Nitrato (RN) (E.C.1.6.6.1) em Mudras de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de Nitrato Aplicadas	

ao Solo	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Atividade da Redutase do Nitrato no Micélio de Fungos Ectomicorrízicos ...	20
4.2. Colonização Ectomicorrízica	28
4.3. Produção de Matéria Seca da Parte Aérea e Raiz	32
4.4. Atividade da Redutase do Nitrato	36
4.5. Conteúdo de $N-NO_3^-$, N-Total e P da Parte Aérea das Plantas	41
4.6. Eficiência de Utilização de N e P na Parte Aérea das Plantas	50
5. RESUMO E CONCLUSÕES	53
BIBLIOGRAFIA	56
APÊNDICE	67
1. Atividade da Redutase do Nitrato no Micélio de Fungos Ectomicorrízicos em Meio Líquido em Diferentes Formas de N	71
2. Ação do Micélio de Fungos Ectomicorrízicos Crescidos em Meio Contendo Diferentes Formas de N na Parte Aérea das Plantas	74
3. Ação do "Fim" dos Meios Contendo Diferentes Formas de N, sobre o Crescimento dos Fungos ...	78
4. Colonização Ectomicorrízica de Raízes de Mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> Inoculadas no Mito com <i>Rhizoglyphus nigricans</i> , em Tubo de Enxerto de Nitrato	84
5. Atividade da Redutase da Parte Aérea das Mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> Inoculadas no Mito com <i>Rhizoglyphus nigricans</i> , em Tubo de Enxerto de Nitrato	88
6. Técnicas de Inoculação Aplicadas para Estudo da Redutase do Nitrato (I), no Tubo de Enxerto de N (II), para Seta Inoculada de <i>Rhizoglyphus nigricans</i>	92

9	Conteúdo de $N-NH_4^+$ na Parte Aérea de Mudas de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	42
10	Conteúdo de $N-NO_3^-$ na Parte Aérea de Mudas de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	43
11	Conteúdo de P na Parte Aérea de Mudas de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	46

LISTA DE QUADROS

12	Eficiência de Utilização (EUN) de N-Total e N da Parte Aérea de Mudas de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	52
1	Características Químicas do Solo Utilizado no Experimento, Antes e Depois da Fertilização Básica	16
2	Atividade da Redutase do Nitrato no Micélio de Fungos Ectomicorrízicos Crescidos em Meios Contendo Diferentes Formas de N	21
3	Peso de Micélio Seco de Fungos Ectomicorrízicos Crescidos em Meios Contendo Diferentes Formas de N	24
4	Redução do pH Final dos Meios Contendo Diferentes Formas de N, Após o Crescimento dos Fungos	26
5	Colonização Ectomicorrízica de Raízes de Mudas de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	29
6	Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e das Raízes (MSRA) de Mudas de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	33
7	Atividade da Redutase do Nitrato na Parte Aérea de Mudas de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	38
8	Equações de Regressão Ajustadas, para Atividade da Redutase do Nitrato (Y), em Função de Doses de N (X), para Dois Isolados de <u>Pisolithus tinctorius</u>	40

9	Conteúdo de $N-NO_3^-$ na Parte Aérea de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	42
10	Conteúdo de N-Total na Parte Aérea de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	45
11	Conteúdo de P na Parte Aérea de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato	48
12	Eficiência de Utilização (EU) de N-Total e P de Partes Aéreas de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> , em Função de Doses de Nitrato ..	52
13	Equações de Regressão Ajustadas para Eficiência de Utilização de N e P (Y) em Função de Doses de N (X), para Dois Isolados de <u>Pisolithus tinctorius</u>	52
1A	Resumo de Análise de Variância dos Dados de Peso Seco de Micélio, Atividade da Redutase do Nitrato (ARN) e Diferença de pH dos Meios Antes e Depois do Crescimento dos Fungos (Dph)	67
2A	Resumo de Análise de Variância dos Dados de Porcentagem de Formação Ectomicorrizica de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de N. Médias de Quatro Repetições	68
3A	Resumo de Análise de Variância dos Dados de Peso de Matéria Seca de Parte Aérea (MSPA), Peso de Matéria Seca de Raiz (MSRA) e Atividade da Redutase do Nitrato (ARN) de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de Nitrato. Médias de Quatro Repetições	68
4A	Resumo de Análise de Variância dos Dados de Conteúdo de P, $N-NO_3^-$ e N-total da Parte Aérea de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de Nitrato. Médias de Quatro Repetições	69

5A Resumo de Análise de Variância dos Dados de Teores de N-Total, N-NO₃⁻ e P de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius Isolados IS-83 e RS27, em Função de Doses de Nitrato. Médias de Quatro Repetições 69

6A Resumo de Análise de Variância dos Dados de (EU) Eficiência de Utilização de N e P de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de Nitrato. Médias de Quatro Repetições 70

1) Caracterização Ictioquímica de Raízes de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (PI-1203) e (PI-827), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo 34

2) Matéria Seca da Parte Aérea de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (PI-1203) e (PI-827), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo 35

3) Matéria Seca de Raízes de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (PI-1203) e (PI-827), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo 36

4) Conteúdo de N-NO₃⁻ de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (PI-1203) e (PI-827), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo 43

5) Conteúdo de N-Total de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (PI-1203) e (PI-827), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo 44

6) Conteúdo de P de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (PI-1203) e (PI-827), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo 47

LISTA DE FIGURAS

1	Colonização Ectomicorrízica de Raízes de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo	30
2	Matéria Seca da Parte Aérea de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo	35
3	Matéria Seca de Raízes de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo	36
4	Conteúdo de $N-NO_3^-$ de Partes Aéreas de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo	43
5	Conteúdo de N-Total de Partes Aéreas de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo	46
6	Conteúdo de P de Partes Aéreas de Mudanças de <u>Eucalyptus grandis</u> Inoculadas ou Não com <u>Pisolithus tinctorius</u> Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo	49

EXTRATO

PEREIRA, Jamil de Moraes, M.S., Universidade Federal de Viosa, Janeiro de 1993. Atividade da Redutase do Nitrato e Associação Ectomicorrízica em Mudras de Eucalyptus grandis em Resposta ao Nitrato. Professor Orientador: Rosa Maria Castro Muchovej. Professores conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e José Cambraia.

Foi estudada, em condições de laboratório, a capacidade de fungos ectomicorrízicos reduzir o nitrato pela determinação da atividade da redutase do nitrato (RN). Testaram-se quatro fungos ectomicorrízicos, Pisolithus tinctorius (IS-83, Viosa- MG), Pisolithus tinctorius (RS-27, Guaíba-RS), Paxillus involutus (Franca) e Scleroderma sp. (Itabira- MG), crescidos por 28 dias na presença de $N-NH_4^+$ ou $N-NO_3^-$ ou uma mistura dos dois na proporção de 1:1, em cinco repetições. Os dois isolados de P. tinctorius apresentaram atividade da RN maior do que as demais espécies quando crescidas em meio contendo $N-NH_4^+$ + $N-NO_3^-$ ou apenas em $N-NO_3^-$. Os isolados de P. tinctorius apresentaram as maiores atividades da RN que os demais

fungos, exceto no meio contendo apenas $N-NH_4^+$. Nos isolados de P. tinctorius a atividade da RN aumentou com o cultivo do fungo em meio contendo exclusivamente $N-NO_3^-$, enquanto os demais não foram afetados. De modo geral, verificou-se uma relação inversa entre atividade da RN e massa micelial produzida.

Em condições de casa-de-vegetação, foi estudado o efeito de doses de nitrato (0, 50, 75, 100 e 200 ppm de N) no estabelecimento da colonização micorrízica, na atividade da RN e na composição mineral de mudas de Eucalyptus grandis inoculadas ou não com Pisolithus tinctorius.

As porcentagens de colonização aumentaram com as doses de nitrato, atingindo um máximo em 91 e 108 ppm nas plantas inoculadas com P. tinctorius isolados RS27 e IS83, respectivamente. O peso de matéria seca da parte aérea não diferiu estatisticamente entre as plantas inoculadas e não inoculadas. Já o peso de matéria seca de raiz das plantas inoculadas foi superior àquelas do controle. A atividade da RN nas plantas inoculadas com P. tinctorius isolado RS27 foi superior àquelas inoculadas com P. tinctorius IS83 e plantas controle. O conteúdo de $N-NO_3^-$ nas plantas inoculadas foi superior às do controle. Entretanto, o conteúdo de N total e P variou com a inoculação e doses de nitrato aplicadas ao solo. Em média, as plantas inoculadas apresentaram maior eficiência de utilização de N, enquanto que a eficiência de utilização de P variou com as doses de N aplicadas ao solo.

A utilização de adubos orgânicos de fertilizantes, embora resulte em parte em parte, pode favorecer o estabelecimento de micorrizas e resultar em maior produtividade de culturas diversas da cana.

O estudo foi feito de forma que se possa avaliar a importância de nutrientes como adubo na cultura principalmente em relação ao benefício de associação proporcionado pelas hifas.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as interações planta-microrganismos existentes na natureza, as associações simbióticas mutualísticas estabelecidas por determinados fungos de solo e raízes de plantas vasculares, denominadas de "micorrizas", têm despertado grande interesse, devido ao seu reconhecido benefício para as plantas.

Considerando os diferentes tipos de micorrizas existentes, as ectomicorrizas são mais freqüentes em espécies florestais. No Brasil, em condições naturais, espécies de Eucalyptus sp. apresentam esse tipo de associação, principalmente com Pisolithus tinctorius e Scleroderma sp. A ocorrência de ectomicorrizas em viveiros de produção de mudas de Eucalyptus sp. é quase inexistente, em razão principalmente do uso em grande escala de fertilizantes minerais, como os fosfatados e nitrogenados.

A utilização de menores quantidades de fertilizantes, embora resulte em mudas de menor porte, pode favorecer o estabelecimento da associação micorrízica e resultar em mudas de maior resistência às condições adversas de campo.

O manto fúngico em torno das raízes das plantas aumenta a absorção de nutrientes pouco móveis no solo principalmente pelo aumento da superfície de absorção proporcionado pelas hifas fúngicas. Fungos ectomicorrízicos podem aumentar a absorção de N pelas plantas, pela ação de enzimas miceliais que atuam sobre formas orgânicas de N do solo tornando-as mais assimiláveis pelas plantas. Além disso, podem contribuir na redução e na assimilação de N, principalmente quando ele é fornecido na forma de nitrato.

Considerando que na produção de mudas de Eucalyptus sp. são utilizados adubos nitrogenados na forma nítrica e que existe grande diversidade fisiológica entre os fungos ectomicorrízicos, este trabalho objetiva: 1) Determinar a capacidade de fungos ectomicorrízicos de reduzir o nitrato em condições de cultura pura. 2) Avaliar o efeito de doses de N na forma nítrica sobre o estabelecimento da colonização ectomicorrízica, a atividade da redutase do nitrato e composição mineral de mudas de E. grandis inoculadas com Pisolithus tinctorius.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Uma das características importantes das plantas superiores é sua capacidade de formar associações micorrízicas com determinados fungos do solo. Em razão da ampla ocorrência dessas associações com diversos gêneros de plantas, MARX e BRYAN (1975) admitem que se deve considerar como exceção as plantas destituídas de tais associações.

A importância das micorrizas para as plantas tem sido referenciada por diversos autores, sendo o fungo nessa associação mutualística beneficiado pela aquisição de carboidratos, aminoácidos e vitaminas da planta, e este por sua vez proporciona a esta maior absorção de nutrientes, principalmente N e P (BOWEN, 1973), maior resistência ao "stress" hídrico e a patógenos do solo (BRADLEY et alii, 1981; ZAMBOLIM e SIQUEIRA, 1985; MORSELT et alii, 1986), estimulação da fixação simbiótica do nitrogênio e maior taxa fotossintética (SMITH e DAFT, 1977; KUCEY e PAUL, 1982; EKWEBELAM e REID, 1983). O estabelecimento rápido e

permanente dessas associações é favorecido em condições de baixa disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente fósforo e nitrogênio, alta intensidade luminosa, e também pela capacidade de colonização do próprio fungo e sua competitividade com populações nativas do solo (ASHTON 1976; MOSSE et alii, 1981; LAPEYRIE e BRUCHET, 1985; GARBAYE et alii, 1988). Atualmente essas associações se revestem de tal importância que a obtenção de mudas de espécies florestais para reflorestamentos deve incluir, além das qualidades fisiológicas usuais, a presença de fungos micorrízicos associados às suas raízes.

A ocorrência de fungos ectomicorrízicos em viveiros e em florestas de Eucalyptus tem sido constatada no Brasil e em outros países (TRAPPE e GUSMAN, 1971; MARX, 1977a; BARROS et alii, 1978; YOKOMIZO, 1981; CHU-CHOU e GRACE, 1982; ZAMBOLIM e BARROS, 1982; SCHWAN, 1984). Nesses levantamentos têm sido identificadas diversas espécies de fungos endo e ectomicorrízicos associados às várias espécies de Eucalyptus. Pisolithus tinctorius, uma das espécies de fungo ectomicorrízico mais amplamente distribuída pelo mundo (MARX, 1977a), sendo encontrada em associações com Pinus mesmo em condições adversas, em solos erodidos, de baixa fertilidade e oriundos de atividades de mineração (MARX e ARTMAN, 1979; MARX, 1980; VALDEZ, 1986).

As plantas e os microrganismos requerem diversos nutrientes para seu desenvolvimento. O N é um dos elementos mais importantes na constituição de moléculas

fundamentais ao metabolismo dos organismos, tais como: coenzimas, ácidos nucleicos e proteínas (EPSTEIN, 1975 ; MARSCHNER, 1986). A absorção de N pelas raízes das plantas pode ocorrer na forma de $N-NH_4^+$ ou $N-NO_3^-$, e, em algumas plantas, na forma de uréia (EPSTEIN, 1975, MARSCHNER, 1986). A disponibilidade dessas formas de N no ecossistema pode variar, dependendo de fatores climáticos, edáficos e da atividade de microrganismos do solo (KRAJINA et alii, 1973; VITOUSEK et alii, 1979; VOGT e EDMONDS, 1982).

VALE et alii (1984) constataram que Eucalyptus alba absorve N preferencialmente na forma de $N-NH_4^+$, a forma predominante em solos ácidos. Entretanto, LOCATELLI (1984), estudando a resposta de Eucalyptus grandis a proporções variáveis de $N-NH_4^+/N-NO_3^-$, em solução nutritiva, verificou que a maior produção de matéria seca total ocorreu na relação 50/50, enquanto a maior produção de raiz foi obtida com 59% de $N-NO_3^-$ na solução. BARROS e PRICHETT (1978), estudando o efeito de N no crescimento de E. grandis em condições de campo, demonstraram que o nitrato de amônio proporcionou melhores resultados do que o sulfato de amônio. Utilizando solo, em condições de casa-de-vegetação, LOCATELLI (1984) não encontrou diferenças significativas entre as fontes nítrica e amoniacal aplicadas no desenvolvimento de mudas de E. grandis, sugerindo que essa espécie possa se desenvolver satisfatoriamente tanto na presença de nitrato como de amônio. Nas espécies E. regnans e E. obliqua, foi

verificada redução no crescimento, quando cultivadas em $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$, respectivamente (ADAMS e ATTWILL, 1982b).

