

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA
DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM *Eucalyptus grandis* E
*Acacia mearnsii***

TESE DE DOUTORADO

Andréa Hentz de Mello

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA
DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM *Eucalyptus grandis* E
*Acacia mearnsii***

por

Andréa Hentz de Mello

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. João Kaminski

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA DE
FUNGOS MICORRÍZICOS EM *Eucalyptus grandis* E *Acacia
mearnsii***

elaborada por

Andréa Hentz de Mello

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA:

João Kaminski, Dr.

(Presidente/Orientador)

Zaida Inês Antonioli, Dr.

(Co-orientadora)

Danilo Rheinheimer dos Santos, Dr. (UFSM)

Eliane Maria Ribeiro da Silva, PhD. (EMBRAPA AGROBIOLOGIA – UFRRJ)

Julio Cesar Pires Santos, Dr. (UDESC)

Santa Maria, 29 de agosto de 2006

*“ Sonhar, apesar das desilusões,
Caminhar, apesar dos obstáculos,
Lutar, apesar das barreiras,
Acreditar em Deus, é tudo”*

DEDICO em especial aos meus pais Ildebrando e Mérli.

**OFEREÇO aos meus irmãos Sandro e
Nilza, exemplos de persistência e humildade.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e coragem para enfrentar tantos obstáculos e finalmente atingir esse objetivo, tornando a pesquisa uma realidade que avança à nossa compreensão.

À UFSM, ao PPGCS e ao Departamento de Solos e a seus professores, pelo conhecimento adquirido.

Aos professores João Kaminski e Zaida Inês Antonioli, pela orientação, ensinamentos, amizade, confiança e pelo exemplo de dedicação ao ensino superior.

À professora Vetúria Lopes de Oliveira e à Universidade Federal de Santa Catarina pelo estágio concedido, doação de isolados de fungos ectomicorrízicos e pelas sugestões dadas durante o exame de qualificação.

Ao Engenheiro Agrônomo Nelci Salbego pelo empréstimo da área experimental no município de São Francisco de Assis – RS.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

À FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) de Santa Maria – RS, pelas sementes doadas e auxílio técnico.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agrobiologia), pela doação das estirpes de rizóbio.

Ao Laboratorista Antonio Carlos Bassaco pela sua humildade, simplicidade e vontade de colaborar em qualquer circunstância.

À banca examinadora deste trabalho, composta pelos professores João Kaminski, Zaida Inês Antonioli, Danilo Rheinheimer dos Santos, Eliane Maria Ribeiro da Silva, Júlio César Pires Santos, pelas considerações e sugestões.

Aos bolsistas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Biologia do Solo, pelos momentos de trabalho, amizade e diversão, em especial à Eduardo Lorensi de Souza, Rafael Goulart Machado, Carlos Mora Júnior, Manoeli Lupatini, Lineu Leal Trindade, Daniela Andreazza, Matheus Padoin Pontelli, Kátia Anacleto Messa e Janete Baumgardt.

À amiga Lílian Castilho dos Santos, pelo ombro amigo, apoio, companheirismo e incentivo em todos os momentos difíceis da minha vida.

Aos amigos de curso Ricardo Bemfica Steffen, Rodrigo Ferreira da Silva, Gustavo Brunetto, Gersa Pauli Kist, Marcos Roberto Stroschein, André Hubner e Anelise Vicentini Kuss, pelas sugestões ao trabalho, discussões, grupo de estudos e verdadeiro companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Solos e do PPGCS, especialmente a Luis Finamor, Flávio Vieira da Silva, Tarcísio Durgante Uberti, Gladis Eva Ubert, e Rose, pela ajuda nos momentos de dificuldade, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Vinicius Ventura Alves, pelo companheirismo, apoio, e ombro amigo.

Aos amigos, de longe e de perto, pelo ombro amigo, apoio, companheirismo e incentivo em todos os momentos, em especial à Maria Mônica Jaborandy e Michela Braga.

Enfim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado, me incentivando e me dando força, porque quem chega onde estou chegando nunca chega sozinho.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria.

OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii*

AUTORA: ANDRÉA HENTZ DE MELLO

ORIENTADOR: JOÃO KAMINSKI

Data e local da defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2006.

Na produção de mudas de espécies florestais de qualidade, é indispensável que se tenha um adequado substrato, com boa estrutura, consistência, alta porosidade, alta capacidade de retenção e fornecimento de nutrientes e de água, e que sejam inoculados com fungos micorrízicos. O *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii* têm a capacidade de formar simbiose com fungos ectomicorrízicos (fECMs), que auxiliam o crescimento das plantas através do aumento na absorção de nutrientes e água, conferindo também maior resistência aos patógenos da raiz e às condições ambientais adversas. Este estudo teve como objetivos: a) selecionar, isolar, multiplicar e identificar a nível morfológico e/ou molecular, isolados de fECMs e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) de áreas com solos quartzarênicos para inoculação de mudas de *Eucalyptus grandis* Hillex Maiden e *Acacia mearnsii* De Wild; b) determinar a dose de fósforo que permitisse compatibilizar um incremento no crescimento das mudas com uma máxima colonização micorrízica; c) estudar o estoque de fósforo nas mudas de *E. grandis* produzidas em diferentes substratos. Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo Dr. Marcos Rubens Fries do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Santa Maria, na casa de vegetação do Departamento de Solos e no município de São Francisco de Assis - RS, em área arenizada. As espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) encontradas na área foram *Acaulospora scrobiculata* Trappe, *Gigaspora margarita* Becker & Hall; *Glomus clarum* Nicolson & Schenck; *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann; *Scutellospora heterogama* Nicolson & Gerdemann. As espécies de fECMs encontradas foram *Pisolithus sp* Alb. & Schwein; *oderma sp* (Person) Fries e *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Mossee) Comm. O isolado

Scleroderma UFSMScl1 foi caracterizado a nível morfológico e molecular. A *Acacia mearnsii*, foi colonizada pelos FMAs mesmo nos substratos com alto nível de fósforo, e as espécies de FMAs eficientes em sua colonização foram *G. clarum* e *G. etunicatum*, caracterizando-se como uma espécie de leguminosa com dependência micorrízica intermediária. Para o *E. grandis*, a inoculação com *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt 116), foi eficiente para o desenvolvimento das mudas, sendo que a eficiência desse isolado tende a ser maior em menores doses de P adicionado. No campo, as mudas produzidas com o fungo UFSC-Pt 116, apresentaram a maior sobrevivência, bem como maior crescimento em altura e diâmetro em relação às mudas que não receberam o inoculante. Este estudo comprova o potencial dos fungos micorrízicos na produção de mudas de qualidade de *E. grandis* e *A. mearnsii*.

Palavras-chave: areais, substrato, doses de fósforo e fungos micorrízicos.

ABSTRACT

Thesis in Soil Science
Post-Graduation Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Occurrence, characterization and efficiency of the mycorrhizal fungi in *Eucalyptus grandis* and *Acacia mearnsii*

AUTHOR: ANDRÉA HENTZ DE MELLO

ADVISER: JOÃO KAMINSKI

Place and date of the defense: Santa Maria, August 29, 2006.

It is essential that the quality of seedlings production in the forest species has an appropriate substrate, with good structure, consistency, high porosity, high capacity of nutrition and water retention and inoculated by mycorrhizal fungi. The *Eucalyptus grandis* and *Acacia mearnsii* show the capacity to form symbiosis with ectomycorrhizal fungi (fECMs), which help the plant growth by increasing the water and nutritive absorption, that result in prevention of root diseases and survival in different environmental conditions. This study was evaluated with the aims: a) to select, to isolate, to multiply and to identify at morphological and/or molecular level the ectomycorrhizal fungi and arbuscular mycorrhizal fungi (FMAs) from quartzipsament soil to using in seedlings inoculation of *E. grandis* and *A. mearnsii*; b) to determine the phosphorus level that to allow compatibility in increasing of seedlings growing with the maximum mycorrhizal association; and c) to study the stock of phosphorus in the seedlings of *E. grandis* produced in different substrates. The studies were carried out in the Biology and Microbiology Laboratory of Prof. Marcos Rubens Fries, in Soil Science Department, Federal University of Santa Maria, and in greenhouse conditions at Soil Science Department, in the São Francisco de Assis city, Rio Grande do Sul state, in sandy soil. The arbuscular mycorrhizal fungi (FMAs) found in the area were *Acaulospora scrobiculata* Trappe, *Gigaspora margarita* Becker & Hall; *Glomus clarum* Nicolson & Schenck; *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann; *Scutellospora heterogama* Nicolson & Gerdemann. The species fECMs found were *Pisolithus* sp. Alb. & Schwein; *Scleroderma* sp. (Person) Fries and *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Mossee) Comm. The *Scleroderma* sp. UFSMSc1 was studied at morphological and molecular level. The *Acacia mearnsii* showed mycorrhizal colonization by FMAs in the substrates with high phosphorus level, and the

species of FMAs most efficient were *G. clarum* and *G. etunicatum*. It was characterized this leguminous plant with intermediary mycorrhizal dependence. For the *E. grandis*, the inoculation with *P. microcarpus* (UFSC-Pt 116) was efficient for the seedlings production because this isolated could be adapted in less P level added in the substrate. In the field, the seedlings produced with the *P. microcarpus* UFSC-Pt 116 showed the highest survive, growth in height and diameter in relation to the non-inoculated seedlings. This study proves that the potential of mycorrhizal fungi in the quality of seedlings production of *E. grandis* and *A. mearnsii*.