O nível de nutrientes no solo, principalmente N e P, pode influenciar na colonização do sistema radicular e no desenvolvimento de ectomicorrizas em Pinus sp (RICHARDS e WILSON, 1963; MARX et alii, 1977b; MENDONÇA, 1991); em Quercus sp, DIXON et alii (1984) e em Eucalyptus grandis (SOARES et alii, 1990). De acordo com ASHTON (1976) e PICHÉ e FORTIN (1982), o desenvolvimento de micorrizas é favorecido pelo aumento da intensidade luminosa, mas é prejudicado por elevados níveis de N. O efeito da inoculação de Pinus contorta com Pisolithus tinctorius e Suillus granulatus no aumento do conteúdo de nutrientes da parte aérea e crescimento das plantas foi relatado por EKWEBELAM e REID (1983). Segundo esses autores, as maiores percentagens de colonização micorrízicas foram obtidas sob alta intensidade luminosa e em teor de N adicionado em torno de 62 ppm. Para MARX et alii (1977b), altos teores de N e P no solo resultaram em menores quantidades de sacarose na raiz de Pinus taeda, ocorrendo uma diminuição na susceptibilidade ao desenvolvimento de ectomicorrizas por Pisolithus tinctorius. Entretanto, a maior colonização micorrízica foi obtida quando os níveis de N eram elevados e os de P baixos, sugerindo que um balanço nutricional, principalmente entre N e P, seja importante no processo de colonização. BECKJORD et alii (1980) relataram um aumento na formação de micorrizas em plantas de Quercus rubra inoculadas com Pisolithus

tinctorius em níveis de N, na forma de NaNO_3 , variando de 0 a 53,2 mg de N/planta. Contudo, em nenhum dos tratamentos as plantas micorrizadas diferiram das do controle não inoculadas em relação ao conteúdo de N na parte aérea, embora esse conteúdo tenha sido menor em relação a P. No entanto, REID et alii (1983) demonstraram que plantas de Pinus taeda inoculadas com Pisolithus tinctorius apresentavam maiores teores de P e N, maior peso de matéria seca e percentagem de colonização micorrízica do que as plantas controle não inoculadas. Efeitos semelhantes foram relatados por ALEXANDER e FAIRLEY, (1986), em que a taxa de crescimento e absorção de N em Picea sitchensis inoculadas e cultivadas em níveis crescentes de N, adicionado na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, também apresentaram diferenças significativas quanto à absorção desse elemento, enquanto níveis mais elevados de N afetaram a percentagem de colonização micorrízica. A maior absorção de P e de N pelo sistema micorrízico parece não ser devido apenas ao aumento da área superficial de absorção e ao volume de solo explorado (BOWEN, 1973). Os fungos possuem enzimas, tais como fosfatases e proteases que atuam sobre formas orgânicas de P e de N do solo, não disponíveis para as plantas, tornando-as acessíveis a estas. Por outro lado, o carbono fornecido pela planta ao fungo associado ao sistema radicular favorece sua competição com outras populações de fungos nativas do solo por essas formas orgânicas (BARTLETT e LEWIS, 1973; ABUZINADAH e READ,

1986ab ABUZINADAH et alii, 1986, MARTIN et alii 1987, ABUZINADAH e READ, 1989a, 1989b; READ et alii 1989).

Em solos florestais, o N orgânico pode ser utilizado diretamente como tal pela hifa do fungo e ser estocado no manto por ele mesmo ou pela raiz da planta, para posterior utilização como fonte de C ou N, BLEDSOE e RYGIEWICZ (1986) e BLEDSOE et alii (1989). Além disso, as micorrizas liberam menor quantidade de H^+ por $N-NH_4^+$ absorvido, promovendo maior absorção desse íon em decorrência de menores reduções do pH na rizosfera e diminuindo, conseqüentemente, as perdas de cátions pelas raízes (RYGIEWICZ et alii, 1984a; BLEDSOE e RYGIEWICZ, 1986).

O nitrato absorvido pelo sistema radicular pode ser armazenado e/ou reduzido e o excedente translocado para a parte aérea onde será também reduzido e utilizado pela planta (OAKS, 1986). O custo de carbono e energia para a assimilação de $N-NO_3^-$ é maior do que para a assimilação do $N-NH_4^+$ (DRIESSCHE e DANGERFIELD, 1975; SALSAC et alii 1987; MARGOLIS e VEZINA, 1988). Contudo, a maioria das espécies apresentam crescimento reduzido na presença de $N-NH_4^+$, em razão de uma diminuição no conteúdo de cátions e ânions orgânicos (SALSAC et alii, 1987). A distribuição da assimilação do $N-NO_3^-$ nas espécies tropicais, entre parte aérea e raiz, varia de acordo com a espécie vegetal (ANDREWS 1986). A redução e a assimilação pode ocorrer no sistema radicular, quando os teores do ânion no solo são baixos e maiores absorções desse íon podem promover um aumento na sua translocação para a parte aérea, onde também

se dará a redução. O $N-NO_3^-$ absorvido distribui-se em dois compartimentos, no "pool" metabólico ativo e no "pool" de armazenamento (FERRARI et alii, 1973). O $N-NO_3^-$ translocado para outras partes da planta ou destinado à redução provém basicamente do "pool" metabólico. A concentração de nitrato nesse "pool", entretanto, permanece essencialmente constante uma vez que este ânion pode mover-se para o "pool" de armazenamento (OAKS, 1986).

A assimilação do N absorvido na forma de $N-NO_3^-$, por plantas e fungos micorrízicos, implica, numa primeira etapa de redução deste ânion, na participação da enzima redutase do nitrato (RN) (SRIVASTAVA, 1980; BEEVERS e HAGEMAN, 1983; PLASSARD et alii, 1986). A atividade da RN tem sido estudada em diversos gêneros de plantas associadas ou não a fungos micorrízicos (PATE, 1973; ADAMS e ATTIWILL, 1982b; SMIRNOFF et alii, 1984). Essa atividade pode ser detectada na parte aérea e raiz das plantas, variando com a espécie vegetal e presença das formas de N no solo ou solução nutritiva. BIGG e DANIEL (1978) estudaram o efeito do $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$ na atividade da RN em coníferas, constatando que na presença de $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+ + N-NO_3^-$ na solução as espécies Pinus contorta e Picea engelmanni apresentaram maior atividade. Acredita-se que isto aconteceu em função da maior quantidade de ápices radiculares finos observados nessas condições. Em E. regnans e E. obliqua a atividade da RN foi mais expressiva nas raízes do que na parte aérea das

plantas que apresentaram maior crescimento em $N-NO_3^-$ como fonte de N (ADAMS e ATTIWILL, 1982a.). Em *E. grandis*, a atividade da RN nas folhas foi cerca de cinco vezes maior que no sistema radicular, quando o N foi fornecido exclusivamente na forma de $N-NO_3^-$ (COSTA, 1986). Neste caso observou-se inclusive redução na atividade da enzima quando o teor de $N-NH_4^+$ foi aumentado na solução nutritiva. Quando o N foi fornecido na forma de $N-NO_3^-$, observou-se acúmulo desta forma de N nas raízes de *E. grandis*, também demonstrando baixa capacidade de redução do nitrato absorvido (CALDEIRA, 1988).

Alguns autores, porém, não detectaram a atividade dessa enzima em sistemas ectomicorrízicos (VEZINA et alii, 1989) e em micélios de fungos obtidos a partir de cultura pura (MENTION e PLASSARD, 1983; PLASSARD et alii 1986).

A redutase do nitrato está presente em várias espécies de fungos micorrízicos (HO e TRAPPE, 1980; PLASSARD et alii, 1986; VEZINA et alii, 1989; HO, 1988) inclusive em *Pisolithus tinctorius* (HO, 1986; SARJALA, 1990); HENRIQUES et alii, 1992). Dentre as espécies fúngicas comumente associadas a *Pseudotsuga menziesii*, as que apresentaram as maiores atividades da RN foram: *Cenococcum geophilum*, *Piloderma bicolor* e *Rhizogogon vinicolor* (HO e TRAPPE, 1980). A atividade desta enzima no micélio fúngico é variável com a espécie e mesmo entre isolados de uma mesma espécie, como evidenciado para diversos isolados de *P. tinctorius* (HO, 1986; HO e TRAPPE, 1987; HO, 1988). De acordo com esses autores, essa variação oscilou entre

0,17 e 21,48 umoles de $\text{NO}_2^-/\text{gMSH}$. A diferença na capacidade de redução e assimilação do nitrato a nível de isolado de uma mesma espécie fúngica torna-se uma característica desejável para seleção destes fungos, visando utilizá-los em programas de inoculação controlada de mudas de espécies florestais. Assim, a caracterização fisiológica das espécies de fungos micorrízicos existentes em nossas condições torna-se um fator importante, que pode melhorar o rendimento das espécies vegetais em condições naturais.

3.1 Origem do isolado de *Glomus* e *Glomus*

Para obtenção de isolados de *Glomus* e *Glomus* foram coletadas plantas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* em áreas de floresta nativa no município de Vitória (ES), Brasil (20° S, 49° W). Os isolados foram obtidos a partir de raízes de plantas coletadas em áreas de floresta nativa no município de Vitória (ES), Brasil (20° S, 49° W). Os isolados foram obtidos a partir de raízes de plantas coletadas em áreas de floresta nativa no município de Vitória (ES), Brasil (20° S, 49° W).

Para obtenção de isolados de *Glomus* e *Glomus* foram coletadas plantas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* em áreas de floresta nativa no município de Vitória (ES), Brasil (20° S, 49° W). Os isolados foram obtidos a partir de raízes de plantas coletadas em áreas de floresta nativa no município de Vitória (ES), Brasil (20° S, 49° W).

colocadas em tubos de cultura. Os tubos foram incubados a 28°C por 25 dias, sendo coletados diariamente em diferentes dias.

3.2 Atividade in vivo da redução do nitrato no micélio de Pisolithus tinctorius isolados 1983 e 1987; Paxillus involutus e Scleroderma sp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Inóculo dos Isolados de Pisolithus tinctorius, Scleroderma sp. e Paxillus involutus

Foram utilizados os isolados IS 83 e RS 27 do fungo Pisolithus tinctorius, isolado Scl-ita do fungo Scleroderma sp., isolados de basidiocarpos oriundos de plantações de Eucalyptus spp. do município de Viçosa (MG), Guaíba (RS) e Itabira (Mg), respectivamente. O fungo P. involutus foi obtido do INRA, Nancy (França). Esses isolados foram obtidos da coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Para obtenção do inóculo, micélio dos fungos P. tinctorius, Scleroderma sp. e P. involutus foram crescidos em placas de Petri contendo 20 ml de meio Merlin-Norkrans modificado (MNM) sólido (MARX, 1969), a 28°C por 25 dias. Quatro discos de meio MNM com 5 mm de diâmetro, contendo do fungo, foram retirados das bordas das colônias

e colocadas em tubos de cultura. Os tubos foram incubados a 28°C por 22 dias, sendo agitados diariamente em agitador tipo Vortex.

3.2. Atividade da redutase do nitrato em micélio de Pisolithus tinctorius isolados IS83 e RS27, Paxillus involutus e Scleroderma sp.

A atividade "in vivo" da redutase do nitrato (RN) (E.C.1.6.6.1) foi determinada em micélios de Pisolithus tinctorius isolados IS83 e RS27, Paxillus involutus e Scleroderma sp. obtidos de acordo com o item 3.1. Quatro discos de meio MNM sólido com aproximadamente 5 mm de diâmetro, contendo os fungos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio MNM líquido. A concentração final de N neste meio era de 2,3 mM, na forma de: nitrato, amônio ou nitrato+amônio na proporção de 1:1, tendo como fontes KNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Os frascos inoculados foram incubados a 28°C e mantidos sem agitação.

O experimento foi conduzido em laboratório, em arranjo fatorial (4 x 3), constituído pelos fungos, formas de nitrogênio (N-NO_3^- , N-NH_4^+ e a mistura de ambos), no esquema inteiramente casualizado, em cinco repetições. Vinte e oito dias após a inoculação dos fungos, os micélios produzidos foram transferidos para frascos de 10 ml esterilizados e envoltos em papel alumínio, contendo um meio de reação constituído de : tampão fosfato 100 mM,

pH 7,5, succinato de sódio 100 mM, pH 7 e KNO_3 100 mM, filtrado em membrana tipo Millipore de 0,22 micrômetros. A seguir, os tubos foram submetidos a vácuo por 10 minutos e incubados, em banho maria, a 35°C por um período de uma hora (HO e TRAPPE, 1975). Dois ml do meio de reação foram transferidos para tubos de ensaio, adicionado-se a estes o mesmo volume de uma mistura de sulfanilamida 1% e n-naftiletilenodiamino 0,02% em HCl 1,5 N (STREETER e BOSLER, 1972). Após 30 minutos, o conteúdo dos tubos foi filtrado e a quantidade de nitrito formada foi determinada por colorimetria a 540 nm. A matéria seca dos fungos foi determinada após secagem em estufa a 105°C por 48 horas. Os resultados foram expressos em micromoles de nitrito produzido por grama de matéria seca por hora. Determinou-se antes do ensaio enzimático o pH final do meio de cultivo de cada amostra.

A análise de variância e posterior comparação de médias feitas pelo teste de Student Newman-Keuls foram efetuadas para atividade da RN, peso de micélio seco e variação do pH inicial dos meios de cultivo.

3.3. Obtenção de Plantas Micorrizadas de Eucalyptus grandis

Sementes de Eucalyptus grandis (W. Hill ex. Maiden) foram desinfestadas superficialmente com H_2O_2 30%, durante 10 minutos, lavadas em água esterilizada e colocadas para germinar em bandejas com areia lavada e autoclavada. Vinte dias após a germinação, as plântulas foram transferidas

para os vasos, mantendo-se uma planta por vaso.

O cultivo foi realizado em casa-de-vegetação em uma amostra de um Latossolo Vermelho-Amarelo, coletado na profundidade de 0 a 20 cm, de uma área do setor de Dendrologia da Universidade Federal de Viçosa. O solo foi destorroado, secado ao ar, passado por peneira com abertura de 2 mm de malha e amostrado para análise química (Quadro 1). Em seguida foi colocado em caixas de amianto de 1 m^3 para fumigação com brometo de metila, na dosagem de $90 \text{ cm}^3/\text{m}^3$ de solo. Esta operação foi repetida 48 horas após a primeira aplicação. A calagem foi efetuada, a seguir elevando-se o pH para 5,5 com base em curva de incubação, pela adição de uma mistura de CaCO_3 e MgCO_3 , na relação 4:1 em equivalentes. Nessa ocasião, foi também efetuada uma adubação com P e K, à base de 75 mg P/kg de solo e 200 mg K/kg de solo, respectivamente, tendo como fontes KH_2PO_4 e KCl . Porções de 1,6 kg de solo foram acondicionados em sacos plásticos fechados e estes em vasos de polietileno. A umidade do solo foi elevada para 80% da capacidade de campo, seguindo-se um período de incubação de 20 dias.

As doses de N testadas foram de 0, 50, 75, 100 e 200 mg/kg de solo, obtidas pela mistura de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, na relação de ca:mg 4:1 em equivalentes. A adubação nitrogenada foi realizada aos 45, 70 e 95 dias após o transplântio das mudas, adicionando-se 1/3 de cada dose de N, a cada aplicação, na forma de solução.

QUADRO 1- Características Químicas do Solo Utilizado no Experimento, Antes e Após a Fertilização Básica.

Características	Antes	Depois
pH em H ₂ O (1:2,5)	4,3	5,5
Al ⁺³ (meq/100 cm ³) 1/	1,3	0,0
Ca ⁺² (meq/100 cm ³) 1/	0,0	2,8
Mg ⁺² (meq/100 cm ³) 1/	0,0	0,7
P (mg/kg) 2/	1,2	9,3
K (mg/kg) 2/	16,0	194

1/ Extrator: KCl 1N (VETTORI, 1969)

2/ Extrator: Mehlich-1 (VETTORI, 1969)

Micronutrientes foram adicionados ao solo em cobertura aos 60, 80 e 100 dias após o transplântio, aplicando-se um total de 0,81 ppm de B, 3,6 ppm de Mn, 1,32 ppm de Cu, 3,9 ppm de Zn, 0,15 ppm de Mo e 1,56 ppm de Fe, de acordo com ALVAREZ (1974). O enxofre foi também adicionado em cobertura aos 75 dias do transplântio, na dose de 20 mg/kg de solo na forma de solução de Na₂SO₄.