Key words: sandy soil, substrate, level of phosphour, mycorrhizal fungi

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Teores de fósforo (P) e pH das áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8), onde foram coletados solo, raízes e corpos de frutificação de fungos ectomicorrízicos.....	34
TABELA 1.2 - Número médio de esporos micorrízicos arbusculares em 50 g de solo, encontrados nas áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8) na identificação direta de solo (ID) e identificação indireta (II) em cultivo de <i>Brachiaria brizantha</i> em casa de vegetação. (Média de 10 repetições de cada área).....	34
TABELA 1.3 - Número médio de esporos de espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontrados nas áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3), e cultivo de eucalipto 8 anos (E8), na identificação direta do solo (ID) e identificação indireta (II) em cultivo de <i>Brachiaria brizantha</i> em casa de vegetação.....	37
TABELA 1.4 - Número de carpóforos de fungos ectomicorrízicos encontrados em cada parcela de cada área sujeita a arenização, Abundância relativa das espécies (ABR), Frequência espacial relativa (FER) e Importância relativa (IMR) de cada espécie.....	39
TABELA 2 – Características químicas dos substratos comerciais mecplani e turfa fértil e do Neossolo Quartzarênico utilizados na produção das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> em casa de vegetação.....	49
TABELA 2.1 – Colonização micorrízica das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	53
TABELA 2.2 - Número de esporos das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	55
TABELA 3 – Altura e diâmetro do colo de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116), no substrato turfa fértil, na presença de diferentes doses de fósforo, sob condições de casa de vegetação. (Média de 10 repetições).....	79
TABELA 3.1 – Altura e diâmetro do colo de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116), no Neossolo Quartzarênico, na presença de diferentes	

doses de fósforo, sob condições de casa de vegetação. (Média de 10 repetições).....	80
TABELA 4 – Sobrevivência nos blocos das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas em diferentes substratos e inoculadas ou não com fungo ectomicorrízico UFSC Pt 116, aos 90 dias após o plantio em São Francisco de Assis – RS.....	91
TABELA 4.1 – Altura e diâmetro das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas em diferentes substratos e inoculadas ou não com o isolado <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116, aos 90, 120 e 150 dias após o plantio em São Francisco de Assis – RS (Média de 64 mudas).....	92
TABELA 4.2 – Altura e diâmetro das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas em diferentes substratos e inoculadas ou não com o isolado <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116, aos 270, 330 e 360 dias após o plantio em São Francisco de Assis – RS (Média de 64 mudas).....	93
TABELA 4.3 – Teores de nutrientes na parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> 360 dias após o plantio em São Francisco de Assis – RS.....	95
TABELA 5 - Fósforo total (Pt) na parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116 e não inoculadas, na presença de diferentes doses de fósforo, após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.....	108
TABELA 5.1 – Equações de regressão lineares ajustadas para o fósforo total (Pt) acumulado, na parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas e não inoculadas com o isolado UFSC Pt 116, na presença de diferentes doses de fósforo, após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.....	108
TABELA 5.2 – Doses de fósforo estimadas para proporcionar 90% da produção máxima de matéria seca da parte aérea, fósforo total (Pt) absorvido e coeficiente de utilização das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas e não inoculadas com com o isolado <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116, na presença de diferentes doses de fósforo após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.....	109
TABELA 5.3 – Concentração de fósforo acumulado na parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com o isolado <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116, na presença de diferentes doses de fósforo, após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.....	109
TABELA 5.4 – Equações de regressão lineares ajustadas para as frações de fósforo inorgânico (Pi) e fósforo total solúvel em ácido (Pts) e fósforo total (Pt) das mudas de	

Eucalyptus grandis inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt116..... 110

TABELA 5.5 – Concentrações críticas de diferentes frações de fósforo na parte aérea mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, e valor percentual do fósforo inorgânico (Pi) em relação ao fósforo solúvel (Pts).....110

TABELA 6 – Organismos, código do isolado, origem e número de acesso dos isolados de fungos ectomicorrízicos utilizados na comparação da similaridade genética.....124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Bosque de Eucalipto 3 e 8 anos em São Francisco de Assis – RS, onde as amostras de solo, raízes e corpos de frutificação de fungos ectomicorrízicos foram coletados.....	31
FIGURA 1.2 - Cultivo armadilha de <i>Brachiaria brizantha</i> em casa de vegetação para multiplicação e identificação indireta dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares.....	32
FIGURA 1.3 - Carpóforos de fungos ectomicorrízicos encontrados nas áreas de cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8) e que foram isolados e identificados morfológicamente.....	33
FIGURA 1.4 - Percentual de colonização micorrízica das raízes da <i>Brachiaria brizantha</i> cultivadas em solos provenientes da área de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8), de São Francisco de Assis, RS.	35
FIGURA 1.5 - Esporos de fungos micorrízicos arbusculares encontrados nas áreas de Campo Nativo (CN), cultivo de Eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de Eucalipto 8 anos (E8), em São Francisco de Assis – RS.....	36
FIGURA 2 – Mudanças de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares <i>Glomus clarum</i> e <i>Glomus etunicatum</i> aos 30 dias após a germinação em casa de vegetação.....	48
FIGURA 2.1 – Altura das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> aos 120 dias após a germinação micorrizadas ou não com FMAs em diferentes doses de P. Micorrizada: $Y = 3,34 - 0,023X + 1,055X^{0,5}$; $R^2 = 0,99$, Não micorrizada: $Y = 2,12 + 0,012X$; $R^2 = 1,00$. Ambos os ajustes são significativos ($P < 0,01$).....	51
FIGURA 2.2 – Raízes de <i>Acacia mearnsii</i> colonizadas com isolados de <i>Glomus clarum</i> e <i>Glomus etunicatum</i>	54
FIGURA 2.3 – Diâmetro das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	56

FIGURA 2.4 - Número de nódulos das mudas de de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	57
FIGURA 2.5 – Peso da parte aérea seca das mudas de de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	58
FIGURA 2.6 – Teores de fósforo acumulado na parte aérea das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	59
FIGURA 2.7 – Teores de cálcio (Ca) das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	60
FIGURA 2.8 – Teores de nitrogênio (N) das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	61
FIGURA 2.9 – Teores de potássio (K) das mudas de <i>Acacia mearnsii</i> inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).....	62
FIGURA 3 – Inóculo de <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116, crescido em substrato sólido, turfa e vermiculita e meio de cultura em estufa à 25° C por 90 dias.....	72
FIGURA 3.1 – Mudanças de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) aos 120 dias após a inoculação em casa de vegetação.....	73
FIGURA 3.2 – Relação entre a dose de P adicionado e a percentagem de colonização de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com o isolado <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116, sob condições de casa de vegetação no substrato turfa fértil.....	76
FIGURA 3.3 - Relação entre a dose de P adicionado e a percentagem de colonização de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas com o isolado <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116, sob condições de casa de vegetação no substrato Neossolo Quartzarênico.....	78
FIGURA 4 – Disposição dos blocos e das parcelas da área experimental em São Francisco de Assis – RS.....	89

FIGURA 4.1 – Mudanças de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas ou não com o isolado <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC Pt 116 aos 90 dias após o transplante no campo. São Francisco de Assis – RS.....	92
FIGURA 4.2 – Aspectos das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas ou não com fungo ectomicorrízico UFSC Pt 116 aos 360 dias após o transplante no campo. São Francisco de Assis – RS.....	94
FIGURA 4.3 – Colonização micorrízica das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 360 dias após o plantio em São Francisco de Assis – RS.....	95
FIGURA 5 - Mudanças de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas ou não com <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) aos 120 dias após a germinação em casa de vegetação.....	105
FIGURA 6 – Isolados de <i>Scleroderma</i> sp (UFSM Sc1) mantidos em meio de cultura MNM – Modificado para a produção do inóculo.....	120
FIGURA 6.1 – Preparo das amostras para a extração do DNA do isolado <i>Scleroderma</i> sp (UFSM Sc1).....	122
FIGURA 6.2 – Organização esquemática da região do rDNA com ITS usada neste estudo.....	122
FIGURA 6.3 – Gel de agarose 1% do DNA genômico do micélio fresco do fungo <i>Scleroderma</i> sp. Isolado UFSC Sc1. M: marcador molecular 1Kb (Gibco – BRL); linha A, B, C, D, E e F. DNA extraído do micélio do fungo; Linha G: controle. Santa Maria, RS, 2006.....	126
FIGURA 6.4 – Gel de agarose 1% do Fragmento de amplificação do PCR com os primers ITS1 e ITS4 do isolado UFSM Sc1. (M) Marcador molecular 1 Kb Plus DNA ladder, Gibco Cat.No. 10787-018, (A e B) amostra contendo o do isolado UFSM Sc1, (C e D) Amostra controle. Santa Maria, RS, 2006.....	126
FIGURA 6.5 – Sequência molecular do isolado <i>Scleroderma</i> UFSM Sc1.....	127
FIGURA 6.6 – Múltiplo alinhamento das seqüências da região do ITS de <i>Scleroderma</i> sp. UFSM Sc1 oriundo de cultivo de eucalipto de 8 anos no município de São Francisco de Assis. Ponto “.” Indica que o nucleotídeo é igual à seqüência majoritária (consensus). Cada “-” representa uma inserção ou deleção de nucleotídeo.....	129
FIGURA 6.7 – Dendograma das distâncias genéticas entre <i>Scleroderma</i> sp (UFSMSc1) e <i>Scleroderma bovista</i> do NCBI, número de acesso AB099901 = AB211267 = DQ = 437705; e do <i>Pisolithus tinctorius</i> (UFSC Pt 22), número de acesso AF374704; <i>Pisolithus tinctorius</i>	

(UFSC Pt 44), número de acesso AF374701; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 26), número AF374699; *Pisolithus tinctorius* (UFSC 132), número de acesso AF374704; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 25), número de acesso AF 374698; *Pisolithus tinctorius* (UFSC 441), número de acesso AF374696; *Pisolithus tinctorius* (UFSC 145), número de acesso AB374705; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 27), número de acesso AF374700; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 23); número de acesso AF374697; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 49), número de acesso AF374702 e do *Pisolithus tinctorius* (UFSC 116), número de acesso AF374703.....130

SUMÁRIO

1 HIPÓTESES.....	22
2 INTRODUÇÃO GERAL.....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 1 - FUNGOS ARBUSCULARES E ECTOMICORRÍZICOS EM ÁREAS DE CULTIVO DE EUCALIPTO E DE CAMPO NATIVO EM SOLO ARENOSO.....	28
1 RESUMO.....	28
2 INTRODUÇÃO.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5 CONCLUSÕES.....	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPITULO 2 - PRODUÇÃO DE MUDAS DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD INOCULADA COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM DIFERENTES SUBSTRATOS.....	45
1 RESUMO.....	45
2 INTRODUÇÃO.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5 CONCLUSÕES.....	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE MUDAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> INOCULADAS COM <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC PT 116) EM DIFERENTES DOSES DE FÓSFORO.....	68
1 RESUMO.....	68
2 INTRODUÇÃO.....	69
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.1 Isolados de fungos ectomicorrízicos.....	71
3.2 Produção de inoculo de fungos ectomicorrízicos.....	71
3.3 Substrato de plantio das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i>	72
3.4 Fósforo.....	72
3.5 Sementes.....	73
3.6 Montagem e condução do experimento.....	73

3.7 Avaliação da colonização micorrízica, altura e diâmetro das mudas inoculadas com fungos ectomicorrízicos.....	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4.1 Avaliação das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas na casa de vegetação da UFSM, em diferentes substratos e doses de P e inoculadas com fungos ectomicorrízicos.....	75
4.1.1 Colonização micorrízica das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas no substrato turfa fértil	75
4.1.2 Colonização micorrízica das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas no Neossolo Quartzarênico.....	77
4.1.3 Altura e diâmetro das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas no substrato turfa fértil.....	79
4.1.4 Altura e diâmetro do caule das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> produzidas no substrato Neossolo Quartzarênico.....	80
5 CONCLUSÕES.....	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CAPÍTULO 4 - ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> HILLEX MAIDEN MICORRIZADAS COM <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) EM SOLO SUJEITO A ARENIZAÇÃO.....	85
1 RESUMO.....	85
2 INTRODUÇÃO.....	86
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
5 CONCLUSÕES.....	97
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
CAPÍTULO 5 - ESTOQUE DE FÓSFORO EM MUDAS MICORRIZADAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> HILLEX MAIDEN.....	99
1 RESUMO.....	99
2 INTRODUÇÃO.....	100
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	104
3.1 Preparação do substrato de plantio das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i>	104
3.2 Fósforo.....	104
3.3 Sementes.....	104