A inoculação com os fungos ectomicorrízicos foi efetuada na época do transplântio das mudas para o vaso de cultivo. A massa micelial resultante do crescimento em cada tubo, como descrito no item 3.1, foi utilizada em cada vaso como inóculo, acrescida de 10 discos de 5 mm de diâmetro de meio MNM sólido contendo micélio fúngico. Momentos antes da inoculação a massa micelial foi coletada em peneira e

lavada com água esterilizada para retirar o excesso de nutrientes, sendo a seguir colocada juntamente com os discos contendo micélio fúngico próximo ao sistema radicular das plantas. Uma segunda inoculação foi realizada 30 dias após a primeira, utilizando-se micélio triturado na forma líquida e aplicado com o auxílio de uma seringa com agulha grossa, próximo ao sistema radicular. A quantidade média de inóculo, em peso de micélio seco, na segunda inoculação foi de aproximadamente 18,00 mg.

3.4 Atividade da Redutase do Nitrato (RN) (E.C.1.6.6.1) em Mudas de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius isolados IS83 e RS27 em Função de Doses de Nitrato Aplicados ao Solo

O experimento foi conduzido por um período de 120 dias e os tratamentos constituíram um esquema fatorial (3 X 5), formado pelos dois isolados de P. tinctorius e um controle sem inoculação, cinco doses de N, no delineamento de blocos ao acaso, em quatro repetições. Durante o período de cultivo, a umidade do solo foi mantida em torno da capacidade de campo, por meio de irrigações periódicas com água destilada.

Aos 120 dias após o transplante, as plantas destinadas à determinação da RN foram transferidas para uma câmara de crescimento, onde permaneceram por 24 horas recebendo aproximadamente 230 umoles de fótons/m².s de radiação fotossinteticamente ativa e as quais foram adicionadas 20 ml de uma solução de 200 ppm de N na forma

de KNO_3 . Decorrido esse tempo foram retirados de 30 a 40 discos de 0,5 cm de diâmetro de folhas completamente expandidas, do mesmo entrenó, na região do terço superior (cerca de 200 mg de matéria fresca) para o ensaio enzimático. Os discos foliares foram colocados em frascos de vidro envoltos em papel alumínio, contendo uma mistura constituída de: tampão fosfato 0,1M pH 7,5; KNO_3 0,02 M; n-propanol a 5%, duas gotas de cloranfenicol a 500 mg/l e duas gotas de triton X-100 a 10% (LAWRENCE e HERRICK, 1982). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho maria, com agitação, à temperatura de 30°C, por uma hora. Aliquotas de 2ml foram coletadas do meio de incubação e adicionadas a 2 ml de sulfanilamida 1% e n-naftiletilenodiamino 0,02% em HCl 3N (STREETER e BOSLER, 1972). O nitrito liberado na reação foi determinado colorimetricamente a 540 nm em espectrofotômetro (JAWORSKI, 1971) e os resultados foram expressos em μmoles de nitrito produzido por grama de matéria fresca por hora.

Segmentos de 1 a 2 cm de comprimento foram cortados da parte basal, média e superior do sistema radicular, lavados com água de torneira e, após, com água destilada. As amostras foram conservadas em uma mistura de formaldeído 40%, etanol 50% e ácido acético glacial, (F.A.A) nas proporções de 2,5v: 40v: 1v, respectivamente. A determinação da percentagem de colonização ectomicorrízica nas amostras armazenadas em F.A.A foi efetuada pelo método das intersecções em placa de Petri reticulada GIOVANNETTI e MOSSE (1980).

O restante do sistema radicular e da parte aérea das plantas foi acondicionado em sacos de papel e postos a secar em estufa de ventilação forçada a 70° - 75° , por 72 horas. Após, efetuou-se a pesagem e a moagem da parte aérea em moinho com peneira de malhas de $\emptyset,38$ mm de abertura.

O teor de N-total foi determinado após digestão sulfosalicilica, conforme CATALDO et alii (1974); o teor de $N-NO_3^-$ foi obtido pela nitração do ácido salicílico, segundo CATALDO et alii (1975). O teor de P foi determinado após digestão nitricoperclórica, pelo método do ácido ascórbico, modificado por BRAGA e DEFELIPO (1974).

A eficiência de utilização (EU) desses nutrientes foi calculado segundo SIDDIQI e GLASS (1981), onde $EU = g^2$ de matéria Seca/conteúdo do nutriente na matéria Seca.

Análise de variância e posterior comparação de médias feitas pelo teste Student Newman Keuls foram efetuadas para os dados de atividade da redutase do nitrato, matéria seca da raiz e da parte aérea, teores de N-Total, $N-NO_3^-$ e P na parte aérea seca, eficiência de utilização de N e P e porcentagem de colonização micorrízica.

Equações de regressão foram utilizadas para relacionar os valores dessas características com as doses de nitrogênio adicionado ao solo. Os modelos de regressão foram escolhidos com base na significância dos coeficientes, maior R^2 ajustado e coerência sob o ponto de vista biológico com o fenômeno em estudo.

ANDERSON, 1983). Essas ações demonstram que as espécies de fungos ectomicorrízicos isoladas comportam-se de maneira similar a outros organismos e espécies fúngicas, uma vez que na presença de nitrito verificou-se diminuição na atividade da enzima, voltando esta a ser maior na ausência deste nitro no meio de cultivo. Em meio contendo apenas nitrato, a atividade da RN nos micélios dos isolados de *P. tinctorius* foi aproximadamente 8,5 a 8 vezes maior do que a encontrada no micélio de *E. involutus* e *Scleroderma*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade da Redutase do Nitrato no Micélio de Fungos Ectomicorrízicos

QUADRO 2 - Atividade da Redutase do Nitrato no Micélio de Fungos Ectomicorrízicos. Crescimento em meio

A capacidade de reduzir o $N-NO_3^-$ diferiu significativamente entre as espécies de fungos ectomicorrízicos estudados (Quadro 2). As menores atividades da redutase do nitrato (RN) foram obtidas no micélio dos fungos após o crescimento em meio contendo apenas $N-NH_4^+$, não tendo sido verificadas diferenças significativas entre as espécies para este meio de cultivo. Os isolados de *Pisolithus tinctorius* apresentaram atividade da RN aproximadamente seis vezes maior do que os de *Paxillus involutus* e *Scleroderma* sp., após o crescimento no meio contendo as duas formas $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$. Em muitos microrganismos, inclusive fungos, a RN geralmente é induzida pelo substrato e quando a fonte de N na forma de NO_3^- é substituída por NH_4^+ normalmente diminui a atividade desta enzima nesses organismos (BEEVERS e

HAGEMAN, 1983). Esses dados demonstram que as espécies de fungos ectomicorrízicos testados comportaram-se de maneira similar a outros organismos e espécies fúngicas, uma vez que na presença de amônio verificou-se diminuição na atividade da enzima, voltando esta a ser maior na ausência deste cátion no meio de cultivo. Em meio contendo apenas nitrato, a atividade da RN nos micélios dos isolados de P. tinctorius foi aproximadamente 2,5 e 8 vezes maior do que a encontrada no micélio de P. involutus e Scleroderma sp., respectivamente.

QUADRO 2 - Atividade da Redutase do Nitrato no Micélio de Fungos Ectomicorrízicos Crescidos em Meios Contendo Diferentes Formas de N

FONTE DE N	ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO			
	Pt-IS83	Pt-RS27	Pi	Scl ^{1/}
$\mu\text{moles NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$				
NH ₄ ⁺	0,35 Ab	0,10 Ac	0,02 Aa	0,07 Aa
NH ₄ ⁺ +NO ₃ ⁻ (1:1)	0,64 Ab	0,58 Ab	0,09 Ba	0,10 Ba
NO ₃ ⁻	1,15 Aa	1,03 Aa	0,42 Ba	0,12 Ba

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas linhas, e minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Student Newman-Keuls (P > 0,05).

1/ Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisotithus tinctorius, Pi = Paxillus involutus, Scl = Scleroderma

Os valores da atividade da RN obtidos para P. tinctorius em meio com N-NH₄⁺ estão próximos aos relatados por HD (1986) para outros cinco isolados dessa mesma

espécie e inferiores aos obtidos para outras espécies de fungos ectomicorrízicos (HO e TRAPPE, 1987; HO, 1988).

Os isolados de P. tinctorius, por apresentarem maior capacidade de reduzir o $N-NO_3^-$, são potencialmente úteis para serem utilizados como inóculos de mudas de espécies florestais, melhorando assim a performance das plantas ao aumentar a absorção e assimilação de N adicionado aos substratos de produção de mudas, principalmente na forma de NO_3^- . Deve-se salientar que em condições naturais, essa espécie de fungo ectomicorrízico encontra-se comumente formando associação com espécies de Eucalyptus spp. (BARROS et alii, 1978; YOKOMIZO, 1981; SCHWAN, 1984), sendo interessante o levantamento e a caracterização de novos isolados com maior capacidade para redução de $N-NO_3^-$. Os isolados potencialmente mais promissores poderiam ser, posteriormente, utilizados em programas de inoculação controlada de mudas em viveiros.

Os isolados de P. tinctorius apresentaram diferenças na atividade da enzima quando crescidos nos diferentes meios de cultivo, sendo esta atividade maior no micélio dos fungos crescidos em meio contendo apenas $N-NO_3^-$ (Quadro 2). Para as demais espécies não se verificou efeito dos meios de crescimento sobre a atividade da RN. Aparentemente, o amônio no meio de cultivo atuou reduzindo a síntese da RN nos isolados de P. tinctorius, o mesmo não ocorrendo nas demais espécies. Corroborando com esta observação existe o trabalho de SARJALA (1990) que, também, não encontrou efeito do amônio sobre a atividade da

RN. Contrariamente, PLASSARD et alii (1986) demonstraram que a atividade da RN no micélio de Hebeloma cylindrosporum aumentou na presença de amônio, sugerindo que, nessa espécie fúngica, a síntese ou atividade desta enzima poderia não ser influenciada pela presença deste íon, como verificado para outras espécies.

Paxillus involutus e P. tinctorius isolado IS83 apresentaram a maior e a menor produção de matéria seca micelial, respectivamente, quando crescidos em meio contendo diferentes formas de N (Quadro 3). Dentre os fungos testados, apenas esse último, isolado IS83, não teve sua produção de matéria seca significativamente modificada com a forma do N. P. tinctorius isolado RS27 e Paxillus involutus apresentaram maior produção de matéria seca em meio contendo exclusivamente amônio, que diminuiu à medida que o NO_3^- foi adicionado ao meio de cultivo. A maior produção de matéria seca para Scleroderma sp foi verificada no meio contendo apenas nitrato, apesar da baixa atividade da RN no micélio desse fungo. As diferenças de crescimento dos fungos, observadas nos diferentes meios, demonstram a diversidade fisiológica existente entre as espécies utilizadas.

De modo geral, a atividade da RN e a produção de massa micelial mostraram comportamento opostos (Quadros 2 e 3), sugerindo que nas espécies que apresentaram maior crescimento, o substrato para a enzima possa ter sido limitante.

QUADRO 3 - Peso de Micélio Seco de Fungos Ectomicorrízicos Crescidos em Meios Contendo Diferentes Formas de N

FONTE DE N	PESO DE MICÉLIO SECO			
	Pt-IS83	Pt-RS27	Pi	Sc1 1/
	mg			
NH ₄ ⁺	12,61 Ca	50,63 Ba	86,54 Aa	47,76 Bb
NH ₄ ⁺ +NO ₃ ⁻ (1:1)	11,31 Da	34,67 Cb	70,16 Ab	50,42 Bab
NO ₃ ⁻	4,67 Ca	22,43 Bc	63,86 Ab	62,08 Aa

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas linhas, e minúscula, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Student Newmann-Keuls (P > 0,05).

1/ Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisotithus tinctorius;

Pi = Paxillus involutus; Sc1 = Scleroderma.

Por outro lado, em condições naturais e quando associados às plantas, os isolados de P. tinctorius, que apresentaram maior atividade da RN poderiam contribuir para maior eficiência do sistema, aumentando a capacidade de redução do nitrato pelas raízes. As outras espécies, que apresentaram menor atividade da RN mas que produziram maior massa micelial, provavelmente podem compensar essa menor capacidade de redução de N pelo aumento do volume de solo explorado, em razão da maior quantidade de micélio extramatricial produzido no solo ou substrato de crescimento do hospedeiro.

O fornecimento de N-NO₃⁻ como fonte única de N ao meio de cultivo aumentou a produção de massa micelial de Scleroderma sp. (Quadro 3), indicando que para esta

espécie fúngica o nitrato é capaz de suprir as necessidades de N. Isto parece contrariar a expectativa de crescimento da maioria das espécies de fungos ectomicorrízicos que apresentam maior crescimento em meio MNM, contendo N apenas na forma de amônio. Resultados semelhantes, mostrando maiores taxas de crescimento em meio contendo nitrato, foram também relatados por PEELERS e MULLINS (1982) para Pisolithus tinctorius e por SCHEROMM et alii (1990) para Hebeloma cylindrosporum.

A massa micelial produzida por Scleroderma sp. apresentou uma tendência a ser maior quando este se desenvolveu em meio contendo as duas formas de N do que quando na presença de exclusivamente amônio. Este estímulo foi também observado para P. tinctorius crescido em meio com ambas as formas de N (PEELERS e MULLINS, 1982). O aumento no crescimento micelial tem sido atribuído à maior absorção de amônio, em razão do nitrato auxiliar na manutenção do pH do meio (PEELERS e MULLINS, 1982).

Após o período de crescimento, os menores valores de pH final no meio foram observados para Pisolithus tinctorius isolado RS27 e Paxillus involutus, quando crescidos em $N-NH_4^+$ (Quadro 4). Para Scleroderma sp a redução do pH final no meio de cultivo contendo apenas $N-NH_4^+$ pode ter causado efeito adverso sobre o desenvolvimento do fungo, como sugerido por LITKE et alii (1984) para Hebeloma crustuliniforme. Estes autores não observaram diferenças na produção de massa micelial do fungo entre a forma de $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$ em meio não

fungo entre a forma de $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$ em meio não tamponado, enquanto que em meio tamponado, os melhores resultados foram obtidos com a forma de $N-NH_4^+$. Para o isolado de *P. tinctorius* IS83, embora tenham ocorrido diferenças significativas entre os meios em relação aos valores de pH final, não se verificou influência destes sobre a produção de massa micelial (Quadros 3 e 4).

QUADRO 4 - Redução do pH Inicial dos Meios Contendo Diferentes Formas de N, Após o Crescimento dos Fungos

Fontes de N	REDUÇÃO DE pH			
	Pt-IS83	Pt-RS27	PI	Scl 1/
	----- Unidades de pH -----			
NH_4^+	2,0 Ca	2,8 Aa	2,9 Aa	2,5 Ba
$NH_4^+ + NO_3^-$ (1:1)	1,7 Cb	2,3 Bb	2,5 Ab	1,8 Cb
NO_3^-	0,6 Cc	0,4 Cc	2,0 Ac	0,9 Bc

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, nas linhas, e minúscula, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Student Newman-Keuls (P) 0,05).

1/Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de *Pisolithus tinctorius*,
Pi = *Paxillus involutus*, Scl = *Scleroderma* sp.
pH inicial sempre igual a $5,6 \pm 0,2$.

O peso de micélio dos fungos parece ter uma relação inversa com o pH final dos meios de cultivo, sugerindo que a maior produção de massa micelial, decorrente de uma maior absorção de nutrientes do meio, possa ter ocasionado esse efeito.

De modo geral, as maiores reduções no pH foram obtidas nos meios contendo $N-NH_4^+$, seguidos pelos meios contendo $N-NH_4^+/NO_3^-$ e por último para os meios contendo apenas $N-NO_3^-$. Isto já era esperado uma vez que a absorção de $N-NH_4^+$ pelo fungo é acompanhada pela liberação de H^+ para a solução, enquanto a absorção de $N-NO_3^-$ acarreta uma liberação de OH^- . Em meios contendo duas formas de N provavelmente ocorre certo tamponamento da acidez, principalmente se a absorção destes íons ocorreu mais ou menos na mesma proporção.