3.4 Montagem e condução do experimento.....	104
3.5 Avaliação.....	105
3.6 Extração do fósforo através do ácido perclórico (HClO ₄).....	106
3.7 Análise Estatística.....	106
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
5 CONCLUSÕES.....	113
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
CAPÍTULO 6 - CARACTERIZAÇÃO DO ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS) DO DNA RIBOSSÔMICO DO ISOLADO <i>Scleroderma</i> sp UFSM Sc1.....	117
1 RESUMO.....	117
2 INTRODUÇÃO.....	118
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	120
3.1 Obtenção e manutenção dos fungos ectomicorrízicos.....	120
3.2 Extração de DNA.....	120
3.3 Reação de PCR.....	122
3.4 Purificação e sequenciamento de DNA.....	123
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	125
5 CONCLUSÕES.....	132
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
4 CONCLUSÃO GERAL.....	135

HIPÓTESES

- O uso de diferentes substratos para a produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii*, poderá minimizar o estresse e favorecer o índice de “pega” e o estabelecimento das mudas.
- A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos (MAs/ECMs) irá permitir que as mudas, se tornem aptas para se desenvolverem em áreas arenizadas.
- A adição de fósforo no substrato poderá melhorar o arranque inicial das mudas, elevando os níveis de P metabólico das plantas, favorecendo as condições nutricionais, sem impedir a colonização micorrízica.
- A eficiência de utilização do P pela planta é dependente do estoque de P metabólico e de P vacuolar (não metabólico).

2 INTRODUÇÃO GERAL

O setor florestal brasileiro é constituído pelas indústrias de papel e celulose, carvão vegetal, madeira serrada, chapas, aglomerados, resinas e óleos essenciais. Esse setor é responsável por dois milhões de empregos diretos e indiretos, sendo de destacar que, nesse conjunto, o manejo de florestas plantadas alcança 25% do total (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2000). A madeira, matéria prima utilizada pelo setor florestal, é obtida normalmente, a partir de plantios homogêneos realizados com espécies de eucalipto, pinus e acacia.

A elevada utilização do eucalipto nos reflorestamentos ocorre devido a sua diversidade de espécies, adaptabilidade em várias regiões e climas e seu potencial de produção, pois contribui para diminuir a pressão e desmatamento das áreas de preservação e reservas legais de matas nativas e também auxilia na captura de dióxido de carbono na atmosfera, diminuindo o efeito estufa (GARAY et al., 2004).

A *Acacia mearnsii* (acácia negra) é uma importante espécie exótica cultivada no Estado do Rio Grande do Sul, juntamente com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (HIGA et al., 1998), pois fornece casca para produção de tanino (CALDEIRA et al., 2002). Pode também ser considerada uma recuperadora de solos, por se tratar de leguminosa com capacidade de reposição de nitrogênio até cerca de 200 Kg de N ha⁻¹ ano⁻¹, além de contribuir na formação de cobertura florestal e apresentar capacidade de formar simbiose com micorrizas arbusculares e ectomicorrizas (MOREIRA & SIQUEIRA 2002).

Os reflorestamentos no Brasil têm se concentrado em solos com baixas reservas de nutrientes e ácidos. Nestes solos, a deficiência de fósforo tem sido menor do que a de potássio e boro, (BELLOTE & FERREIRA (1993); SILVEIRA et al., 1995a, 1995b, 1999, 2001, 2002 e 2003) e SGARBI & SILVEIRA (2001). No entanto, considerando a baixa fertilidade dos solos, a aplicação de fósforo tem sido essencial para o aumento e manutenção da produtividade das florestas implantadas, bem como associações biológicas com micorrizas, que podem potencializar o aproveitamento do pouco fósforo disponível nestas áreas.

Estas áreas arenosas, desprovidas de vegetação, são depósitos areníticos inconsolidados, e retrabalhados sob os processos característicos do clima atual (AZEVEDO & KAMINSKI, 1999). Estes solos apresentam dificuldades na retenção de água e de nutrientes, fatores estes, que dificultam a manutenção e desenvolvimento da vegetação nessas

áreas. Para isso é importante que algumas medidas sejam tomadas para se aumentar a eficiência do estabelecimento de mudas de espécies florestais de qualidade.

Algumas espécies de plantas, como o eucalipto e a acacia negra, têm a capacidade de formar simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e ectomicorrízicos (ECMs), que aumentam a retenção de água e nutrientes, principalmente P, pelas plantas, proporcionando sucesso no estabelecimento da vegetação.

Os fECMs aumentam a área de solo explorada pelas raízes na captura e fornecimento de água e de nutrientes, principalmente do fósforo (P), através do prolongamento das hifas no solo e da modificação da arquitetura das raízes (BRUNDRETT, 1996). Trabalhos têm demonstrado que esses fungos são capazes de disponibilizar o P presente em formas pouco solúveis, através da produção de fosfatases e ácidos orgânicos. Além disso, os fECMs são capazes de sintetizar hormônios de crescimento, como ácido indol acético e precursores de giberilinas, e substâncias antibióticas como polifenóis, que por sua vez, conferem proteção ao sistema radicular contra patógenos.

No entanto, os mecanismos utilizados pelos fECMs, no alcance desses benefícios, variam em nível interespecíficos e intraespecíficos, sendo necessário um processo de seleção para identificar os melhores fungos para a espécie hospedeira de interesse. Devido a essas diferenças entre os mecanismos de atuação e da eficiência dos isolados, estudos são necessários para identificar os fungos mais eficientes na promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* e de *Acacia mearnsii*.

O estabelecimento da associação micorrízica nestas culturas são pouco conhecidas, e assim, a seleção de FMAs e ECMs eficientes na promoção do crescimento de mudas de eucalipto e acacia apresenta-se como uma alternativa biotecnológica capaz de promoverem ganhos na produção e aumento da oferta de madeira, através de produção e uso de inoculantes em programas de controle de micorrização para reflorestamentos. Além disso, pode auxiliar na redução de uso de fertilizantes fosfatados solúveis nos viveiros e no campo.

Embora o P seja um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, suas concentrações, no substrato ou no solo, podem limitar ou inibir a colonização micorrízica. Nesse sentido, é necessário determinar uma dose adequada para compatibilizar uma máxima colonização pelos FMAs e ECMs com uma boa reserva do nutriente para o arranque inicial do crescimento das mudas.

Neste contexto, foi conduzido o presente estudo, o qual foi dividido em etapas. Na primeira isolou-se, multiplicou-se e identificou-se morfológicamente e molecularmente espécies de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos presentes em área de

arenização, mais especificamente no município de São Francisco de Assis-RS. Em seguida, determinou-se a dose de P mais adequada e tipo de substrato e espécie de fungos micorrízicos para conciliar maior taxa de colonização micorrízica e crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii* em casa de vegetação e no campo.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, A.C.; KAMINSKI, J. Considerações sobre os solos dos campos de areia no Rio Grande do Sul. **Ciência & Ambiente**. v.1.n.1. p.65-70. 1990.

BELLOTE, A.F.J.; FERREIRA, C.A. Nutrientes minerais e crescimento de árvores adubadas de *Eucalyptus grandis*, na região do cerrado, no Estado de São Paulo. **Boletim Pesquisa Florestal**. n.26/27, p.17-28.1993.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra:ACIAR, 374p. 1996 (monograph, 32).

CALDEIRA, M.V.W.; RONDON NETO, R.M.; SCHUMACHER, M.V. Avaliação da eficiência nutricional de três procedências australianas de acacia negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Revista Arvore**. v.26, n.5, p.615-620, 2002.

GARAY, I.; PELLENS, R.; KINDEL,A.; BARROS, E.; FRANCO, A. Evaluation of soil conditions in fast-growing plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in Brazil: a contribution to the study of sustainable land use. **Applied Soil Ecology**. v.27. p.177-187. 2004.

HIGA, A.R. Desarrollo de sistemas de producción para acacia negra (*Acacia mearnsii* De Wild). In: Congresso Latino Americano IUFRO. Valdivia: IUFRO. **O manejo sustentable de los recursos forestales, desafío del siglo XXI**. Congresso. 1998.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 626p, 2002.

SILVEIRA, R.L.V.A.; ARAÚJO, E.F.; SOUZA, A.J. Avaliação do estado nutricional de povoamentos de *Eucalyptus* pelo método do nível crítico e DRIS. **Relatório de pesquisa da Bahia Sul Celulose**. 82p.2001.

SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N.; SILVEIRA, R.I.; BRANCO, E.F. Levantamento nutricional de florestas de *E. grandis* da região de Itatinga – SP. II. Micronutrientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Viçosa, 1995a. **Resumos expandidos**, Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1995a. p.899-901.

SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N.; SILVEIRA, R.I.; BRANCO, E.F. Levantamento nutricional de florestas de *E. grandis* da região de Itatinga-SP. I. Macronutrientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Viçosa, 1995b. **Resumos expandidos**, Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1995b.p.896-898.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N.; ANDRADE, T.A. Monitoramento nutricional do clone C219 na unidade de Luiz Antônio. Relatório de pesquisa da Votorantim Celulose e Papel, 13p. 2003.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N.; MOREIRA, A. Monitoramento Nutricional na Lwarcel. Relatório de Assessoria e Pesquisa. 62p.1999.

SILVEIRA, R.L.V.A.; SILVEIRA, R.I.; HIGASHI, E.N. Monitoramento nutricional nos povoamentos de Eucalyptus pelos métodos do nível crítico e DRIS. Relatório de pesquisa da Eucatex. 29p.2002.

SBS. SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA Site acessado em julho de 2006.
www.sbs.org.br

SGARBI, F.; SILVEIRA, R.L.V.A. Monitoramento nutricional e da fertilidade do solo em plantios de eucalipto na Votorantim Celulose e Papel, no sul do estado de São Paulo. Relatório de pesquisa da Votorantim Celulose e Papel.43p.2001.

CAPÍTULO 1 - FUNGOS ARBUSCULARES E ECTOMICORRÍZICOS EM ÁREAS DE EUCALIPTO E CAMPO NATIVO EM SOLO ARENOSO

1 RESUMO

O *Eucalyptus grandis* Hillex Maiden forma associações simbióticas com fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos. Com o objetivo de avaliar a população e a diversidade destes microrganismos nesta espécie florestal em áreas sujeitas à arenização, verificar se estes microrganismos podem ser utilizados em programas de recuperação destas áreas, e verificar qual o método mais adequado para a identificação dos gêneros e espécies dos fungos micorrízicos, amostras de solo e raízes de três áreas, (campo nativo, cultivo de eucalipto 3 anos e cultivo de eucalipto 8 anos), foram coletadas para identificação direta e indireta de fungos micorrízicos arbusculares. Corpos de frutificação de ectomicorrizas também foram coletados nas três áreas. O levantamento prévio dos gêneros e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e ectomicorrízicos (fECMs) nas três áreas avaliadas, permitiu verificar que a população e a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em áreas sujeitas à arenização em campo nativo, na identificação direta, foi maior do que nos cultivos de eucalipto 3 e 8 anos, comprovando assim, que sistemas mais estáveis, por apresentar maior diversidade na comunidade das plantas, proporciona maior capacidade de associação para os fungos micorrízicos. O método de avaliação indireta (cultura armadilha) com *Brachiaria brizantha* foi eficiente na recuperação de inóculos de FMAs em solos arenosos, e pode ser utilizado nos programas de multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares para inoculação de mudas em viveiros. As espécies de FMAs presentes nas áreas avaliadas foram *Acaulospora scrobiculata* Trappe, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, *Glomus clarum* Nicolson & Schenck, *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann e *Scutellospora heterogama* Nicolson & Gerdemann. As espécies de fungos ectomicorrízicos que mais se destacam foram *Pisolithus* sp. Alb. & Schewein; *Scleroderma* sp. (Persoon) Fries e *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Cumm. O fungo ectomicorrízico que apresentou a maior abundância relativa foi o *Scleroderma* sp.

Palavras-chave: *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Scutellospora heterogama*, *Scleroderma* sp, *Pisolithus microcarpus*, *Pisolithus* sp.

2 INTRODUÇÃO

As micorrizas, descritas pela primeira vez por FRANK (1885), constituem-se em importante fator de sobrevivência e crescimento das plantas. São formadas pela associação de fungos especializados do solo com as raízes das plantas hospedeiras, constituindo-se num processo de co-evolução adaptativa, resultando em modificações morfofisiológicas para a planta (GARBAYE, 1990; SMITH & READ, 1997). Nessa relação mutualística, é fundamental a interação entre o fungo e a planta. Assim, as interações que ocorrem são reguladas por mecanismos moleculares permanentes, desde o reconhecimento entre os simbioss até o pleno desenvolvimento da simbiose (LAMBIAIS, 1996).

As micorrizas apresentam ampla distribuição, sendo encontradas dos pólos gelados às florestas tropicais úmidas e desertos. Estima-se que mais de 90% das plantas superiores formam micorrizas, dentre as quais, grande parte é de interesse agrícola e florestal (SYLVIA, 1998). A importância das micorrizas foi evidenciada nas primeiras tentativas de introdução de espécies vegetais fora de seus habitats naturais, e na dificuldade encontrada nos reflorestamentos de regiões de solos degradados, onde não existiam fungos compatíveis com as espécies introduzidas (MARX & CORDELL, 1989). Essa dependência ficou mais evidente quando se tentou introduzir sem sucesso espécies de Pinus e Eucalipto em outros continentes ou regiões distantes da sua ocorrência natural (VOZZO & HACSKAYLO, 1971; MIKOLA, 1973).

As micorrizas arbusculares e ectomicorrizas promovem um incremento significativo da área de absorção radicular das plantas colonizadas, maximizando o aproveitamento de água e nutrientes, como o fósforo (P), o nitrogênio (N) e o potássio (K), e alguns micronutrientes não fungistáticos (MOLINA & TRAPPE, 1984; SMITH & READ, 1997; GLOWA et al., 2003). Além disso, propiciam melhor resistência ao estresse hídrico, às temperaturas elevadas, à acidez por serem mais tolerantes à presença de Al, e maior tolerância a condições de toxidez do solo e proteção do sistema radicular contra patógenos (MARX & CORDELL, 1989; SMITH & READ, 1997). Com isso, contribuem para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas (MARX, 1991), mesmo em solos com baixos teores de nutrientes ou degradados (MARK & CORDELL, 1989), como os que ocorrem em algumas áreas localizadas na região central do Rio Grande do Sul.

As espécies e os isolados de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos têm apresentado efeitos distintos com relação ao aumento na absorção de nutrientes e no crescimento das plantas (SANDERS et al., 1977) e na capacidade de colonização.

O eucalipto tem a característica de associar-se a fungos ectomicorrízicos e arbusculares, sendo que as associações com fungos ectomicorrízicos são as mais estudadas atualmente. Santos et al. (2001), em estudo realizado com cinco espécies de eucalipto, incluindo *Eucalyptus cloeziana*, observaram uma sucessão no tipo de colonização micorrízica, sendo inicialmente dominado por fungos micorrízicos arbusculares e posteriormente por fungos ectomicorrízicos. Araújo et al. (2004) em seus estudos com fungos micorrízicos arbusculares em *Eucalyptus cloeziana* verificaram grande suscetibilidade à formação de micorriza arbuscular.

Amorim (1988), trabalhando com mudas de *Eucalyptus grandis* em Latossolo Vermelho-Amarelo álico, inoculados com fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos, constatou que não houve diferença entre as mudas inoculadas com *Scutelospora heterogama*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus macrocarpum* e *Glomus fasciculatum* e as não inoculadas. No entanto, SANTOS (1995) detectou que a micorrização em *Eucalyptus camaldulensis* minimizou os efeitos da compactação do solo e proporcionou maior eficiência na absorção de fósforo.

De modo geral, a atividade dos fungos micorrízicos e a associação com as raízes de plantas superiores durante o ano não é uniforme, porque estão sujeitas a variações nas condições de temperatura, umidade, matéria orgânica do solo, fósforo, nitrogênio, pH e aeração do solo, além de práticas de manejo e procedimentos efetuados durante a formação de mudas. Por outro lado, as variações nos tipos de solo e na vegetação nativa e introduzida, podem favorecer o domínio de algumas espécies em relação às outras, comprometendo ou facilitando a diversidade dos gêneros e/ou espécies dos fungos micorrízicos.

Os efeitos destes fatores para o sucesso dos processos de formação das micorrizas em essências florestais, ainda são pouco estudados, especialmente em eucalipto. Assim, a caracterização de fungos micorrízicos em áreas de plantio de *Eucalyptus grandis* é importante para o estudo da incidência das espécies fúngicas que poderão ser úteis em futuros programas de inoculação, bem como no estudo das relações ecológicas entre o fungo simbiote e a planta hospedeira.

Os objetivos deste trabalho foram: a) avaliar a população e a diversidade de fungos micorrízicos em povoamento de eucalipto e áreas de campos naturais ocorrentes em Neossolo Quartzarênico no município de São Francisco de Assis – RS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal de Santa Maria, e no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo Dr. Marcos Rubens Fries do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Santa Maria.

As amostras de solo para identificação das micorrizas arbusculares, raízes e corpos de frutificação de fungos ectomicorrízicos foram coletadas em julho de 2003 em três diferentes áreas sujeitas ao processo de arenização: campo nativo (CN), cultivo de eucalipto de 3 anos (E3), e cultivo de eucalipto de 8 anos (E8), localizadas no Município de São Francisco de Assis, região oeste do RS (Figura 1).



Figura 1 - Bosque de Eucalipto com 3 e 8 anos no Município de São Francisco de Assis – RS, onde as amostras de solo, raízes e corpos de frutificação de fungos ectomicorrízicos foram coletados.

O processo de identificação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) constou de duas etapas, uma caracterizada como identificação direta (ID) e outra como identificação indireta (II). Na identificação direta, efetuou-se a extração de esporos pelo método de peneiramento úmido (GERDEMANN & NICHOLSON, 1963) e centrifugação em sacarose (JENKINS, 1964).

O procedimento de extração de esporos de FMAs do solo, foi feito a partir de uma amostra de solo, composta de 10 sub-amostras coletadas na profundidade de 0-20 cm. Desta amostra composta de solo, foi retirada uma amostra de 50 g, a partir da qual foi realizada a contagem dos esporos. Em seguida, os esporos, foram preparados em lâminas e identificados segundo suas características morfológicas (SCHENCK & PÉREZ, 1987 e INVAM, 2001).

Estes esporos foram os da identificação direta de FMAs. Deste solo determinou-se os teores de fósforo e pH (Tabela 1), segundo a metodologia descrita por TEDESCO (1995).

Outra parte do solo, foi utilizada para identificação indireta dos FMAs. Instalou-se em casa de vegetação, um cultivo armadilha com *Brachiaria brizantha* (Figura 1.2), com o objetivo de recuperação das espécies de fungos, que não estavam esporulados no momento da coleta.

As unidades experimentais foram vasos de 1000 g de capacidade, nos quais, foi colocado no fundo uma camada de aproximadamente 2 cm de areia autoclavada, e sobre esta camada, 500 g de Neossolo Quartzarênico, e novamente uma camada de 2 cm de areia autoclavada, para isolar o solo de possíveis contaminações externas. Em seguida, o solo foi semeado com *Brachiaria brizantha*, utilizando-se uma alta densidade de semeadura, visando forçar o desenvolvimento do sistema radicular.



Figura 1.2 - Cultivo armadilha com *Brachiaria brizantha* em casa de vegetação para multiplicação e identificação indireta dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares.

Aplicou-se quinzenalmente 20 mL de solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada por JARSTFER E SYLVIA (1992).

Após 4 meses, coletou-se uma amostra de 50 g de solo para a extração de esporos de FMAs, seguindo-se o método de GERDEMANN & NICOLSON (1963). Os esporos foram identificados de acordo com suas características morfológicas (SCHENCK & PÉREZ, 1987; INVAM, 2001), e determinou-se o índice de diversidade de espécies das áreas avaliadas. Para a determinação da diversidade, utilizou-se o Índice de Diversidade de Shannon (CLIFFORD & STEPHENSON, 1975).

Na avaliação da colonização micorrízica, as raízes foram clarificadas e coradas, segundo a metodologia de KOSKE & GEMMA (1989) e GRACE & STRIBLEY (1991). A

porcentagem do comprimento de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada descrito no trabalho de GIOVANETTI & MOSSE (1980), adaptado à partir do método de medidas de comprimento de raízes de NEWMAN (1966).

A coleta dos carpóforos de fungos ectomicorrízicos, foi com auxílio de pá para remoção da serrapilheira. Em cada cultivo de *Eucalyptus grandis* existente na área de estudo, foram demarcadas 3 áreas de 10.000 m², subdivididas em 5 sub-áreas de 2000 m², onde foram coletados todos os carpóforos. Os carpóforos foram armazenados em sacos de papel identificados e levados ao laboratório, para isolamento e identificação (Figura 1.3).