4.2. Colonização Ectomicorrízica

Apenas nas doses de 75 e 200 mg de $N-NO_3^-/kg$ de solo, as plantas inoculadas com Pisolithus tinctorius (Pt) e isolado IS83 apresentaram maiores valores de colonização micorrízica do que as plantas inoculadas com o isolado RS27 da mesma espécie (Quadro 5). Esse comportamento diferencial entre isolados de Pt já havia sido relatado por outros autores para outras espécies vegetais (MOLINA, 1979; MARX, 1981; MITCHELL et alii, 1984; MENDONÇA, 1991) e também para Eucalyptus spp. (AMORIM, 1988; COMERLATO, 1992). As raízes das plantas não inoculadas (controles) não apresentaram colonização pelo fungo, demonstrando que a fumigação efetuada no substrato eliminou os possíveis fungos ectomicorrízicos presentes neste substrato.

O P. tinctorius é um fungo muito comum em plantações de Eucalyptus spp. no Brasil, como constatado por (BARROS et alii, 1978; YOKOMIZO, 1981; ZAMBOLIM e BARROS, 1982); SCHWAN, 1984).

Apesar da maior afinidade dessa espécie fúngica para com o hospedeiro em condições de casa-de-vegetação e em condições naturais, constatou-se neste trabalho nítida influência das doses de N aplicadas ao solo na forma nítrica para a formação de ectomicorrizas (Figura 1). BOWEN (1973); HARLEY e SMITH (1983); MARX et alii (1977b)

aditem que condições nutricionais do solo e/ou substrato de produção de mudas, principalmente elevados teores de N e P, diminuem a colonização micorrízica.

QUADRO 5 - Colonização Ectomicorrízica de Raízes de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius, em Função de Doses de Nitrato

Doses de Nitrato ppm	COLONIZAÇÃO ECTOMICORRÍZICA 1/		
	Pt-IS83	Pt-RS27	Controle
0	14,0 A	17,8 A	0
50	31,3 A	14,0 A	0
75	41,3 A	30,0 B	0
100	30,9 A	35,0 A	0
200	21,1 A	5,8 B	0

Médias seguidas de uma mesma letra, em cada linha, não diferem, pelo teste F (P)0,05).

1/Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisolithus tinctorius

O aumento desses nutrientes no solo pode estar relacionado à diminuição de carboidratos na raiz das plantas e a aumentos no pH da rizosfera, que segundo esses autores influenciam negativamente na colonização micorrízica. A redução na porcentagem de colonização micorrízica constatada neste experimento, nas maiores doses de N aplicadas ao solo, pode estar refletindo essa condição.

O maior grau de colonização para os dois isolados foi obtido com a aplicação de doses intermediárias de N, indicando que o equilíbrio N/P no solo possa propiciar à

planta melhor utilização desses nutrientes, aumentando a formação de carboidratos, que seriam utilizados pelo fungo na raiz, como sugerido por MARX et alii (1977b). Esta situação pode ser encontrada em condições de campo, onde o fungo é capaz de produzir proteases que transformam o N-orgânico em formas mais prontamente assimiláveis e/ou facilita sua translocação via hifa fúngica para as plantas (MARTIM et alii, 1987; READ et alii, 1989). Isto, associado aos baixos níveis de P disponível observados na maioria dos solos, resultaria numa relação N/P favorável ao desenvolvimento da associação.

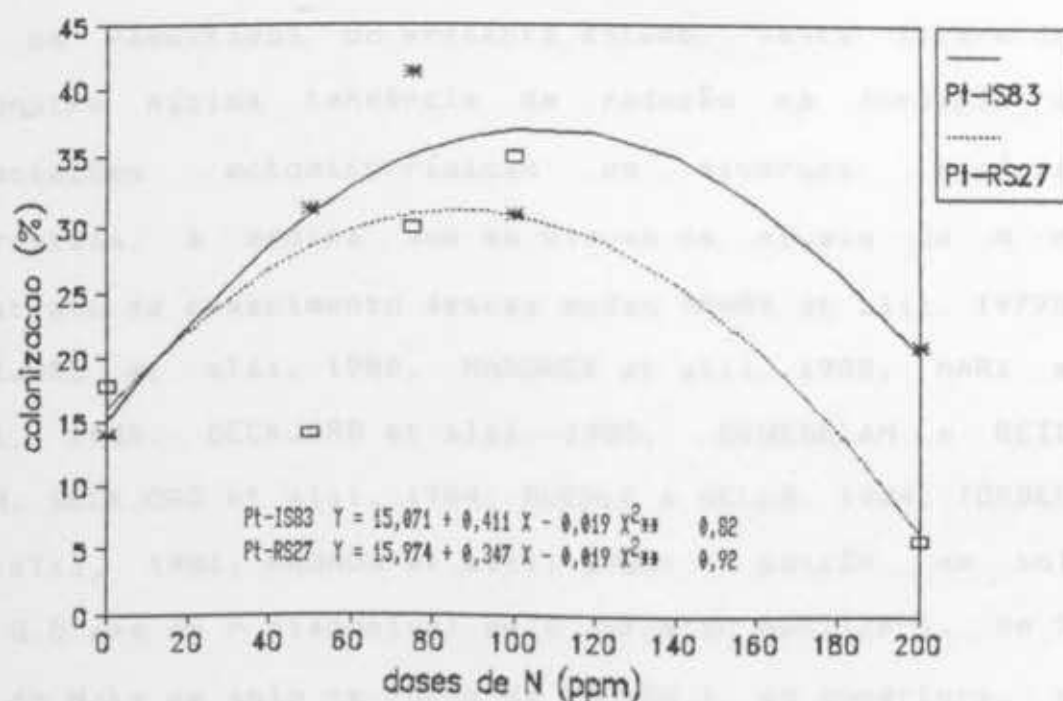


FIGURA 1. Colonização Ectomicorrízica de Raízes de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo.

A menor porcentagem de colonização nas menores doses de N, por outro lado, sugere que a redução na relação N/P influencia negativamente o estabelecimento da simbiose, provavelmente pela diminuição do conteúdo de carboidratos nas raízes.

A porcentagem de colonização micorrízica aumentou quadraticamente com as doses de N, passando por um máximo em 91 e 108 mg de $N-NO_3^-$ para os isolados Pt-RS27 e Pt-IS83, respectivamente (Figura 1). A diminuição na colonização nas doses mais elevadas de N aplicado está de acordo com as generalizações feitas quanto aos elevados teores de N e P no solo serem capazes de suprimir a micorrização (DANIELSON et alii, 1984). Corroborando com os resultados do presente estudo, vasta literatura demonstra nítida tendência de redução na formação de associações ectomicorrízicas em diversas espécies florestais, à medida que se elevam os níveis de N no substrato de crescimento dessas mudas (MARX et alii, 1977b; BECKJORD et alii, 1980; MARONEK et alii, 1982; MARX et alii, 1982; BECKJORD et alii, 1983; EKWEBELAM e REID, 1983; BECKJORD et alii, 1984; RUEHLE e WELLS, 1984; TORBERT et alii, 1986; GAGNON et alii, 1988). A adição, em solo com 8,5 ppm de P disponível pelo extrator Mehlich-1, de 70 mg de N/kg de solo na forma de $NH_2(SO_4)$, em cobertura, em três parcelas, resultou em 39,2% de raízes de E. grandis micorrizadas por P. tinctorius isolado IS83 (SOARES, 1990), valor este próximo ao obtido no presente experimento.

Entretanto, porcentagens de colonização mais elevadas têm sido obtidas para condições semelhantes às descritas no presente estudo (VIEIRA e PEREZ, 1988).

A formação de ectomicorrizas em mudas de E. grandis depende, portanto, dentre outros fatores, do nível e da forma dos nutrientes utilizados na produção dessas mudas, principalmente P e N, bem como da maior afinidade das espécies e/ou isolados fúngicos para com a espécie hospedeira.

4.3. Produção de Matéria Seca da Parte Aérea e Raiz

A matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas inoculadas com os isolados de P. tinctorius (Pt) não diferiu significativamente daquela apresentada pelas plantas do tratamento controle (Quadro 6). Isto sugere não ter havido limitação na absorção de N em razão, provavelmente, da alta mobilidade da forma de N utilizada aliada ao tamanho reduzido dos vasos de cultivo e à alta densidade das raízes produzidas por essa espécie. Nesta situação, o movimento de nutrientes para as raízes pode não ter sido limitante e assim foi pouco expressiva a contribuição do micélio fúngico colonizando as raízes. Por outro lado, os isolados de P. tinctorius utilizados parecem não ter atuado como dreno de nutrientes, reduzindo o crescimento das plantas, como relatado por MOLINA (1982) e SHAW et alii (1982), uma vez que as plantas controle, de

modo geral, produziram os menores valores de MSPA. Resultados semelhantes foram também obtidos para outras espécies florestais associadas a fungos ectomicorrízicos (MARX et alii, 1982; DANIELSON et alii, 1984; ; BECKJORD et alii, 1984), embora, neste caso, as plantas tenham sido desenvolvidas em turfa e vermiculita. A MSPA aumentou com as doses de N aplicadas ao solo (Figura 2), sugerindo não ter ocorrido ainda saturação do sistema de absorção/assimilação desse nutriente pelas plantas.

QUADRO 6 - Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e das Raízes (MSRA) de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius, em Função de Doses de Nitrato

Doses de N	MSPA			MSRA		
	Pt-IS83	Pt-RS27	Contr.	Pt-IS83	Pt-RS27	Contr. ^{1/}
ppm	g/ Planta					
0	5,58	5,89	5,81	2,34	2,13	2,24
50	11,21	10,09	9,65	3,25	3,04	2,57
75	12,08	11,23	11,87	3,21	3,23	3,16
100	12,26	13,67	10,68	3,87	3,01	2,53
200	17,09	17,83	16,47	4,42	4,09	2,77
Médias	11,64	11,74	10,90	3,42A	3,10AB	2,65B

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, em cada linha, não diferem, pelo Teste de Student Newman-Keuls (P)0,05).

PT-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisolithus tinctorius.

Contr. = controle

Na maior dose de N aplicado ao solo, verificou-se um acúmulo de MSPA de 16,7, 18,5 e 16,6 g para as plantas inoculadas com Pt-IS83, com Pt-RS27 e o controle não inoculado, respectivamente (Figura 2).

Em plantas de Pinus taeda inoculadas com P. tinctorius, TORBERT et alii (1986) constataram, também, aumentos lineares para produção de MSPA em função do aumento dos níveis de N aplicados ao substrato de produção dessas mudas.

Trabalhos realizados por VIEIRA e PEREZ (1988), em solo e em condições de casa-de-vegetação, por outro lado, mostraram que a inoculação de P. tinctorius em mudas de E. grandis resultou em menor produção de MSPA, sobretudo nas doses de P e N semelhantes às aplicadas no presente experimento.

As plantas inoculadas com Pt-IS83 produziram maior massa radicular MSRA do que as plantas não inoculadas, embora não estatisticamente superior à das plantas inoculadas com Pt-RS27 (Quadro 6). O Pt-IS83 foi utilizado também por AMORIM (1988) como inóculo para mudas de E. grandis, em condições semelhantes às deste experimento, proporcionando as maiores massas radiculares quando comparado às outras espécies fúngicas testadas. COMERLATO (1992), entretanto, não verificou diferença significativa para produção de MSRA de E. grandis entre os isolados de P. tinctorius testados e outras espécies fúngicas inoculadas quando comparados às plantas não inoculadas.

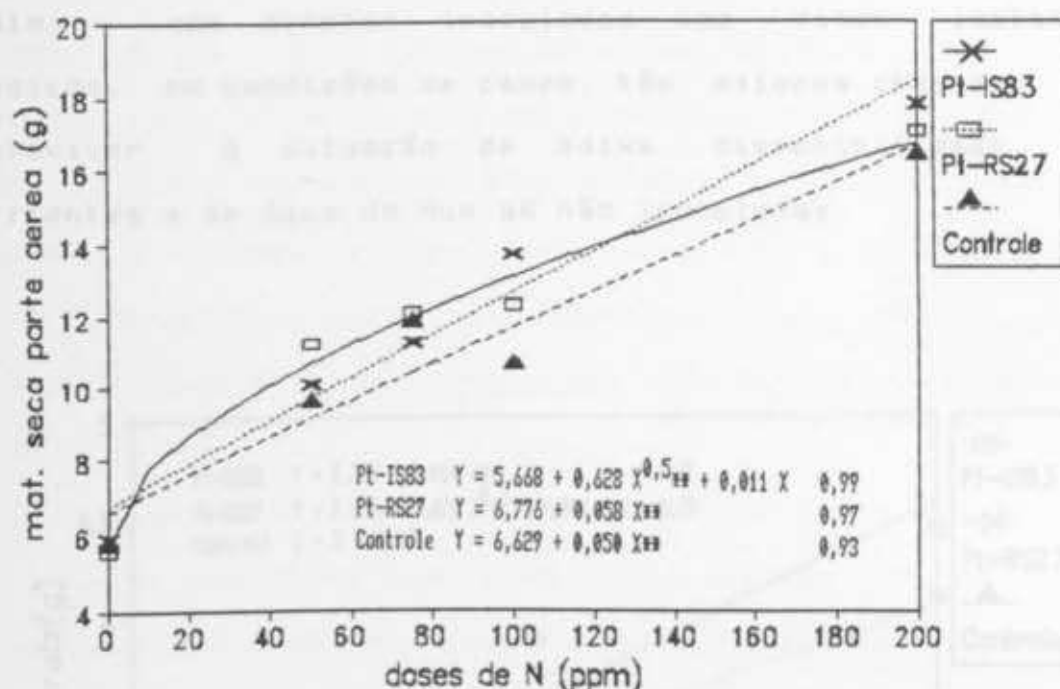


FIGURA 2. Matéria Seca da Parte Aérea de Mudas de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo.

A MSRA aumentou com as doses de N aplicadas ao solo somente nas plantas inoculadas com os isolados de Pt (Figura 3). Os maiores valores de MSRA das plantas inoculadas foram, também, alcançadas na maior dose de N aplicado ao solo. Este efeito negativo também verificado para esta mesma espécie, porém não inoculadas com fungos micorrízicos (LOCATELLI, 1984; FERREIRA, 1986), é resultante, provavelmente, de uma condição mais equilibrada na absorção de nutrientes, e por consequência

maior crescimento e desenvolvimento desta, proporcionados pela participação do fungo ectomicorrízico. Sugere-se, assim, que plantas inoculadas com esses isolados fúngicos, em condições de campo, têm maiores chances de sobreviver à situação da baixa disponibilidade de nutrientes e de água do que as não inoculadas.

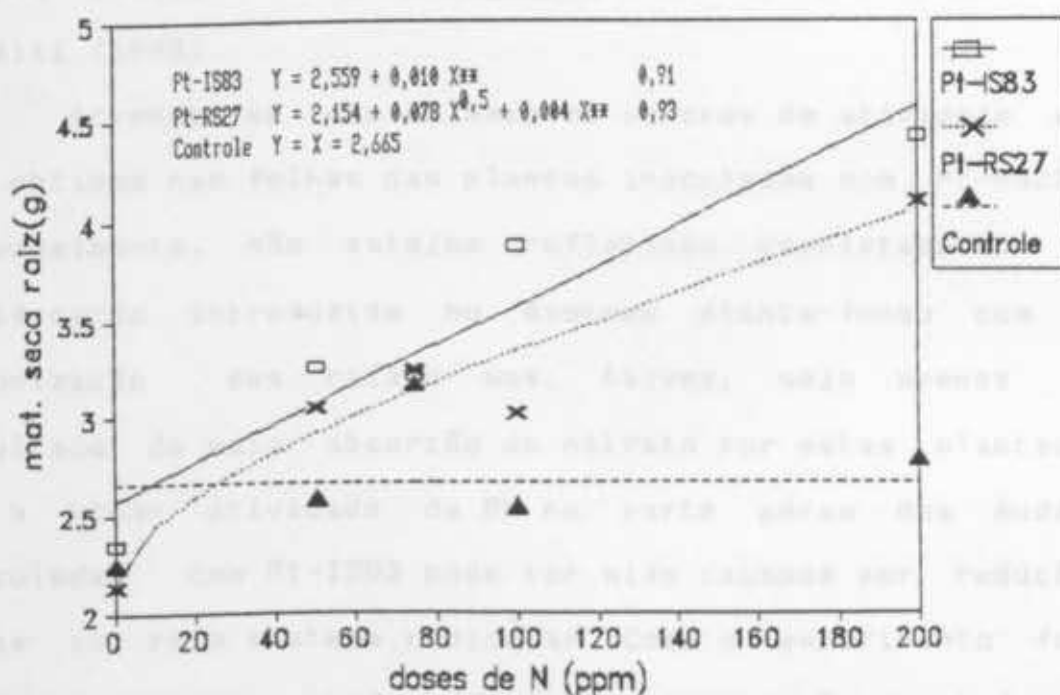


FIGURA 3. Matéria Seca de Raízes de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo.

4.4 Atividade da Redutase do Nitrato

A atividade da redutase do nitrato (RN), na parte

aérea de mudas de Eucalyptus grandis inoculadas com Pt-RS27, foi superior àquela inoculada com Pt-IS83 e plantas controle não inoculadas (Quadro 7). No micélio de Pt-RS27 e Pt-IS83, em condições de cultura pura, com nitrato como fonte de N, a atividade desta enzima foi de 1,03 e 1,15 $\mu\text{moles de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MS} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente (QUADRO 2). Estes valores, superiores aos encontrados na parte aérea das plantas, são semelhantes aos obtidos para outros isolados de P. tinctorius relatados por HENRIQUES et alii (1992).

Acredita-se que os maiores valores de atividade da RN obtidos nas folhas das plantas inoculadas com Pt-RS27, provavelmente, não estejam refletindo completamente a modificação introduzida no sistema planta-fungo com a colonização das raízes mas, talvez, seja apenas o resultado da maior absorção do nitrato por estas plantas. Já a menor atividade da RN na parte aérea das mudas inoculadas com Pt-IS83 pode ter sido causada por redução desse íon pelo sistema radicular. Como o experimento foi conduzido em solo, em face da forte pigmentação das raízes, principalmente nas micorrizadas, não se determinou a atividade da RN no sistema radicular. Em futuros trabalhos a determinação da eficiência de redução do nitrato, no sistema radicular colonizado pelo fungo, permitirá esclarecer, entre outros aspectos, se o aumento na atividade da RN da parte aérea ocorre porque a redução do nitrato se faz preferencialmente nessa parte ou se houve saturação da capacidade de redução do nitrato no sistema radicular.

QUADRO 7 - Atividade da Redutase do Nitrato na Parte Aérea de Mudas de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius, em Função de Doses de Nitrato

Doses de N	REDUTASE DO NITRATO		
	Pt-IS83	Pt-RS27	Controle 1/
ppm	----- umoles de NO ₂ /g MS.h -----		
0	0,20	0,22	0,19
50	0,06	0,21	0,19
75	0,21	0,26	0,21
100	0,21	0,25	0,16
200	0,14	0,21	0,14
Médias	0,16 B	0,23 A	0,18 B

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, em cada linha, não diferem, pelo teste de Student Newman-Keuls (P) 0,05)

1/ Pt-IS83 e Pt-RS27 = Isolados de Pisolithus tinctorius.

Em Pinus caribaea colonizado por P. tinctorius isolado 303, a atividade da RN no sistema radicular além de ter sido três vezes maior do que no micélio do fungo em cultura pura foi maior do que nas raízes de plantas não colonizadas. Na parte aérea, além da atividade da RN ter sido bem menor que no sistema radicular, não foi influenciada pela micorrização (HENRIQUES, 1991). Assim, o aumento na eficiência de aquisição de N-NO₃⁻ pelo sistema simbiótico não é apenas causado pelo aumento das raízes, mas também pela maior capacidade das raízes micorrizadas

de reduzir o nitrato (France, 1982, citado por FRANCE e REID, 1983); VEZINA et alii, 1989; SARJALA, 1991). A identificação de isolados fúngicos com maior capacidade de redução do nitrato é, certamente, interessante para a obtenção de sistemas simbióticos que apresentem maior eficiência na utilização do nitrogênio na forma de nitrato

As doses de N aplicadas somente afetaram a atividade da RN na parte aérea das plantas inoculadas com o isolado Pt-1S83 (Quadros 7 e 8). Essas plantas apresentaram redução na atividade da RN, na dose de 50 mg de N/kg de solo, aumento nas doses de 75 e 100 mg de N/kg de solo e, novamente decréscimo na dose de 200 mg de N aplicado ao solo, fato evidenciado pelas equações de regressão cúbica raiz ajustada (Quadro 8). Esperava-se que a atividade da RN aumentasse continuamente com as doses de N aplicadas ao solo, uma vez que essa enzima é induzida por nitrato (BEEVERS e HAGEMAN, 1983). Contudo, sabe-se que o nitrato disponível para a redução na parte aérea é oriundo do sistema radicular, sendo translocado via xilema (SMIRNOFF e STEWART, 1985), e que sua localização na célula é, também, de grande importância para a síntese da RN FERRARI et alii (1973). No presente estudo, o período de iluminação, bem como a concentração do nitrato utilizada para induzir o sistema enzimático, podem não ter sido suficientes para saturar a nível de raiz, o que pode ter ocasionado uma baixa translocação do nitrato para a parte aérea, culminando com uma baixa atividade da RN nesta parte

da planta (ANDREWS, 1986; OAKS, 1986).

Aumentos na atividade da RN na parte aérea, em função de maior concentração de nitrato na solução, foram observados em Pinus sylvestris inoculadas com fungos ectomicorrízicos (SARJALA, 1991), em Brachiaria spp. não inoculadas com fungos micorrízicos em condições de solo (FERNANDES e FREIRE, 1976) e em E. grandis não inoculadas em solução nutritiva (COSTA, 1986). A redução do nitrato em plantas de E. grandis pode ocorrer tanto na raiz quanto na parte aérea, contudo numa proporção ainda não bem definida. COSTA (1986) encontrou maior atividade desta enzima na parte aérea das plantas, enquanto que FERREIRA (1986) não detectou a presença de $N-NO_3^-$ no exsudato do xilema, quando esta forma de N foi fornecida exclusivamente na solução de cultivo das plantas.

QUADRO B - Equações de Regressão Ajustadas, para Atividade da Redutase do Nitrato (Y), em Função de Doses de N (X), para Dois Isolados de P. tinctorius

Característica	Fungos 1/	Equações	R ²
Atividade da Redutase do Nitrato	Pt-IS83	$Y = 0,198 - 0,158 X^{0,5} + 0,028 X - 0,0013 X^{1,5} **$	0,87
	Pt-RS27	$Y = X = 0,229$	
	Controle	$Y = X = 0,181$	

** Significativo, pelo teste F (P)0,05

1/ Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisolithus tinctorius

A atividade da RN para E. grandis encontrada neste trabalho é bem menor do que aquela relatada por COSTA

(1986) para plantas dessa mesma espécie, porém desenvolvida em solução nutritiva. Plantas de Eucalyptus spp. obtidas em condições de campo (ADAMS e ATTIWIL, 1982a; POKRHIAL e RATURI, 1984), por outro lado, apresentaram atividade semelhante à obtida no presente trabalho.

4.5 Conteúdo de $N-NO_3^-$, N-Total e P da Parte Aérea das Plantas

As plantas inoculadas com o isolado IS83 de P. tinctorius acumularam maior quantidade de $N-NO_3^-$ na parte aérea do que as plantas não inoculadas, mas não diferiram das inoculadas com Pt-RS27 (Quadro 9). As maiores diferenças no acúmulo de $N-NO_3^-$ entre os tratamentos inoculados e não inoculados foram verificadas nas maiores doses de N aplicadas ao solo. O conteúdo dessa forma de N aumentou com as doses de N tanto nas plantas inoculadas quanto naquelas não inoculadas (Figura 4). Para estas últimas, o acúmulo máximo de $N-NO_3^-$ ocorreu com a aplicação de 63 mg de N/kg de solo. As plantas inoculadas com Pt-IS83 apresentaram aumento mais acentuado no conteúdo de $N-NO_3^-$ nas menores doses de N aplicadas, passando por um máximo em 189 mg de N/kg de solo, ocorrendo estabilização até a maior dose. Já as plantas inoculadas com Pt-RS27 tiveram aumentos crescentes no conteúdo de $N-NO_3^-$ até 167 mg de N aplicado/kg de solo e, então, decresceram ligeiramente. O maior acúmulo de $N-NO_3^-$ pelas plantas inoculadas pode ter ocorrido em razão do melhor desenvolvimento das plantas inoculadas com o isolado IS83, para o qual foram também verificadas as maiores valores de atividade da N_2 fixadora (Quadro 4).

tamponamento do pH rizosférico, pela presença fúngica, favorecendo a absorção desse elemento pela planta, como sugerido por RYGIEWICZ et alii (1984b). Além disso, o $N-NO_3^-$ acumulado na parte aérea das plantas micorrizadas

QUADRO 9 - Conteúdo de $N-NO_3^-$ na Parte Aérea de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius, em Função de Doses de Nitrato

Doses de N	CONTEÚDO E TEOR DE $N-NO_3^-$					
	Pt-IS83	PT-RS27	Contr.	Pt-IS83	Pt-RS27	Contr. 1/
ppm	mg/pl			%		
0	1,33	1,21	1,30	0,024	0,021	0,023
50	2,31	1,93	2,03	0,021	0,019	0,021
75	2,64	2,16	2,26	0,022	0,019	0,018
100	2,24	2,34	1,73	0,018	0,017	0,016
200	2,64	2,52	1,72	0,015	0,014	0,010
Médias	2,23A	2,03AB	1,81B	0,020A	0,018B	0,016B

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, em cada linha, não diferem, pelo teste de Student Newman Keuls ($P > 0,05$)

1/Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisolithus tinctorius

1/ Contr. = controle não inoculado

pode significar uma forma de reserva de N passível de ser utilizada em condições de baixa disponibilidade deste nutriente no meio.

A forma nítrica correspondeu a aproximadamente 1% do N-total, participação essa que foi menor nas plantas inoculadas com o isolado RS27, para o qual foram também verificados os maiores valores de atividade da RN (Quadro 6).

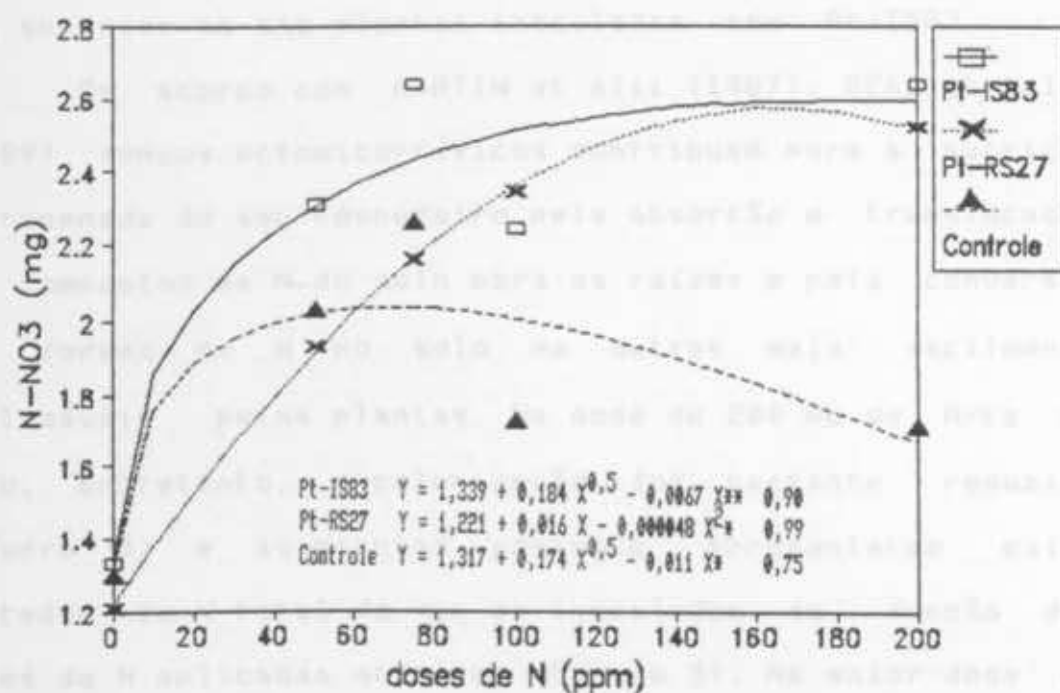


FIGURA 4. Conteúdo de $N-NO_3^-$ de Partes Aéreas de Mudas de *Eucalyptus grandis* Inoculadas ou Não com *Pisolithus tinctorius* Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo.

O maior acúmulo de $N-NO_3^-$ constatado na parte aérea das plantas inoculadas com Pt-IS83 pode ter ocorrido devido a uma maior translocação deste para a parte aérea, provavelmente em razão de maior saturação da RN no sistema radicular dessas plantas, como sugerido por (BEEVERS e HAGEMAN, 1983; ANDREWS, 1986).

O conteúdo de N-total das plantas inoculadas não foi diferente daquelas que não foram inoculadas, para as doses de 0 a 75 mg de N/kg de solo (Quadro 10). Na dose de 100 mg de N, o conteúdo de N-total das plantas inoculadas com

QUADRO 10 - Conteúdos de N-total na Parte Aérea de Plantas de Pt-RS27 foi superior ao das plantas controles, mas não foi superior ao das plantas inoculadas com Pt-IS83.

De acordo com MARTIN et alii (1987); READ et alii (1989) fungos ectomicorrízicos contribuem para a nutrição nitrogenada de seu hospedeiro pela absorção e translocação de compostos de N do solo para as raízes e pela conversão de formas de N no solo em outras mais facilmente utilizáveis pelas plantas. Na dose de 200 mg de N/kg de solo, entretanto, a colonização foi bastante reduzida (Quadro 5) e as plantas controle apresentaram maior conteúdo de N-total do que as inoculadas, em função das doses de N aplicadas ao solo, (Figura 5). Na maior dose de N, os conteúdos de N-total foram de 328, 369 e 429 mg, respectivamente, para as plantas inoculadas com Pt-IS83, Pt-RS27 e para as do controle.

Os teores médios de N-total na parte aérea de plantas inoculadas com Pt-IS83 e Pt-RS27 foram de 1,48% e 1,58%, respectivamente, enquanto que o controle apresentou 1,76% (Quadro 10).

Aumentos no conteúdo de N, proporcionados pela colonização micorrízica, têm sido relatados para diferentes espécies de coníferas (BLEDSOE e ZASOSKI, 1983; RYGIEWIEZ et alii, 1984a e b; BOXMAN e ROELOFS, 1988; HENRIQUES, 1991; MENDONCA, 1991) e para Eucalyptus grandis (SOARES, 1986; VIEIRA e PEREZ, 1988).

QUADRO 10 - Conteúdo de N-Total na Parte Aérea de Mudas de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius, em Função de Doses de Nitrato

Doses de N	CONTEÚDO E TEOR DE N-TOTAL					
	Pt-IS83	Pt-RS27	Contr.	Pt-IS83	Pt-RS27	Contr. 1/
ppm	mg/Planta			%		
0	58,76 A	68,60 A	67,47 A	1,05 A	1,18 A	1,15 A
50	136,29 A	133,28 A	151,85 A	1,21 B	1,33 AB	1,57 A
75	187,73 A	179,99 A	197,79 A	1,56 A	1,60 A	1,66 A
100	204,00 AB	233,76 A	180,99 B	1,71 A	1,71 A	1,70 A
200	317,62 C	364,52 B	433,30 A	1,86 B	2,06 B	2,69 A
Médias	180,88	196,03	206,28	1,48	1,58	1,76

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, em cada linha, não diferem, pelo teste de Student Newman-Keul ($P > 0,05$).