Figura 1.3 - Carpóforos de fungos ectomicorrízicos encontrados nas áreas de cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8) e que foram isolados e identificados morfológicamente.

A identificação morfológica dos fungos ectomicorrízicos foi proposta com observação das características dos carpóforos e dos critérios das chaves de classificação conforme TRAPPE (1962), STUNTZ (1980) e SMITH & THEIRS (1971). A identificação das espécies só foi possível quando se obtiveram corpos fúngicos e frutificação madura.

O número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares e a colonização micorrízica foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey 5%, utilizando-se os procedimentos disponíveis no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

A abundância relativa das espécies de fungos ectomicorrízicos (Abr) foi definida como $Abr = (Abm/Abmt) \times 100$, onde Abm representa o número de carpóforos encontrados em cada sub área e Abmt o número total de carpóforos encontrados em toda área. Em seguida a frequência espacial relativa (Fer), definida como $Fer = (Fem/Femt) \times 100$, onde Fem representa o número de sub áreas nas quais cada espécie foi encontrada e Femt representa o número total de sub áreas onde foi encontrado qualquer carpóforo desse gênero. Com base nestes dois resultados, foi calculada a importância relativa (Irm) de cada espécie, através da fórmula $Irm = Abr + Fer$. (NANTEL & NEUMANN, 1992).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O solo das áreas de coleta de esporos de fungos micorrízicos arbusculares, raízes de *Eucalyptus grandis* e corpo de frutificação dos fungos ectomicorrízicos, é ácido e a disponibilidade de fósforo é muito baixa (Tabela 1).

Tabela 1 - Teores de fósforo (P) e pH das áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8), onde foram coletados solo, raízes e corpo de frutificação de fungos ectomicorrízicos.

	CN	E3	E8
P mg/L	8,0	5,5	6,5
pH	4,7	4,9	4,8

O número médio de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) encontrados em 50 g de solo nas três áreas avaliadas e nos diferentes métodos de identificação, foi superior na identificação indireta em relação à identificação direta (Tabela 1.2), evidenciando assim, que o método indireto foi eficiente em recuperar inóculos de fungos micorrízicos arbusculares do solo. O número de esporos foi maior nas áreas de bosque de eucalipto 3 anos, em relação às demais áreas, em ambas as identificações.

Tabela 1.2 - Número médio de esporos micorrízicos arbusculares em 50 g de solo, encontrados nas áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8) na identificação direta de solo (ID) e identificação indireta (II) em cultivo de *Brachiaria brizantha* em casa de vegetação. (Média de 10 repetições de cada área).

Área	Identificação direta (ID)	Identificação indireta (II)
Campo Nativo	25 b*	83 b
Cultivo de Eucalipto 3 anos	32 a	251 a
Cultivo de Eucalipto 8 anos	14 b	140 b

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Bellei (1987), em levantamentos realizados em florestas de eucalipto em Santa Catarina, em solos arenosos, observou que a idade da planta tem influência sobre o tipo de associação micorrízica. Inicialmente há uma alta esporulação e colonização por FMAs, e esta diminui com a idade da planta. Estes dados confirmam os encontrados neste trabalho (Tabela 1.2), onde há maior concentração de micorrizas arbusculares no cultivo de eucalipto implantado há 3 anos do que no de 8 anos.

Os fatores que condicionam o estabelecimento de cada fungo simbiote na planta e os que influenciam a sua eficiência na promoção do crescimento e da adaptabilidade da planta ao ambiente são poucos conhecidos, sendo necessária a avaliação da importância da dupla simbiose para o eucalipto (SMITH & READ, 1997). Sendo assim, os resultados aqui encontrados, podem evidenciar a preferência de alguns FMAs em colonizarem determinadas espécies de plantas, como o *Eucalyptus grandis* e a *Brachiaria brizantha* (Figura 1.4). Algumas plantas, através de seus exsudatos radiculares, podem estimular a germinação de esporos e crescimento micelial dos fungos micorrízicos arbusculares, (SIQUEIRA et al., 1986; ELIAS & SAFIR, 1987; COLOZZI-FILHO & BALOTA, 1994).

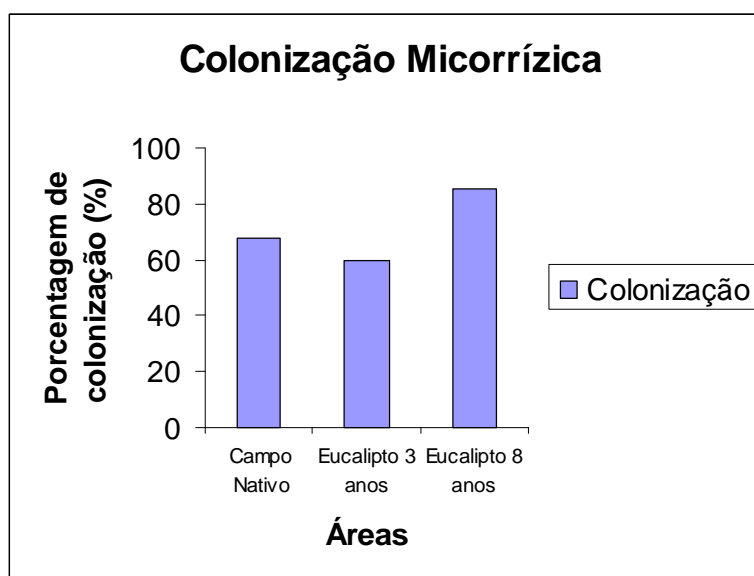


Figura 1.4 - Percentual de colonização micorrízica das raízes da *Brachiaria brizantha* cultivadas em solos provenientes da área de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de eucalipto 8 anos (E8), de São Francisco de Assis, RS.

Embora o percentual de colonização micorrízica da *Brachiaria brizantha*, cultivada no solo da área de cultivo de eucalipto 8 anos, tenha sido maior do que nas demais áreas, a produção de esporos foi menor (Figura 1.4). Este comportamento pode ser atribuído ao fato de não haver uma relação direta entre o número de esporos e colonização micorrízica. Porém, a taxa de germinação dos esporos é importante para a colonização das raízes, pois pode-se ter um grande número de esporos e estes possuem baixa taxa de germinação, e por isso haveria baixa percentagem de colonização micorrízica (SMITH & READ, 1997). A presença no solo de estruturas como hifas de fungos, pode contribuir para este comportamento. Deste modo, a área de cultivo de eucalipto 8 anos embora apresentasse menor quantidade de esporos, poderia

conter outras estruturas como hifas e micélio, que contribuiriam para o maior percentual de colonização.

A germinação dos esporos é influenciada pelo pH do meio e pode variar entre os gêneros de fungos micorrízicos arbusculares. Esse comportamento dos fungos micorrízicos arbusculares em relação ao pH do solo também foi observado neste trabalho, pois as áreas avaliadas apresentaram pH entre 4,7 e 4,9 (Tabela 1). Desta forma, considera-se que os gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* (Tabela 1.3), preferem pH entre 4,0 e 6,0, enquanto que os *Glomus* entre 6,0 a 8,0 (SILVEIRA, 1998; SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

O aumento no número de esporos, a ocorrência de outras espécies de FMAs na identificação indireta em relação à identificação direta e a colonização das raízes da *Brachiaria brizantha*, indicam que o uso do cultivo armadilha com a *Brachiaria brizantha* foi eficiente em recuperar estes fungos do solo (Tabela 1.3). Sendo assim, para programas de produção de mudas em viveiros, recomenda-se que para a inoculação dos fungos micorrízicos arbusculares, estes sejam multiplicados em culturas armadilhas (SIBINEL, 2003).

As espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (Figura 1.5) que se destacaram nas três áreas avaliadas, tanto na identificação direta quanto na indireta, foram *Glomus clarum*, *Gigaspora margarita*, *Acaulospora scrobicullata*, *Scutellospora heterogama* e *Glomus etunicatum*, sendo a mais abundante *Acaulospora scrobicullata* (Tabela 1.3).

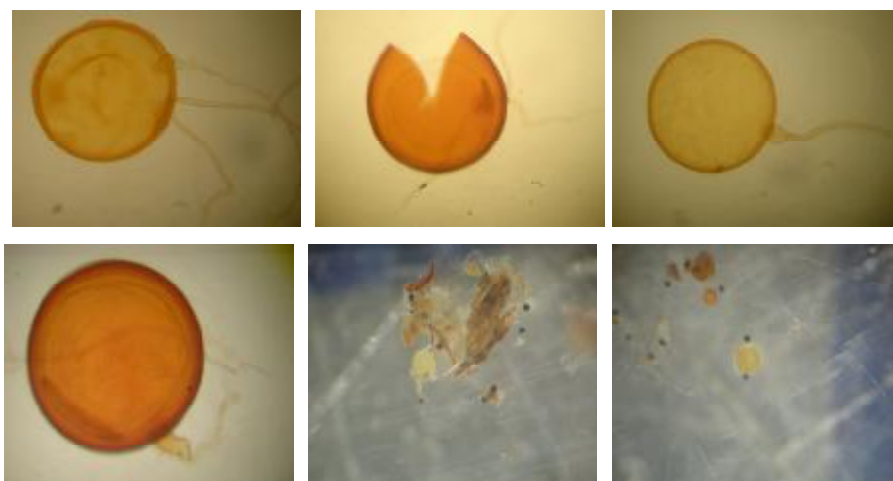


Figura 1.5 - Esporos de fungos micorrízicos arbusculares encontrados nas áreas de Campo Nativo (CN), cultivo de Eucalipto 3 anos (E3) e cultivo de Eucalipto 8 anos (E8), em São Francisco de Assis – RS.

Tabela 1.3 - Número médio de esporos de espécies de fungos micorrízicos arbusculares em 50 g de amostras de solo encontrados nas áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3), e cultivo de eucalipto 8 anos (E8), na identificação direta do solo (ID) e identificação indireta (II) em cultivo de *Brachiaria brizantha* em casa de vegetação.

FMA	CN		E3		E8	
	ID	II	ID	II	ID	II
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	10	7	0	193	22	0
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	1	0	1	4	0	0
<i>Glomus clarum</i> Nicolson & Schenck	5	1	4	19	5	10
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerdemann	5	36	0	25	5	78
<i>Scutellospora heterogama</i> Nicolson & Gerdemann	3	40	9	10	0	52
Total de espécies	5	4	3	5	3	3

O número médio de esporos de espécies de fungos micorrízicos arbusculares aqui encontrados, coincidem com os de COELHO et al (1997), que estudando a incidência de FMAs em povoamento de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, em vários municípios de Minas Gerais, verificaram a presença em maior quantidade de *Acaulospora*, *Glomus* e *Scutellospora*, sugerindo que estas espécies de FMAs possuem uma faixa de adaptação ecológica maior, em relação à diversidade de condições de solo e clima.

Na identificação direta foram encontradas cinco espécies de FMAs nas áreas de campo nativo, 3 espécies na área de cultivo de eucalipto 3 anos, e 3 espécies na área de cultivo de eucalipto 8 anos. (Tabela 1.3). Observou-se também, que na área de campo nativo, na identificação indireta, foram identificadas 4 espécies de FMAs, 5 espécies na área de eucalipto 3 anos e 3 espécies em eucalipto 8 anos, sendo que as espécies mais numerosas foram *Acaulospora scrobiculata* (193 esporos) e *Scutellospora heterogama* (52 esporos) e *Glomus etunicatum* (78 esporos) (Tabela 1.3). A presença de *Scutellospora heterogama* e da espécie de *Acaulospora scrobiculata* pode estar relacionada ao pH do solo (SIQUEIRA et al., 1984; SIQUEIRA & FRANCO, 1988; LAMBAIS & CARDOSO, 1988). Tais resultados relacionam-se com as características originais do ambiente nativo, de modo que a acidez pode limitar a distribuição e abundância das espécies de FMAs, alterando o benefício da simbiose.

Gigaspora margarita, foi encontrada em baixa quantidade tanto na identificação direta quanto na indireta em todos os cultivos. Pode-se salientar, que esta ocorrência restrita pode ser resultado da menor adaptação às condições ambientais ou de suas exigências para crescimento, estabelecimento ou indução à esporulação.

Acaulospora scrobiculata foi a espécie que mais esporulou na identificação indireta (193 esporos). ZAMBOLIN & BARROS (1982) observaram a sua predominância em povoamentos de *E. grandis*, *E. saligna* e *E. citriodora* de várias idades, crescendo em Latossolo Vermelho na região de Viçosa, MG.

Sistemas considerados mais estáveis, como o campo nativo, por apresentar maior diversidade na comunidade de plantas, proporciona maior capacidade de associação para os fungos micorrízicos. Sabe-se que a comunidade de plantas pode alterar a composição de FMAs de determinado local (SANDERS & FITTER, 1992). No entanto, a diversidade de FMAs, não segue a de plantas (ALLEN et al., 1995). Assim pode ocorrer uma abundância de FMAs na presença de poucas espécies vegetais ou vice versa.

Não houve diferença de diversidade de FMAs na identificação direta nos cultivos de eucalipto 3 e 8 anos, enquanto, que na identificação indireta, a maior diversidade foi no cultivo de eucalipto 3 anos. Este resultado, deve-se a eficiência do método indireto em recuperar os propágulos de fungos micorrízicos arbusculares, que no momento da identificação direta, não estavam viáveis. Por outro lado, sistemas de monoculturas, bem como sistemas de manejo intensivo, reduzem a quantidade e a diversidade de FMAs (SILVEIRA, 1998). Dessa forma, pode ocorrer a seleção de espécies de FMAs, de forma que a diversidade dessas áreas reduz com o tempo. Normalmente, as essências florestais, como o *Eucalyptus grandis*, são colonizadas predominantemente por fungos ectomicorrízicos e não por endomicorrizas (BELLEI & CARVALHO, 1992; LETACON et al., 1987), o que contribui para uma menor diversidade de fungos micorrízicos arbusculares nessas áreas.

Quanto às espécies de fungos ectomicorrízicos encontradas nas áreas de arenização, as que se destacaram foram *Pisolithus* sp Alb. & Schwein; *Scleroderma* sp (Person) Fries e *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Comm. (Tabela 1.4).

A abundância relativa das espécies nas áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 8 anos (E8) e cultivo de eucalipto 3 anos (E3) foi de 20%. A frequência relativa de *Pisolithus* sp, nas três áreas foi respectivamente de 20, 12 e 16%, seguida de 20, 20 e 20% do *Scleroderma* sp e de 12, 16 e 20% do *Pisolithus microcarpus*.

Tabela 1.4 - Número total de carpóforos de fungos ectomicorrízicos, abundância, frequência e importância relativa média, encontrados nas áreas de campo nativo (CN), cultivo de eucalipto 3 anos (E3), cultivo de eucalipto 8 anos (E8), São Francisco de Assis, RS.

Características	Fungos			Ectomicorrízicos					
	<i>Pisolithus</i> sp			<i>Scleroderma</i> sp			<i>Pisolithus microcarpus</i>		
	CN	E3	E8	CN	E3	E8	CN	E3	E8
Carpóforos (Total)	57	58	56	84	93	92	107	117	115
Abundância (%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Frequência (%)	20	12	16	20	20	20	12	16	20
Importância (%)	40	31	35	10	40	40	32	36	40

Pode-se observar que as maiores frequências relativa ocorreram na espécie *Scleroderma* sp. Estes dados corroboram com os descritos por GIACHINI et al. (2000), onde verificaram a presença de *Scleroderma aerolatun* colonizando as raízes do *Eucalyptus dunnii*. Esta informação é importante, visto que GUZMAN (1970) declarou que este fungo seria infrequente e raro na América do Sul. Além disso, o *Scleroderma* associa-se com várias espécies de *Pinus*.

Assim, o levantamento prévio da ocorrência de FMAs em áreas sujeitas ao processo de arenização é de fundamental importância nos trabalhos de revegetação destas áreas, uma vez que identificado as espécies mais abundantes na área, tem-se condições de isolamento e inoculação destes fungos em mudas de eucaliptos produzidas em casa de vegetação. As espécies *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*, por serem as mais abundantes, com alto potencial de colonização, serão utilizadas na produção de mudas de *Acacia mearnsii* no capítulo 2.

5 CONCLUSÕES

A área de campo natural apresenta maior população e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares do que nos cultivos de eucalipto 3 e 8 anos, porém as ectomicorrizas *Pisolithus* sp, *Scleroderam* sp e *Pisolithus microcarpus*, só ocorreram nos povoamentos de eucalipto.

Os gêneros de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) presentes nas três áreas avaliadas são *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, e *Scutellospora*. As espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Scutellospora heterogama*, foram as mais freqüentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIN, E.F.C. **Comportamento de mudas de *Eucalyptus grandis* na presença de fungos endo e ectomicorrízicos.** 1988, 95p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

ALLEN, E.B. et al. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. **Plant and Soil**, v.170, p.,47-62, 1995.

ARAÚJO, C.V.M.; ALVES, L.J.; SANTOS, O.M. Micorriza arbuscular em plantações de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no litoral norte da Bahia, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. 18 (3): 513-520, 2004.

BELLEI, M. & CARVALHO, M.S. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S. M., NEVE, M.C.P . **Microbiologia do Solo.** Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: 1992. 297-318.

BELLEI, M. **Micorrizas de *Eucalyptus* spp. em viveiros e florestas de Santa Catarina.** Florianópolis: UFSC. 1987. 54 p.

COLOZZI-FILHO, A. & BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M., ARAÚJO, R.S (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília: Embrapa-SPI. 1994. p.383-418.

COELHO, F.C.; BORGES, A.C.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F.; MYCHOVY, R.M.C. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamento de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.; nos municípios de Paraopeba, Bocaiúva e João Pinheiro, Minas Gerais. **Revista Árvore.** v.21, n.3, p.393-404, 1997.

CLIFFORD, H.T.; STEPHENSON, W. **Na introduction to numerical classification.** London Academic Press. London,1975. 148p.

ELIAS, K.S. & SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *G. fasciculatus* in response to root exudates. **Apply Environmental Microbiology.** v.53, p.1928-1933, 1987.

FERREIRA, D.F. **Sistemas de análises estatística para dados balanceados.** Lavras:UFLA/DEX/SISVAR, 2000, 145p.

FRANK, B. Uber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernahrung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. **Berichte der deustchen botanischer Gesellschaft**, v.3, p.128-145, 1985.

GARBAYE, J. Utilisation des mycorhizes em sylviculture. In : STRULLU, D.G. (Ed). **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées.** Paris: Lavoisier, p.197-248, 1990.

GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wt-sieving and decanting. **Trans.Br. Mycol. Soc**, v.46, p.235-244, 1963.

GIACHINI, A.J. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brasil. **Mycologia**, 92(6), p.1166-1177, 2000.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. A evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v.84, 489-500, 1980.

GUZMÁN, G. Monografía del genero *Scleroderma* Pers. Emend. Fr. (Fungi Basidiomycetes. **Darwiniana** 16:233-407. 1970.

GRACE, C.; STRIBLEY, D.P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v.95, n.10, p.1160-1162, 1991.

GLOWA, K.R.; AROCENA, J.M.; MASSICOTTE, H.B. Extraction of potassium and/or magnesium from selected soil minerals by *Piloderma*. **Geomicrobiology Journal**, v. 20, n.2, p.99-111, 2003.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkely, CA: University of California, (California Agricultura Experiment Station). Circular, 1951. 347 p.

INTERNATIONAL CULTURE COLLECTION OF VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI – INVAM, 2001. Disponível: em <http://invam.caf.wvu.edu/mycinfo/methods/cultures/monosp.htm>. Acesso em: 2003 e 2004.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v.48, p.692. 1964.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v.92, n.4, p.458-488, 1989.

LAMBAIS, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J.O (ed). **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas**. Lavras: UFLA-DCS E DCF, 1996. p.5-38.

LAMBAIS, M.R. & CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stilosantes guianensis* em solo ácido e distrófico. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.12, p.249-255, 1988.

LETACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of micorrizas in temperate and tropical forests. **Symbiosis**, v.3, p.179-206, 1987.

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

MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practices. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T. (eds). **Ectomycorrhizae, their ecology and physiology**. New York. 1973. p.383-411.

MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Mycorrhiza management in bareroot nurseries. In: DURYEY, M.L.; LANDIS, T.D. (eds). **Forestry nursery manual: production of bareroot seedlings**. Lancaster. p.211-213, 1984.

NANTEL, P.; NEUMANN P. Ecology of ectomycorrhizal Basidiomycete communities on a local vegetation gradient. **Ecology** v. 73. p.99-117, 1992.

NEWMAN, E.E.J.A method of estimating the total length of root sample. **Journal of Applied Ecology**, v.3, p.139-145, 1966.

SANDERS, F.E. et al. The development of endomycorrhizal roots system of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular-arbuscular endophyte. **New Phytologist**, v.78, n.2, p.257-268, 1977.

SANDERS, J.R. & FITTER, A.H. Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. **Mycological Research**, v.96, p.415-419, 1992.

SANTOS, O. M. Observações preliminares sobre fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em plantas crescendo em dunas na Bahia. **Revista Ceres**, v.42, p.191-202, 1995.