1/ Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisolithus tinctorius

1/ Contr. = controle não inoculado

FIGURA 3 - Conteúdo de N-Total na Parte Aérea de Mudas de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (Pt-IS83 e Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas, em Solo.

Contudo, no presente trabalho, em virtude da forma de N utilizada ser o nitrato, este pode ter reduzido, em parte, o benefício da presença fúngica, em razão da sua elevada mobilidade e da grande densidade de raízes produzidas por essa espécie vegetal.

Acredita-se que o rápido crescimento do eucalipto em nossas condições naturais esteja relacionado com a capacidade dessa espécie de absorver e utilizar tanto $N-NH_4^+$, quanto $N-NO_3^+$. LOCATELLI (1984), entretanto, não verificou diferenças significativas entre fertilizantes nítricos e/ou amoniacais aplicados ao solo no crescimento de plantas de E. grandis, sob condições de casa-de-vegetação.

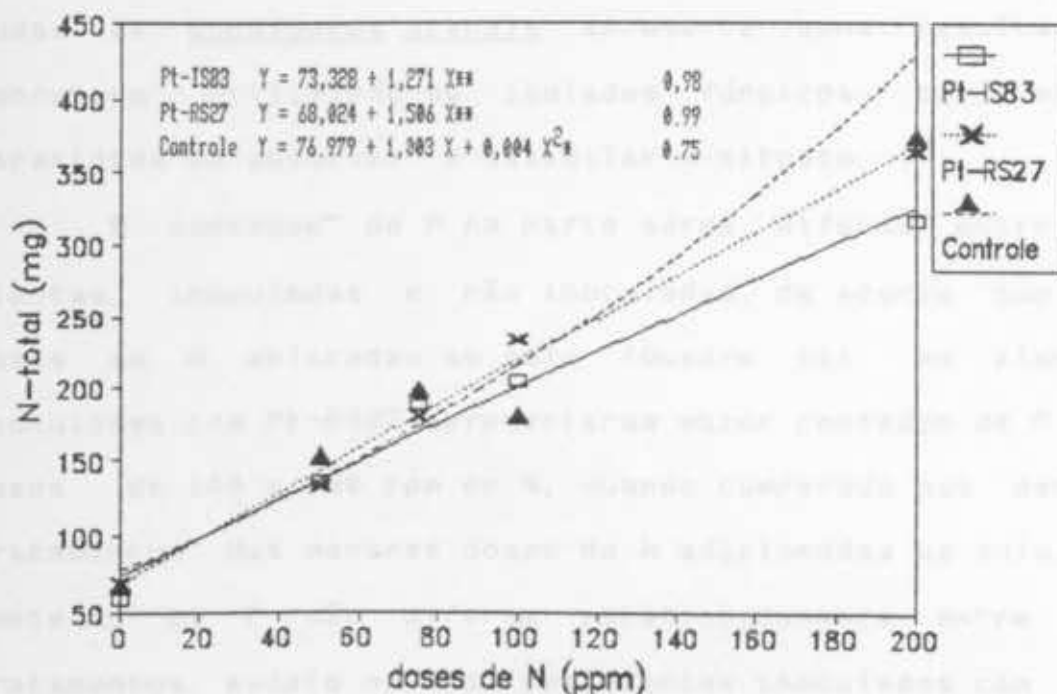


FIGURA 5. Conteúdo de N-Total de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo.

Em solução nutritiva, a maior produção de matéria seca foi obtida quando o N foi fornecido na forma de uma mistura de $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$ na proporção de 50/50, evidenciando a plasticidade desta espécie em utilizar satisfatoriamente as duas formas de N.

Os teores de N-total na parte aérea das plantas inoculadas e não inoculadas foram maiores que 1,2%, considerados como críticos para Pinus spp. (TORBERT et alii, 1986), e para Eucalyptus grandis (Kaul et alii,

1968, citados por BARROS e PRITCHETT, 1978). Assim, considera-se que a utilização de nitrato para produção de mudas de Eucalyptus grandis apresente bons resultados, sobretudo utilizando-se isolados fúngicos com maior capacidade de absorver e assimilar o nitrato.

O conteúdo de P na parte aérea diferiu entre as plantas inoculadas e não inoculadas, de acordo com as doses de N aplicadas ao solo (Quadro 11). As plantas inoculadas com Pt-RS27 apresentaram maior conteúdo de P nas doses de 100 e 200 ppm de N, quando comparado aos demais tratamentos. Nas menores doses de N adicionadas ao solo, o conteúdo de P não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, exceto no caso das plantas inoculadas com Pt-IS83, que apresentaram menor conteúdo deste elemento na ausência de N aplicado ao solo. É interessante observar, também, que o maior acúmulo de P verificado nas plantas inoculadas com Pt-RS27 foi acompanhado por maior acúmulo de N, maior produção de matéria seca e maior atividade da RN. Isto, provavelmente, está indicando a necessidade do P na parte aérea para maior produção da energia requerida na redução do nitrato e outros processos metabólicos (SALSAC et alii, 1987).

O conteúdo de P aumentou em função das doses de N aplicadas ao solo (Figura 6). Nas plantas inoculadas com Pt-IS83 observou-se aumento no acúmulo de P até a dose de 176 mg de N/kg de solo, e a partir dessa dose permaneceu praticamente constante.

Nas plantas inoculadas com o Pt-RS27, entretanto, este aumento foi linear até a maior dose de N aplicado ao solo. As plantas controle, também, acumularam P em função das doses de N aplicadas ao solo, porém numa proporção muito menor. Para estas plantas a dose de N estimada para a obtenção do maior conteúdo de P na parte aérea foi de 152 mg de N/kg de solo.

QUADRO 11 - Conteúdo de P na Parte Aérea de Mudas de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius, em Função de Doses de Nitrato

Doses de N	CONTEÚDO DE FÓSFORO					
	Pt-IS83	Pt-RS27	Cont.	Pt-IS83	Pt-RS27	Contr. ^{1/}
ppm	mg			%		
0	3,41 B	7,45 A	7,78 A	0,06 B	0,13 A	0,13 A
50	11,93 A	10,58 A	11,17 A	0,11 A	0,10 A	0,11 A
75	12,58 A	12,78 A	11,65 A	0,10 A	0,11 A	0,09 A
100	12,91 B	16,25 A	12,75 B	0,11 A	0,12 A	0,12 A
200	17,47 A	19,82 A	12,68 B	0,10 A	0,11 A	0,07 A
Médias	11,66	13,37	11,21	0,10	0,11	0,11

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, em cada linha, não diferem, pelo teste de Student Newman-Keuls ($P > 0,05$).

1/Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisolithus tinctorius
1/Cont. = controle não inoculado

Os teores médios de P das plantas inoculadas com P. tinctorius IS83, Pt-RS27 e plantas não inoculadas foram 0,10, 0,11 e 0,11%, respectivamente (Quadro 11). Estes valores são semelhantes aos obtidos por NOVAIS et alii

(1990) para diversas espécies de eucalipto, sob diferentes condições de cultivo. Em mudas de Pinus taeda inoculadas com P. tinctorius e cultivadas em diferentes níveis de N foram obtidos aumentos quadráticos para teor de P na parte aérea, com o aumento de N no substrato de crescimento das plantas (TORBERT et alii, 1986). No presente trabalho, aplicou-se ao solo 75 ppm de P, que resultou, após o período de incubação, em 9,3 ppm de P disponível. Para valores próximos a este valor de P disponível observaram-se os maiores conteúdos desse elemento na parte aérea de Eucalyptus grandis e Pinus caribaea inoculadas com P. tinctorius (SOARES, 1986; MENDONÇA, 1991).

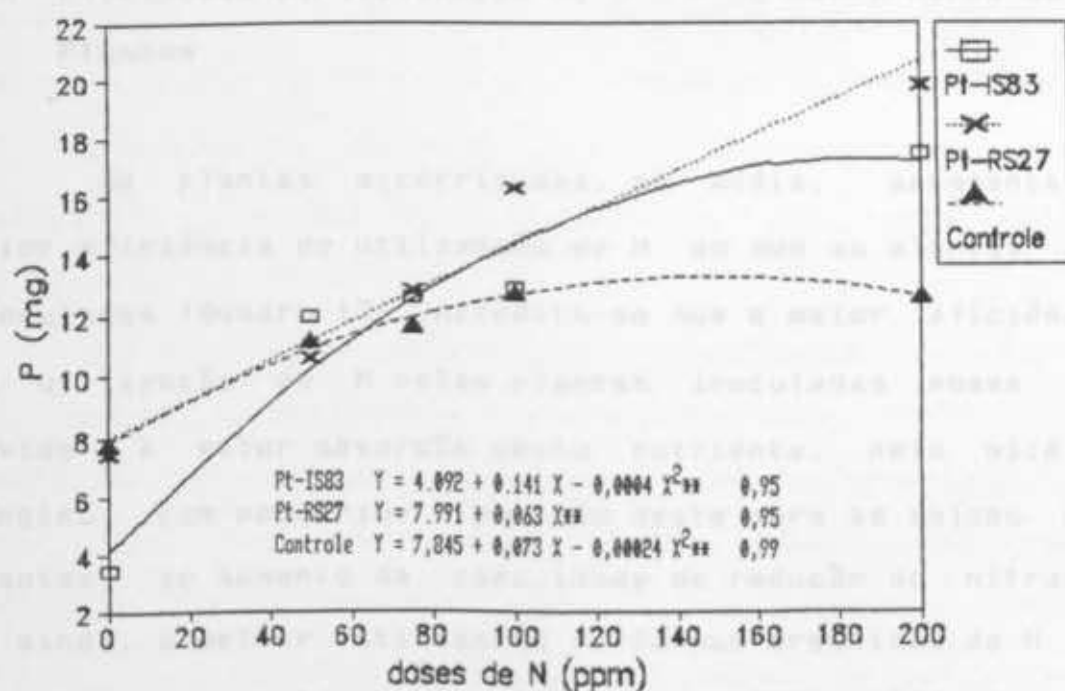


FIGURA 6. Conteúdo de P de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius Isolados (Pt-IS83) e (Pt-RS27), em Função de Doses de N Aplicadas ao Solo.

Fósforo disponível acima de 13,3 mg/kg de solo, entretanto, não afetou o conteúdo de P na parte aérea de *E. grandis* inoculadas ou não com *P. tinctorius* (SOARES, 1986). A maior absorção de P por plantas de *Eucalyptus* sp. inoculadas com fungos ectomicorrízicos em relação às plantas não inoculadas tem sido relatada, também, em diversos trabalhos (ASHFORD et alii, 1975; CHILVERS e HARLEY, 1980; LAPEYRIE et alii, 1984; HEINRICH et alii, 1988). Apesar de, na maioria das vezes, o P absorvido ser armazenado no manto fúngico e liberado lentamente para as plantas (HEINRICH e PATRICK, 1986).

4.6. Eficiência de Utilização de N e P na Parte Aérea das Plantas

As plantas micorrizadas, em média, apresentaram maior eficiência de utilização de N do que as plantas não inoculadas (Quadro 12). Acredita-se que a maior eficiência de utilização de N pelas plantas inoculadas possa ser devido à maior absorção deste nutriente pelo micélio fúngico, com posterior liberação deste para as raízes das plantas, ao aumento da capacidade de redução do nitrato, ou ainda, à melhor utilização de formas orgânicas de N do solo (FINLAY et alii, 1989; EKWEBELAM e REID, 1983; France, 1982 citado por FRANCE e REID, 1983).

A eficiência de utilização de N na maior dose de N aplicado ao solo (200 ppm) foi de 927 e 928 g² de MS/g de

N, para as plantas inoculadas com Pt-IS83 e Pt-RS27, respectivamente (Quadro 13).

Na ausência de N aplicado ao solo, as plantas inoculadas com Pt-IS83 apresentaram a mais alta eficiência de P, quando comparadas com os demais tratamentos (Quadro 12). Isto pode indicar que as plantas inoculadas com Pt-IS83, em condições de baixa disponibilidade de N, seriam possivelmente mais eficientes na produção de matéria seca com um menor conteúdo de P. Nas doses intermediárias de N, esta diferença na utilização de P desapareceu e na maior dose de N as plantas controle passaram a apresentar a mais alta eficiência de utilização de P (Quadro 12). Esse valor foi de 16455, 16721 e 21189 g² MS/g de P para as plantas inoculadas com Pt-IS83, Pt-RS27 e controles, respectivamente (Quadro 13). Isto se deve, provavelmente, a uma produção de matéria seca semelhante nos três tratamentos, mas com menor conteúdo de P na parte aérea das plantas controle.

Experimentos com plantas de E. grandis, inoculadas com fungos micorrízicos, indicam que grande parte do P absorvido fica armazenado no manto fúngico, resultando em menor eficiência de utilização das plantas micorrizadas (AMORIM, 1988; COMERLATO, 1992). O P acumulado no manto fúngico pode ser liberado para as plantas, principalmente em condições de baixa disponibilidade desse nutriente (HEINRICH e PATRICK, 1986).

QUADRO 12 - Eficiência de Utilização (EU) de N-Total e P de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas ou Não com Pisolithus tinctorius, em Função de Doses de Nitrato

DOSES DE N	E.U. DE N-TOTAL			E.U. DE P		
	Pt-IS-83	Pt-RS27	Contr.	Pt-IS83	Pt-RS27	Contr.
	g ² MS/g do elemento					
0	530,6	512,4	506,9	9205A	4677B	4362B
50	936,3	767,1	615,8	10562A	9787A	8377A
75	784,6	711,4	716,7	11625A	9951A	12171A
100	765,8	803,6	632,0	11869A	11503A	9291A
200	920,0	887,9	635,7	16855B	16257B	22129A
Médias	787,5A	736,5A	621,4B	12025	10435	11266

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, em cada linha, não diferem pelo teste de Student Newman-Keuls (P>0,05)

1/Pt-IS83 e Pt-RS27 = Isolados de Pisolithus tinctorius
1/Contr. = Controle não inoculado

QUADRO 13 - Equações de Regressão Ajustadas para Eficiência de Utilização de N e P (Y), em Função de Doses de N (X), para Dois Isolados de P. tinctorius

Fungo 1/	Equações	R ²
	Nitrogênio	
Pt-IS83	$Y = 530,9 + 267,4 X^{0,5} - 43,0 X + 1,844X^{1,5}$ **	0,98
Pt-RS27	$Y = 594,8 + 1,665 X$ **	0,77
Controle	$Y = 621,4$	
	Fósforo	
Pt-IS83	$Y = 8746,9 + 38,54 X$ **	0,97
Pt-RS27	$Y = 5789,0 + 54,66 X$ **	0,95
Controle	$Y = 3930,9 + 86,29 X$ **	0,92

** Significativo, pelo teste F (P>0,01)

* Significativo, pelo teste F (P>0,05)

1/ Pt-IS83 e Pt-RS27 = isolados de Pisolithus tinctorius

que apresentaram as maiores taxas de redução. Foram
E. Paxillus involutus e Scleroderma sp. e Paxillus involutus, em meio
exclusivamente com $N-NH_4^+$ e Scleroderma sp. e Paxillus involutus
contendo apenas $N-NO_3^-$. De modo geral, observou-se relação
inversa entre a atividade da RN e produção de massa
micelial. Os meios contendo $N-NH_4^+$ apresentaram as maiores
reduções de NO_3^- em geral, sendo estes valores inferiores
para os meios contendo $N-NH_4^+$ + $N-NO_3^-$ na proporção 1:1 e
maiores para os meios

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Estudou-se, também, a efeito da aplicação de cinco
dias de nitrito. Os resultados são apresentados a seguir.
A atividade da redutase do nitrato (RN) foi
determinada em Pisolithus tinctorius isolados Pt-IS83 e
Pt-RS27, Scleroderma sp. e Paxillus involutus, crescidos
durante 28 dias na presença de ($N-NH_4^+$ ou $N-NO_3^-$ ou a
mistura dos dois na proporção 1:1), em cinco repetições.