SANTOS, I.S. **Fungos micorrízicos arbusculares em ambiente de Mata Atlântica e de Eucaliptos na região de Entre Rios, Bahia**. 2001. 98f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador.2001.

SIBINEL, A.H.M. **Resposta da leguminosa *Mimosa artemisiana* à inoculação de diferentes fungos arbusculares na recuperação de áreas degradadas**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). 2003. 57f. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia. 2003.

SILVEIRA, A.P.D. Ecologia de fungos micorrízicos arbusculares. In. Melo, I.S. & Azevedo, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 488 p., p 61-86.

SIQUEIRA, J.O & FRANCO, A.A. **Biotechnology do solo, fundamentos e perspectivas**. Brasília, ABEAS, 1988, 235p.

SIQUEIRA, J.O. MAHMUD, A.W., HUBBEL, D.H. Comportamento diferenciado de fungos formadores de micorizas vesículo-arbusculares em relação à acidez do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.**, v.10, p.10-16, 1986.

SIQUEIRA, J.O., HUBBEL, D.H.; VALLE, R.R. Effects of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, n.12, p.1465-1474, 1984.

SCHENCK, N.; PERÉZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. 3.ed. Gainesville: Synbergistic Publications, 1987. 286p.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1997. 605 p.

SMITH, A.H. THEIRS, H.D. **The boletes of Michigan**. Ann Arbor: University of Michigan, 1971. 420 p.

STUNTZ, D.E. **How to identify mushrooms to genus, IV: keys to families and genera**. Eureka, CA: Mad River Press, 1980. 94 p.

SYLVIA, D.M. Micorrhizal symbioses. In: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. (eds). Principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Prentice Hall. 1998. p.408-426.

TRAPPE, J.M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. **Botanical Review**. v.28, n.4, p.538-606, 1962.

TEDESCO, K.J. **Análise do solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, Departamento de Solos, 1995.174p.

VOZZO, J.A.; HACSKAYLO, E. Inoculation of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. **Forest Science**, v.17, n.2, p.239-241, 1971.

ZAMBOLIN, L.; BARROS, N.F. Constatação de micorriza vesículo- arbuscular em *Eucalyptus* spp na região de Viçosa. **Revista Árvore**, v. 6, n.1, p.95-97, 1982.

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Acacia mearnsii* DE WILD INOCULADAS COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM DIFERENTES SUBSTRATO

1 RESUMO

A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é viável em mudas de espécies florestais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da associação micorrízica de *Glomus clarum* Nicolson & Schenck e *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann para a formação de mudas de *Acacia mearnsii*, em diferentes substratos e doses de fósforo, bem como a sua dependência micorrízica. O experimento constou de cinco tratamentos, sendo dois tratamentos de inoculação de espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), (*Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*) e três tratamentos com diferentes substratos (mecplani, turfa fértil e Neossolo Quartzarênico); com 5 doses de fósforo (0, 50, 100, 500 e 1000 mg Kg⁻¹), e dez repetições. As espécies de FMAs *G. clarum* e *G. etunicatum* apresentaram-se eficientes na colonização das raízes das mudas de *Acacia mearnsii*, formando colonização micorrízica, mesmo em substratos com alto nível de fósforo adicionado. Os substratos mecplani e turfa fértil, foram eficientes na promoção do crescimento das mudas de *A. mearnsii*, pois sendo ricos em fósforo, melhoraram o desenvolvimento das mudas, com boa formação do sistema radicular e maior produção de biomassa aérea. A *A. mearnsii* apresentou grau de dependência micorrízica intermediária, típica de plantas pioneiras de crescimento rápido.

Palavras chave: Fungos micorrízicos arbusculares, turfa fértil, mecplani.

2 INTRODUÇÃO

A *Acacia mearnsii* De Wild (acácia negra), é uma importante espécie exótica cultivada no Estado do Rio Grande do Sul, tendo sua área de plantio comparável com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (HIGA et al., 1998). Desde sua introdução em 1918, a acácia negra, apresentou uma expansão considerável, devido ao fornecimento de casca para produção de tanino (CALDEIRA et al., 2002).

A acácia negra, também pode ser considerada uma recuperadora de solos, por se tratar de leguminosa com capacidade de reposição de nitrogênio até cerca de 200 Kg de N ha⁻¹ano⁻¹, além de contribuir na formação de cobertura florestal devido ao seu rápido crescimento e fácil propagação (FRANCO & DOBEREINER, 1994). Possui vasto sistema radicular, o que promove maior agregação do solo e aumento da capacidade de retenção de água e sais minerais (BONI et al., 1994), além de apresentar capacidade de formar simbiose com micorrizas arbusculares e ectomicorrizas (MOREIRA & SIQUEIRA 2002).

Na produção de mudas de espécies florestais de qualidade, é indispensável que se tenha um adequado substrato, que é indicado principalmente por suas características físico e químicas, com boa estrutura, consistência, alta porosidade, alta capacidade de retenção e fornecimento de nutrientes, de água e que sejam inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (SIQUEIRA, 1996). Assim, objetivando a produção de mudas florestais em qualidade e quantidade, têm-se obtido avanços técnicos, buscando mudas bem formadas que assegurem boa adaptação e crescimento pós o plantio.

A maioria das áreas destinadas ao reflorestamento apresenta baixa fertilidade natural e baixo potencial de inóculo de microrganismos benéficos para as plantas, como FMAs. Estes fungos contribuem para a sobrevivência e crescimento das espécies das plantas, principalmente em ambientes desfavoráveis (SIQUEIRA & SAGGIN JÚNIOR, 1995). Desta forma, a introdução de micorrizas que possam aumentar a área radicular da planta e expandir sua capacidade de buscar maior volume de água e nutrientes, pode ser importante para assegurar o sucesso de reflorestamentos, antecipando etapas, pela inoculação das plantas na fase de formação de mudas (PERRY et al., 1987).

Como as micorrizas arbusculares são geralmente inibidas em condições de elevada disponibilidade de fósforo (KAMINSKI et al., 1994), a adição de P suficiente para otimizar o crescimento das mudas, pode reduzir a colonização, sendo este efeito dependente da espécie vegetal e do fungo inoculado (RHEINHEIMER, et al., 1997). A adição de P não torna as

plantas imunes à colonização micorrízica, apenas reduz a sua intensidade (CARDOSO, 1986). Geralmente em concentrações de fósforo próximas do ótimo para o crescimento da planta hospedeira, já ocorre inibição da colonização micorrízica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002), porque afeta os sinais moleculares que desencadeiam a associação, que são emitidos pela planta hospedeira. Portanto, a sua exigência interna e a taxa de translocação a partir da raiz, definem a eficiência da associação (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Em solo deficiente em P, a aplicação de pequena quantidade desse elemento favorece a colonização e esporulação (FERNANDES et al., 1987), porque aumentam o vigor da planta hospedeira, favorecendo a translocação de fotossintatos às raízes, disponibilizando mais energia aos fungos.

Sendo a inoculação de FMAs feita basicamente antes da germinação da semente, logo na formação de mudas, geralmente colonizam mudas crescendo em substrato fértil. Por isso, após o transplante, os FMAs são eficientes em promover o crescimento da planta e a favorecer o sistema de fixação de N_2 por bactérias diazotróficas em ambientes degradados ou de baixa fertilidade. Essas mudas, conseguirão melhor adaptação às condições de estresse, já que apresentarão boa vitalidade nutricional, alto poder de agregação das raízes com o substrato e boa capacidade de retenção de água, de modo que a espécie se adapte perfeitamente ao local do plantio (SIBINEL, 2003).

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a eficiência da associação micorrízica de *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*, ocorrentes em campo natural de áreas arenizáveis, para a formação de mudas de *Acacia mearnsii* em diferentes substratos e doses de fósforo, e determinar o grau de dependência micorrízica da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As mudas de *Acacia mearnsii* foram produzidas em tubetes de 50 cm³ de capacidade de substrato, a partir de agosto de 2003, em casa de vegetação do Departamento de Solos, na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. (Figura 2).



Figura 2 - Mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum* aos 30 dias após a germinação em casa de vegetação.

A composição dos substratos utilizados foi de turfa, perlita, calcário aditivado com fertilizante natural, contendo as características químicas apresentadas na Tabela 2. Também utilizou-se amostras do solo Neossolo Quartzarênico, desinfestados com o fungicida sistêmico Benomyl (Benlat 50). O fungicida foi preparado, utilizando-se 15 mg do ingrediente ativo seco (formulação pó molhável 50%) misturado em 1kg de substrato, os quais foram umedecidos na capacidade de campo e deixados secar ao ar. Este procedimento foi repetido por três vezes no período de 15 dias. As determinações químicas de P, K, Al, Ca, Mg e o pH dos substratos foram feitas segundo metodologias descritas por TEDESCO (1986).

Tabela 2. Características químicas dos substratos comerciais Mecplani e Turfa Fértil e do Neossolo Quartzarênico utilizados na produção das mudas de *Acacia mearnsii* em casa de vegetação.

Substrato	pH em H ₂ O	P ---- mg L ⁻¹ ----	K	Al -----cmol _c L ⁻¹ -----	Ca	Mg
Neossolo Quartzarênico	4,7	8,0	30,0	0,6	0,3	0,1
Mecplani	5,8	107,73	190,0	0	5,4	3,2
Turfa Fértil	6,5	39,55	82,0	0	5,3	3,3

O experimento constou de cinco tratamentos, sendo dois tratamentos de inoculação de espécies de FMAs, (*Glomus clarum* Nicolson & Schenck e *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann) e três tratamentos com diferentes substratos (turfa fértil, mecplani e Neossolo Quartzarênico), com cinco doses de fósforo adicionado no substrato (0, 50, 100, 500 e 1000 mg kg⁻¹). O delineamento experimental utilizado foi de parcelas subdivididas em esquema fatorial: 2 fungos micorrízicos x 3 substratos x 5 doses de P x 10 repetições.

As sementes da acácia negra, foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria (FEPAGRO). Para a quebra de dormência as sementes foram imersas em água quente a 80° C por 3 minutos, e inoculadas com rizóbio BR 3608 e BR 3614 crescidas em meio sólido descritos por VICENT (1970). As estirpes de rizóbio foram fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia – CNPAB/EMBRAPA.

No plantio, abriu-se um orifício em cada tubete, pipetando-se neste orifício, nos tratamentos de inoculação, 1 mL de suspensão de esporos de *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*, contendo em média 90 esporos de FMAs. Em seguida foram colocadas quatro sementes inoculadas com rizóbio por célula. Aos trinta dias, quando as plântulas estavam com um par de folhas definitivas, foi feito o desbaste deixando-se uma planta por tubete. As irrigações foram diárias, e a aplicação de solução nutritiva sem fósforo de HOAGLAND & ARNON (1951) a cada quinze dias.