Os dois isolados de Pisolithus tinctorius
apresentaram uma atividade da RN cerca de seis vezes
maior do que os fungos Scleroderma sp. e Paxillus
involutus, quando crescidos na presença de $N-NH_4^+$ + $N-NO_3^-$.
Na presença de apenas $N-NO_3^-$ a atividade desta enzima nos
isolados de P. tinctorius foram 2,5 e oito vezes maior do
que em Paxillus involutus e Scleroderma sp.,
respectivamente. As menores atividades da redutase da RN
foram verificadas quando os fungos cresceram em meio
contendo exclusivamente $N-NH_4^+$. A presença de $N-NH_4^+$ no
meio de cultivo reduziu a atividade da enzima nos isolados
de P. tinctorius, mas não nas demais espécies. Os isolados

que apresentaram os maiores pesos de massa micelial foram P. tinctorius em isolados RS27 e P. involutus, em meio exclusivamente com $N-NH_4^+$ e Scleroderma sp., em meio contendo apenas $N-NO_3^-$. De modo geral, observou-se relação inversa entre a atividade da RN e produção de massa micelial. Os meios contendo $N-NH_4^+$ apresentaram as maiores reduções de pH final, sendo estes valores intermediários para os meios contendo $N-NH_4^+ + N-NO_3^-$ na proporção (1:1) e menores para os meios contendo apenas $N-NO_3^-$.

Estudou-se, também, o efeito da aplicação de cinco doses de nitrato (0, 50, 75, 100 e 200 ppm de N) na colonização ectomicorrízica, atividade da redutase do nitrato e composição mineral de mudas Eucalyptus grandis inoculadas com dois isolados de Pisolithus tinctorius: IS83 e RS27. Aos 120 dias após o transplante, as plantas foram coletadas e determinadas a porcentagem de colonização ectomicorrízica, o peso da matéria seca, a atividade da RN e as quantidades de $N-NO_3^-$, N-total e P. As doses de Nitrato que resultaram na máxima colonização foram de 108 e 91 ppm nas plantas inoculadas com P. tinctorius isolados IS83 e RS27, respectivamente. Em doses mais elevadas observou-se, de modo geral, redução no grau de colonização. A produção de matéria seca aumentou com as doses de N aplicadas ao solo, mesmo com a redução no grau de colonização ectomicorrízica. A produção de raízes das plantas inoculadas foi superior àquela dos controles. A atividade da RN das plantas inoculadas com P. tinctorius isolado RS27 foi superior às inoculadas com o isolado IS83

e plantas controle. As plantas inoculadas apresentaram maior conteúdo de $N-NO_3^-$ do que as plantas do controle. O acúmulo máximo deste elemento foi obtido com a aplicação de 188,5, 166,7 e 62,6 ppm de N para as plantas inoculadas com os isolados IS83, RS27 e plantas do controle, respectivamente. O conteúdo de N-total e P na parte aérea variaram com a inoculação e doses de N aplicadas ao solo. O conteúdo de N-total das plantas inoculadas com P. tinctorius isolado RS27 só foi superior ao das plantas controle, na dose de 100 ppm, mas não houve diferença entre isolados. Na dose de 200 ppm, entretanto, o controle apresentou um conteúdo de N-total superior ao das plantas inoculadas. O acúmulo máximo de P nas plantas inoculadas com o isolado IS83 foi obtido com a aplicação de 176 ppm de N. Nas plantas inoculadas com o isolado Rs27 esse aumento foi crescente até a última dose de N. As plantas controle também acumularam P, mas numa proporção menor. Em média, as plantas inoculadas apresentaram maior eficiência de utilização de N, enquanto a eficiência de utilização de P variou com as doses de N aplicadas ao solo.

- ADAMS, M.A. & ATTIWILL, P.M. Nitrate reductase activity and growth response of forest species to ammonium and nitrate sources of nitrogen. Plant Soil., 66:373-381, 1982b.
- ALEXANDER, I.J. & FAIRLEY, R.I. Growth and nitrogen uptake rates of ectomycorrhizal spruce seedlings. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAL, 1985. Proceedings. Paris, INRA, 1986. p.377-82.
- ALVAREZ, V. H. V. Equilíbrio de formas disponível de fósforo e enxofre em dois latossolos de Minas Gerais. Vicosá, MG, UFV, 1974. 126p. (Tese M. S.)
- AMORIN, E.F.C. Comportamento de mudas de Eucalyptus grandis na presença de fungos endo e ectomicorrízicos. Vicosá, MG, UFV, 1988. 56p. (Tese M.S.)
- ANDREWS, M. The partitioning on nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. Plant cell & Environ., 9: 511-9, 1986.
- ASHFORD, A.E.; LING-LEE, M.; CHILVERS, G.A. Polyphosphate in eucalypt mycorrhizas: a cytochemical demonstration. New Phytol., 74:447-53, 1975.
- ASTHON, D.H. Studies on the mycorrhizae of Eucalyptus regnans F. Muell. Aust. J. Bot., 24:723-741, 1976.
- BARROS, N.F. & PRITCHETT, W.L. Effect of sources and rates of nitrogen on growth and composition of Eucalyptus grandis. Soil Crop Sci. Soc. Ela. Proc., 38:12-4, 1978.
- BARROS, N.F.; BRANDI, R.M.; REIS, M.S. Micorriza em eucalipto. R. Árv. 2:130-40, 1978.
- BARTLETT, E.M. & LEWIS, D.H. Surface phosphatase activity of mycorrhizal roots of beech. Soil Biol. Biochem., 5:249-57, 1973.
- BECKJORD, P.R.; ADAMS, R.E.; SMITH, D.Wm. Effects of nitrogen fertilization on growth and ectomycorrhizal formation of Red Oaks. Forest Sci., 26:529-36, 1980.
- BECKJORD, P.R.; MELHUSH, J.H.; MCINTOSH, M.S.; HACSKAYLO, E. Effects of nitrogen fertilization on growth and ectomycorrhizal formation of Quercus alba, Q. rubra, Q. falcata, and Q. falcata var. pagodifolia. Can. J. Bot., 61:2507-14, 1983.
- BECKJORD, P.R.; SMITH, D.Wm.; MCINTOSH, M.S. Effects of nitrogen fertilization and Pisolithus tinctorius on Quercus rubra seedlings root and pot development. 30: 124-8, 1984.

- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H. Uptake and reduction of nitrate by bacteria and higher plants. In: LAUCHLI, A. & BIELESKI, R. L. (eds). Inorganic plant nutrition; encyclopaedia of plant, physiology. Berlin, Springer Verlag, 1983. 15A, p. 351-375.
- BIGG, W. L. & DANIEL, T. W. Effects of nitrate, ammonium and pH on the growth of conifer seedlings and their production of nitrate reductase. Plant Soil, 50:371-85, 1978.
- BLEDSON, C.S. & ZASOSKI, R.J. Effects of ammonium and nitrate uptake by mycorrhizal douglas-fir seedlings. Plant Soil, 71: 445-54. 1983.
- BLEDSON, C.S. & RYGIEWICZ, P.T. Ectomycorrhizas effect on ionic balance during ammonium uptake by douglas-fir roots. New Phytol., 102:271-83, 1986.
- BLEDSON, C.S.; BROWN, D.; COLEMAN, M.; LITKE, W.; RYGIEWICZ, P.; SANGWANIT, U.; ROGERS, S.; AMMIRATI, J. Physiology and metabolism of ectomycorrhizae. Ann. Sci. For.; 46:697-705, 1989.
- BOWEN, G.D. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: MARKS, G. C. & KOZLOWSKI, T.T. (eds.). Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. New York, Academic Press, 1973. p. 151-205.
- BOXMAN, A. W & ROELOFS, J. G. M. Some effects of nitrate versus ammonium nutrition on the nutrient fluxes in Pinus sylvestris seedlings: effects of mycorrhizal infection. Can. J. Bot., 66: 1091-97, 1988.
- BRADLEY, R., BURT, A.J., READ, D.J. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in Calluna vulgaris. Nature, 292:5-337, 1981.
- BRAGA, J.M. & DEFELIPPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e plantas. R. Ceres. 21:73-85, 1974.
- CALDEIRA, M.T.M. Interações metabólicas do nitrogênio e do enxofre em plantas de Eucalyptus grandis. Vicosa, MG, UFV, 1988. 51p. (Tese M. S.)
- CATALDO, D.A.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. Crop Sci., 14:854-56, 1974.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Comm. Soil Sci. Plant Anal., 6: 71-80, 1975.

- CHILRVERS & HARLEY, J.L. Visualization of phosphate accumulation in beech mycorrhizas. New Phytol. 84: 319-26, 1980.
- CHU-CHOU, M. & GRACE, L.J. Mycorrhizal fungi of Eucalyptus in the North Island of New Zealand. Soil Biol. Biochem., 14: 133-7, 1982.
- COMERLATO, A.G. Determinação de especificidade e eficiência de fungos ectomicorrízicos para Eucalyptus spp. Vicosá, MG, UFV, 1992. 58p. (Tese M.S.)
- COSTA, E.M. Efeitos do Al, NO₃ e NH₄ sobre a nutrição nitrogenada em Eucalyptus grandis Hill (Maiden). Vicosá, MG, UFV, 1986. 50p. (Tese M.S.)
- DANIELSON, R.M.; GRIFFITHS, C.L.; PARKINSON, D. Effects of fertilization on the growth and mycorrhizal development of container grown jack pine seedlings. For. Sci., 30: 828-35, 1984.
- DIXON, R.K.; GARRETT, H.E.; COX, G.S.; MARX, D.H.; SANDER, I.L. Inoculation of Quercus species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. I. Inoculation success and seedling growth relationships. For. Sci., 30: 364-72, 1984.
- DRIESSCHE, R. & DANGERFIELD, J. Response of douglas-fir seedlings to nitrate and ammonium nitrogen sources under various environmental conditions. Plant Soil, 42: 685-702, 1975.
- EKWEBELAM, S.A. & REID, C.P.P. Effect of light, nitrogen fertilization, and mycorrhizal fungi on growth and photosynthesis of lodgepole pine seedlings. Can. J. For. Res., 13: 1099-106, 1983.
- EPSTEIN, E. Nutrição mineral de plantas. Princípios e perspectivas. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1975. 341p.
- FERNANDES, M.S. & FREIRE, L.R. Efeitos de nitrogênio nítrico aplicado ao solo na atividade da nitrato redutase e na assimilação de N-solúvel em Brachiaria sp. Turrialba, 26: 268-73, 1976.
- FERRARI, T.E.; YODER, D.C.; FILNER, P. Anaerobic nitrite production by plant cells tissues: evidence for two nitrate pools. Plant Physiol., 51: 423-31, 1973.
- FERREIRA, F. A.S. A interação nitrato, fosfato e sulfato na absorção de fosfato e de sulfato no crescimento de eucalipto e no seu metabolismo de nitrato e sulfato. Vicosá, MG, UFV, 1986. 95p. (Tese M.S.)

- FINLAY, R D ; EK, H ; ODHAM, G ; SODERSTROM, B. Uptake translocation and assimilation of nitrogen from ^{15}N -labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of Fagus sylvatica infected with Paxillus involutus. New Phytol., 113:47-55, 1989.
- FRANCE, R C. & REID, C.P.P. Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. Can. J. Bot. 61:964-84, 1983.
- GAGNON, J ; LANGLOIS, C.G. ; FORTIN, J.A. Growth and ectomycorrhiza formation of containerized black spruce seedlings as affected by nitrogen fertilization inoculum type, and symbiont. Can. J. For. Res., 18:922-9, 1988.
- GARBAYE, J, DELWAULLE J.C. ; DIANGANA, D. Growth response of Eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. For. Ecol. & Man., 24:151-7, 1988.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol., 84:489-500, 1980.
- HARLEY, J L. & SMITH, S.E. Mycorrhizal symbiosis. New York, Academic Press, 1983. 483p.
- HEINRICH, P.A & PATRICK, J.W. Phosphorus acquisition in soil-root system of Eucalyptus pilularis Smith seedlings. II. The effects of ectomycorrhizas on seedlings phosphorus and dry weight acquisition. Aust. J. Bot., 34:445-54, 1986.
- HEINRICH, P.A. ; MULLIGAN, D.R. ; PATRICK, J.W. The effects of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of Eucalyptus seedlings. Plant Soil. 109:147-9, 1988.
- HENRIQUES, A.B. Absorção e assimilação de nitrogênio em Pinus caribaea var. hondurensis em associação micorrizica com Pisolithus tinctorius. Vicosa, MG, UFV, 1991. 72p. (Tese M.S)
- HENRIQUES, A.B. ; MUCHOVEJ, R.M.C. ; CAMBRAIA, J. Nitrate reductase activity in Pisolithus tinctorius cultured on medium containing nitrate and/or ammonium. R. bras. Microb., 1992. (no prelo).
- HO, I. Comparison of eight Pisolithus tinctorius isolates for growth rate, enzyme activity, and phytohormone production. Can. J. For. Res., 17:31-5, 1986.
- HO, I. Acid phosphatase, alkaline phosphatase and nitrate reductase activity of selected ectomycorrhizal fungi. Can. J. Bot., 67:750-3, 1988.

- HO, I & TRAPPE, J.M. Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia, 67:886-8, 1975.
- HO, I & TRAPPE, J.M. Nitrate reductase activity of nonmycorrhizal Douglas-fir rootlets and of some associated mycorrhizal fungi. Plant Soil, 54:315-98, 1980.
- HO, I & TRAPPE, J.M. Enzymes and growth substances on Rhizopogon species in relation to mycorrhizal host and intrageneric taxonomy. Mycologia, 79:553-8, 1987.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43:1274-79, 1971.
- KRAJINA, V.J.; MADOC - JONES, S.; MELLOR, G. Ammonium and nitrate in the nitrogen economy of some conifers growing in Douglas-fir communities of Pacific Northwest of America. Soil Biol. Biochem., 5:143-7, 1973.
- KUCEY, R.M & PAUL, E.A. Carbon flow, photosynthesis and N_2 fixation in mycorrhizal and nodulated faba beans Vicia faba. Soil Biol. Biochem. 14:407-12, 1982.
- LAPEYRIE, E.F. & BRUCHET, G. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. New Phytol., 100:585-93, 1985.
- LAPEYRIE, F.F.; CHILVERS, G.A.; DOUGLAS, P.A. Formation of metachromatic granules following phosphate uptake by micelial hyphae of an ectomycorrhizal fungus. New Phytol., 98:345-60, 1984.
- LAWRENCE, J.M. & HERRICK, H.E. Media for in vivo nitrate reductase assay of plant tissues. Plant Sci. Lett., 24:17-26, 1982.
- LITTKER, W.R.; BLEDSOE, C.S.; EDMONUNDS, R.L. Nitrogen uptake and growth in vitro Hebeloma crustuliniforme and other pacific northwest mycorrhizal fungi. Can. J. Bot., 62:647-52, 1984.
- LOCATELLI, M. Efeito de formas, fontes e doses de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de Eucalyptus grandis, W. Hill (ex. Maiden). Vicosá, MG, UFV, 1984. 48p. (Tese M. S.)
- MARGOLIS, H.A. & VEZINA, L.P. Nitrate content, amino acid composition and growth of yellow birch seedlings in response to light and nitrogen source. Tree Physiol., 4:245-53, 1988.

- MARONEK, D. M.; HENDRIX, J. W.; CORNELIUS, P. L. Slow-release fertilizers optimize mycorrhizal development in container-grown pine seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius*. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 107:1104-10, 1982.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 1986. 674p.
- MARTIN, F.; RAMSTEDT, M.; SODERHALL, K. Carbon and nitrogen in ectomycorrhizae fungi and ectomycorrhizas. Biochemie, 62:569-81, 1987.
- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathol., 59:153-63, 1969.
- MARX, D. H. The host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius*. Can. J. Bot., 23:217-23, 1977a.
- MARX, D. H. Role of mycorrhizal in forestation of surface mines. In: Symposium on Trees for Reclamation in the Eastern United States, Lexington, Kentucky, USDA, Forest Service, 1980. p. 109-16.
- MARX, D. H. Variability in ectomycorrhizae development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. Can. J. For. Res., 11:168-74, 1981.
- MARX, D. H. & BRYAN, W. D. Growth and ectomycorrhizae development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. For. Sci., 21:245-54, 1975.
- MARX, D. H. & ARTMAN, J. D. *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal improve survival and growth of pine seedlings on acid coal spoils in Kentucky and Virginia. Reclam. Rev. 2:23-31. 1979.
- MARX, D. H.; HATCH, A. B.; MENDICINO, J. F. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. Can. J. Bot., 55:1569-74, 1977b.
- MARX, D. H.; RUEHLE, J. L.; KENNEY, D. S.; CORDELL, C. E.; RIFFLE, J. W.; MOLINA, R. J.; 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., 28:373-400, 1982.

- MENDONÇA, L.F. Seleção de fungos ectomicorrízicos para utilização em programas de inoculação controlada em Pinus caribaea. Competitividade e níveis de fósforo no solo. Vicosá, MG, UFV, 1991. 60p. (Tese M.S)
- MENTION, M. & PLASSARD, C. Comparison de la nutrition nitrique et ammoniacale de quatre espèces de Basidiomycetes ectomycorrhiziens. C. R. Acad. Sc., 297:498-492, 1983.
- MITCHELL, R.J.; COX, G.S.; DIXON, R.K.; GARRETT, H.E., SANDER, I.L. Inoculation of three Quercus species with eleven isolates of ectomycorrhizae fungi. II Foliar nutrient content and isolate effectiveness. For. Sci., 30:563-72, 1984.
- MOLINA, R. Ectomycorrhizal inoculation of containerized douglas-fir and lodgepole pine seedlings with six isolates of Pisolithus tinctorius. For. Sci., 25:585-90, 1979
- MOLINA, R. Use of the ectomycorrhizal fungus Laccaria laccata in forestry. I. Consistency between isolates in effectiveness colonization of containerized conifer seedlings. Can. J. For. Res., 12:469-73, 1982.
- MORSELT, A. F.W; SMITS, W.T.M.; LIMORD, T. Histochemical demonstration of heavy-metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. Plant Soil, 96:417-420, 1986.
- MOSSE, B.; STRIBLEY, D.P.; LE TACON, F. Ecology of mycorrhizal fungi. Advan. Microb. Ecol., 5:137-210, 1981.
- NOVAIS, R.F.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. Nutrição mineral do eucalipto. In: BARROS, N.F. & NOVAIS, R.F. (eds.). Relação Solo-Eucalipto. Vicosá, MG, Folha de Vicosá, 1990. p. 25-98.
- DAKS, A. Biochemical aspects of nitrogen metabolism in whole plant context. In: Lambers, H.; Neeteson, J.J; Stulen, I., eds. Fundamental ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1986. p 133-51.
- PATE, J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Soil Biol. Biochem., 5:109-19, 1973.
- PATE, J. S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Ann Rev. Plant Physiol., 31:313-40, 1980.
- PEELER, T.C. & MULLINS, J.L. Nitrogen nutrition in the ectomycorrhizal fungus Pisolithus tinctorius. Mycologia, 74:334-37, 1982.

- PICHE, Y. & FORTIN, J.A. Development of mycorrhizal extramatricial mycelium and sclerotia on Pinus strobus seedlings. New Phytol., 91:211-20, 1982.
- PLASSARD, C., MARTIN, D., SALSAC, L. Nitrate assimilation by maritime pine and ectomycorrhizal fungi in pure culture. In: European symposium on mycorrhizae, 1, 1985. Proceedings. Paris, INRA, 1986. p.383-89.
- POKHRIYAL, T.C. & RATURI, A.S. Nitrate assimilation in leaf blades of Eucalyptus. Indian For., 110:202-08, 1984.
- READ, D.J.; LEAKE, J.R.; LANGDALE, A.R. The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. In: BODDY, L.; MARCHANT, R.; READ, D.J. Nitrogen, phosphorus and sulfur utilization by fungi. Cambridge, Cambridge University, 1989. cap.9. p.181-204.
- REID, C.P.P.; KIDD, F.A.; EKWEBELAM, S.A. Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. Plant Soil., 71:415-32, 1983.
- RICHARDS, B.N. & WILSON, G.C. Nutrient supply and mycorrhizal development in caribbean pine. For. Sci., 9:405-12, 1963.
- RUEHLE, J. & WELL, C.G. Development of Pisolithus tinctorius ectomycorrhizae on container-grown pine seedlings as affected by fertility. For. Sci., 30:1010-16, 1984.
- RYGIEWICZ, P.T., BLEDSOE, C.S.; ZASOSKI, R.J. Effects of ectomycorrhizae and solution on pH on ¹⁵N-ammonium uptake by coniferous seedlings. Can. J. For. Res., 14:885-92, 1984a.
- RYGIEWICZ, P.T., BLEDSOE, C.S.; ZASOSKI, R.J. Effects of ectomycorrhizae and solution pH on [¹⁵N] nitrate uptake by coniferous seedlings. Can. J. For. Res., 14:893-9, 1984b.
- SALSAC, L.; CHAILLOU, S.; MOROT-GAUDRY, JF.; LESAIN, C.; JOLIVET, E. Nitrate and ammonium nutrition in plants. Plant Physiol. 25:805-12, 1987.
- SARJALA, T. Effect of nitrate and ammonium concentration on nitrate reductase activity in five species of mycorrhizal fungi. Physiol. Plantarum, 79:65-70, 1990.
- SARJALA, T. Effect of mycorrhiza and nitrate nutrition on nitrate reductase activity in Scott pine seedlings. Physiol. Plantarum, 81:89-94, 1991.
- SCHERDMM, P.; PASSARD, C.; SALSAC, L. Regulation of nitrate reductase in the ectomycorrhizal basidiomycete, Hebeloma

- cylindrosporium Romagn, cultured on nitrate or ammonium. New Phytol., 114:441-7, 1990.
- SCHWAN, K.R.F. Caracterização incidência e ecologia de micorrizas em viveiro e florestas de Eucalyptus spp, na região de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, MG, UFV, 1984. 55p. (Tese M.S.)
- SHAW, C.G.; MOLINA, R.; VALDEN, J. Development of ectomycorrhizae following inoculation of containerized sitka and white spruce seedlings. Can. J. For. Res., 12:191-5, 1982.
- SIDDIQI, M.Y. & GLASS, D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. J. Plant Nutr., 4:289-302, 1981.
- SMIRNOFF, N. & STEWART, G.R. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. Physiol. Plant., 64:133-40, 1985.
- SMIRNOFF, N.; TODD, P.; STEWART, G.R. The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. Ann. Bot., 54:363-74, 1984.
- SMITH, S.E. & DAFT, M.J. Interaction between growth, phosphate content and nitrogen fixation in mycorrhizal and non-mycorrhizal Medicago sativa. Aust. J. Plant Physiol., 4:403-13, 1977.
- SOARES, I. Níveis de fósforo no desenvolvimento de ectomicorrizas por Pisolithus tinctorius (Pers). Coker e Couch e no crescimento de mudas de eucalipto. Viçosa, MG, UFV, 1986. 51p. (Tese M.S.)
- SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; BELLEI, M.M. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de Eucalipto. R. bras. Ci. Solo., 14:327-32, 1990.
- SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. Phytochem., 19:725-33, 1980.
- STREETER, J.G. & BOSLER, M.E. Comparison of "in vitro" and "in vivo" assays for nitrate reductase in soybean leaves. Plant Physiol., 49:448-50, 1972.
- TORBERT, J.L.; BURGER, J.A.; KREH, R.E. Nutrient concentration effects on Pisolithus tinctorius development containerized loblolly pine (Pinus taeda L.) seedlings. Tree Planters Note., 37:17-22, 1986.
- TRAPPE, J.M. & GUZMAN, G. Notes on some hypogeous fungi from Mexico. Mycologia., 63:317-20, 1971.

- VALDEZ, M. Survival and growth of pine with specific ectomycorrhizae after 3 years on a high eroded site. Can. J. Bot., 64:885-8, 1986.
- VALE, F. R.; NOVAIS, R. F.; BARROS, N. R. & SANTANNA, R. Efeito do alumínio sobre a cinética da absorção de amônio e nitrato em raízes intactas de Eucalyptus alba. R. Arv., 8:123-32, 1984.
- VETORRI, I. Métodos de análises do solo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, EPF, 1969. 24p. (Boletim técnico).
- VEZINA, L. P.; MARGOLIS, H. A.; McFEE, B. J. et al. Change in the activity of enzymes involved with primary nitrogen metabolism due to ectomycorrhizal symbioses on jack pine seedlings. Physiol. Plantarum, 75:55-62, 1989.
- VIEIRA, R. F. & PEREZ, J. R. R. Definição do teor de fósforo no solo para máxima eficiência da associação ectomicorrízica em Eucalyptus grandis. R. bras. Ci. Solo, 12:237-41, 1988.
- VITOUSEK, P. M.; GOSZ, J. R.; GRIER, C. C. et al. Nitrate loss from disturbed ecosystems. Science, 204:469-74, 1979.
- VOGT, D. J. & EDMONDS, R. L. Nitrate and ammonium levels in relation to site quality in douglas-fir soil and litter. Northwest Sci., 56:83-9, 1982.
- YOKOMIZO, N. K. S. Associação ectomicorrízica de Pisolithus tinctorius (Pers) Coker e Couch com espécies de Eucalyptus L. Héritier. Piracicaba, ESALQ, 1981. 54p. (Tese M.S.)
- ZAMBOLIM, L. & BARROS, N. F. Constatação de micorriza vesicular-arbuscular em Eucalyptus spp. na região de Vicosa. MG. R. Arv., 6:95-7, 1982.
- ZAMBOLIM, L. & SIQUEIRA, J. O. Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. s.e., EPAMIG, 1985. 36p. (Série Documentos, 26).

QUADRO 1A - Resumo de Análise de Variância dos Dados de Peso Seco de Micélio, Atividade da Redutase do Nitrato (ARN) e Diferença de pH dos Meios Antes e Depois o Crescimento dos Fungos (DpH)

Fontes de Variação	GL	Quadrados	Médias
Meios	2	504.0202 **	1.5157 **
Fungos	3	10890.8000 **	1.3467 **
M x F	6	581.8310 **	0.2115 *
Resíduo	48	60.5101	0.0780
C.V. %		18.23	71.79

QUADRO 1A - Resumo de Análise de Variância dos Dados de Peso Seco de Micélio, Atividade da Redutase do Nitrato (ARN) e Diferença de pH dos Meios Antes e Depois o Crescimento dos Fungos (DpH)

F. V.	G. L.	Quadrados		Médias	
		Peso Micélio	(ARN) 1/	DpH 2/	
Meios (M)	2	504.0202 **	1.5157 **	13.7862 **	
Fungos (F)	3	10890.8000 **	1.3467 **	2.8624 **	
M x F	6	581.8310 **	0.2115 *	0.5728 **	
Resíduo	48	60.5101	0.0780	0.0284	
C.V. %		18.23	71.79	9.05	

** Significativo, pelo teste F (P < 0,01)
 * Significativo, pelo teste F (P < 0,05)
 ns Não significativo, pelo teste F (P > 0,05).
 1/ ARN = Atividade da redutase do nitrato
 2/ DpH = pH inicial - pH final

QUADRO 2A - Resumo de Análise de Variância dos Dados de Porcentagem de Formação Ectomicorrízica de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de N. Médias de Quatro Repetições

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Ectomicorrizas	
Blocos	3	115,1653	
Fungos	1	268,1686*	
Nitrogênio	(4)	802,5267*	
F/N ₀	1	28,80405	
F/N ₅₀	1	104,3290	
F/N ₇₅	1	253,1250	
F/N ₁₀₀	1	33,99003	
F/N ₂₀₀	1	470,4779*	
F X N	4	155,6394*	
Resíduo	27	41,65509	
CV (%)		25,71	

* Significância a 5%, pelo teste F (P (0,05)).

QUADRO 3A - Resumo de Análise de Variância dos Dados de Peso de Matéria Seca de Parte Aérea (MSPA), Peso de Matéria Seca de Raiz (MSRA) e Atividade da Redutase do Nitrato (ARN) de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de Nitrato. Médias de Quatro Repetições

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		MSPA	MSRA	ARN
Blocos	3	5,0359	0,2583	0,009543
Fungos	2	4,2905 ns	2,9180 *	0,0232**
Nitrogênio	4	199,6888 **	3,6068 **	0,01169*
F X N	8	2,5005 ns	0,6194 ns	0,00510ns
Resíduo	42	2,6211	0,6346	0,0032122
CV (%)		14,47	26,07	24,9

* Significativo, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

** Significativo, pelo teste F, a 1% de probabilidade.

ns Não significativo.

QUADRO 4A - Resumo de Análise de Variância dos Dados de Conteúdo de P, N-NO₃⁻, N-total e da Parte Aérea de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius Isolados ISB3 e RS27, em Função de Doses de N. Médias de Quatro Repetições

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		P (mg)	N-NO ₃ ⁻	N-total
Blocos	3	1,3395	0,0953	438,3347
Fungos	2	26,1789**	0,8910*	3128,0333**
Nitrogênio	4	179,0487**	2,2354**	153981,10**
F x N	8	17,3615**	0,2397ns	3506,9040ns
Resíduo	42	3,0144	0,2354	744,7336
CV (%)		14,4	24,0	14,0

** Significativo, pelo teste F (P<0,01).

* Significativo, pelo teste F (P<0,05)

ns Não significativo, pelo teste F (P>0,05)

QUADRO 5A- Resumo de Análise de Variância dos Dados de Teores de N-Total, N-NO₃⁻ e P de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius Isolados ISB3 e RS27, em Função de Doses de Nitrato. Médias de Quatro Repetições

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		N-Total (%)	N-NO ₃ (%)	P (%)
Blocos	3	0,05666253	0,00001242106	0,0003025073
Fungos	2	0,3934254**	0,00002722649ns	0,001911334**
Nitrogênio	4	1,943984**	0,0001516427**	0,0004764533*
F x N	8	0,1285807**	0,000006815046ns	0,001642574**
Resíduo	42	0,04032384	0,000008979757	0,0001451107
CV (%)		12,9	16,1	11,2

* Significativo, pelo teste F (P<0,05)

** Significativo, pelo teste F (P<0,01)

ns Não significativo, pelo teste F (P>0,05)

QUADRO 6A - Resumo de Análise de Variância dos Dados de (EU) Eficiência de Utilização de N e P de de Partes Aéreas de Mudanças de Eucalyptus grandis Inoculadas com Pisolithus tinctorius Isolados IS83 e RS27, em Função de Doses de Nitrato. Médias de Quadro Repetições

Fontes de Variação	G1	Quadrados Médios	
		(EU) N	(EU) P
Blocos	3	47,48	17396,70
Fungos	2	144,70**	12617,9ns
Nitrogênio	4	160,5**	242905,7**
F x N	8	237,4ns	19140,9**
Resíduo	42	21,15	7830,0
CV (%)		20,3	19,4

** Significativo, pelo teste F (P < 0,01).
 * Significativo, pelo teste F (P < 0,05).
 ns Não significativo, pelo teste F (P > 0,05).