Para avaliação das mudas, foram coletadas aleatoriamente cinco plantas por tratamento aos 140 dias após a germinação, avaliando-se altura, diâmetro do colo, colonização micorrízica, número de esporos, número de nódulos, peso da parte aérea seca e teores de nutrientes na parte aérea.

Para avaliação da colonização micorrízica, as raízes foram clarificadas e coradas, conforme KOSKE & GEMMA (1989) e GRACE STRIBLEY (1991). A percentagem do comprimento de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada descrito no trabalho de GIOVANETTI & MOSSE (1980), adaptado a partir do método de medidas de comprimento de raízes de NEWMAN (1966).

Para a avaliação do número de esporos, estes foram extraídos do solo através da técnica de peneiramento úmido (GERDEMANN & NICOLSON 1963), seguido de centrifugação em água e sacarose (JENKINS, 1964).

Para a determinação dos teores de nutrientes o material da parte aérea foi seco a 65° C em estufa com circulação de ar, e pesado até atingir massa constante. Foi então moído e digerido com extrator nitro-perclórico (2:1) para extração de P, K, Ca e Mg e extrator sulfúrico para extração de N (SILVA, 1999). Os teores de P foram determinados por colorimetria, K por fotometria de chama e Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica (SILVA, 1999), e o N pelo método de KJELDAHL modificado (LOUREIRO & BODDY, 1986).

Os dados, testados quanto à sua homogeneidade, foram submetidos à análise de variância e teste de média (Scott-Knott 5%) e regressão polinomial, utilizando-se dos procedimentos disponíveis no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mudas micorrizadas de *Acacia mearnsii* apresentaram resposta quadrática típica com redução de altura em relação às mudas não micorrizadas na dose mais alta de P (Figura 2.1).

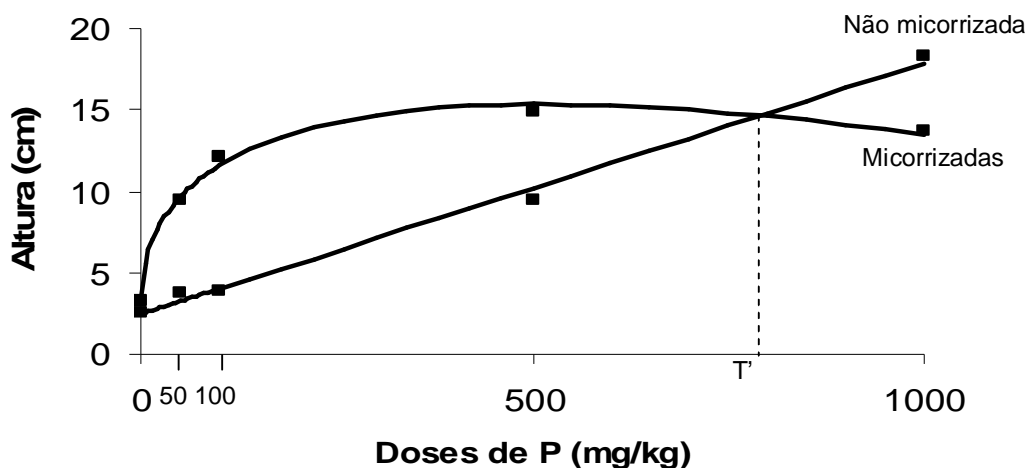


Figura 2.1 - Altura das mudas de *Acacia mearnsii* aos 120 dias após a germinação micorrizadas ou não com FMAs em diferentes doses de P. Micorrizada: $Y = 3,34 - 0,023X + 1,055X^{0,5}$; $R^2 = 0,99$, Não micorrizada: $Y = 2,12 + 0,012X$; $R^2 = 1,00$. Ambos os ajustes são significativos ($P \leq 0,01$).

O ponto máximo da curva ocorreu entre as doses de P adicionadas de 100 e 500 mg kg⁻¹ de P, o que em termos de P disponível por Mehlich I corresponde entre 32 e 84 mg kg⁻¹ de solo. As plantas sem micorrizas responderam linearmente à aplicação de P no solo, apresentando também comportamento típico de plantas não micorrizadas. Benefícios acentuados da inoculação, foram significativos até a dose de P disponível de 84 mg kg⁻¹, evidenciando a dependência micorrízica intermediária da *Acacia mearnsii*. As mudas de *A. mearnsii*, tiveram altura máxima, beneficiada pelo fungo até teores de P disponíveis no solo de 84 mg kg⁻¹.

Janos (1988), define dependência micorrízica (DM) como “a incapacidade das plantas crescerem sem micorrizas a um dado nível de fertilidade”, o qual é usualmente medido pela concentração do fósforo na solução do solo. Ele propõe que a DM seja quantificada pelo nível de fósforo até o qual as plantas não micorrizadas não aumentam significativamente o seu crescimento (T) ou pelo nível de fósforo acima do qual as plantas não micorrizadas não cresçam diferentemente das micorrizadas (T’).

Sendo assim, o ponto de cruzamento entre as curvas (Figura 2.1), que equivale ao ponto T' de JANOS (1988) é de 823 mg kg⁻¹ adicionado, equivalendo à 192 mg kg⁻¹ de P disponível no solo (Mehlich I). Estes dados, corroboram com os de SIBINEL (2003), que trabalhando com a leguminosa arbórea *Mimosa artemisiana*, verificou que esta é uma planta de dependência micorrízica intermediária, deixando de responder à inoculação quando o nível de P no solo é alto. O ponto T' encontrado por este autor, foi de 815 mg kg⁻¹, correspondendo a aproximadamente a 187 mg kg⁻¹ de P extraído pelo Mehlich I, sugerindo assim, que este comportamento seja comum em plantas pioneiras de rápido crescimento. Rocha, et al (2006), verificaram elevado grau de dependência micorrízica das mudas de *Cedrela fissilis* Vell (cedro), uma vez que o T' foi calculado com base no valor médio do limite superior da faixa de mutualismo, obtida pelos diferentes FMAs testados, foi de 800 mg kg⁻¹ de P adicionado ao solo, equivalendo a 134, 4 mg dm⁻³ de P disponível no solo extraído por Mehlich-1.

Os isolados *G. etunicatum* e *G. clarum* colonizaram as raízes da *A. mearnsii*, até nas maiores doses de P adicionado (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Colonização Micorrízica das mudas de *Acácia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições).

Tratamentos	Colonização Micorrízica (%)				
	Doses de P mg kg ⁻¹				
	0	50	100	500	1000
Neossolo Ni	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Neossolo <i>G. clarum</i>	74,59 b	84,07 a	75,51 b	62,67 b	85,57 a
Neossolo <i>G. etunicatum</i>	85,32 a	80,94 b	83,00 b	87,20 a	76,38 b
Turfa Ni	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Turfa <i>G. clarum</i>	77,29 b	86,16 a	82,54 a	82,77 a	73,73 b
Turfa <i>G. etunicatum</i>	85,17 a	79,74 b	81,55 a	68,87 b	77,99 b
Mecplani Ni	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Mecplani <i>G. clarum</i>	85,32 a	89,29 a	82,33 a	82,54 a	80,50 b
Mecplani <i>G. etunicatum</i>	85,15 a	83,74 a	77,92 b	80,62 b	84,44 a

Médias seguidas da mesma letra, em cada dose de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

A colonização micorrízica não foi detectada no tratamento não inoculado, o que evidenciou a ausência de contaminação entre os tratamentos. Assim, a capacidade infectiva avaliada pela porcentagem de colonização das raízes, variou com o isolado fúngico inoculado, com a dose de fósforo aplicada, e com os diferentes substratos.

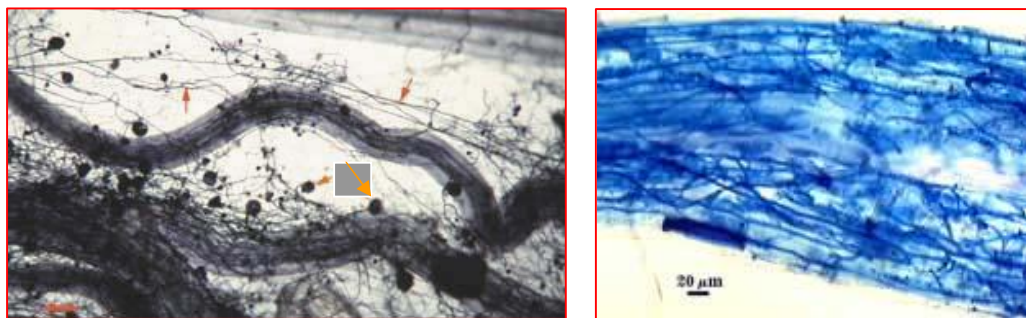


Figura 2.2 - Raízes de *Acacia mearnsii* colonizadas com isolados de *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*.

A maior intensidade de colonização radicular das mudas de *A. mearnsii*, em relação à dose de P adicionada, foi maior na dose 0 de P, no substrato mecplani inoculado com *G. clarum*. Este isolado promoveu maior colonização micorrízica das raízes da *A. mearnsii* em todas as doses de P adicionado. *G. clarum* e *G. etunicatum* podem apresentar alto potencial para promover o crescimento das mudas em casa de vegetação e no campo, embora nestas condições outros fatores influenciam a eficiência dos FMAs, tais como competição com outros FMAs e adaptação ao solo e clima local (ABBOT & ROBSON, 1992).

A maior esporulação dos FMAs ocorreu nas menores doses de P adicionado (Tabela 2.2), sendo que em todas as doses de P adicionado, com exceção da dose de 1000 mg k⁻¹, a maior esporulação foi do isolado *Glomus etunicatum* no substrato mecplani, seguido do substrato turfa fértil.

Tabela 2.2. Número de esporos das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 140 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 10 repetições).

Tratamentos	Número de esporos (n ⁻¹)				
	Doses de P mg.kg ⁻¹				
	0	50	100	500	1000
Neossolo Ni	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Neossolo <i>G. clarum</i>	202 b	359 a	240 b	158 b	193 b
Neossolo <i>G. etunicatum</i>	281 a	224 b	249 b	132 b	163 b
Turfa Ni	0 a	0 a	0 a	0a	0a
Turfa <i>G. clarum</i>	366 b	295 b	644 a	370 b	318 b
Turfa <i>G. etunicatum</i>	410 a	428 a	350 b	384 b	297 b
Mecplani Ni	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Mecplani <i>G. clarum</i>	315 b	358 a	281 b	275 b	198 b
Mecplani <i>G. etunicatum</i>	736 a	367 b	239 b	459 b	404 b

Médias seguidas da mesma em cada dose de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

A produção de esporos dos FMAs acompanhou o comportamento da colonização micorrízica, embora este não seja obrigatório, pois não há uma relação direta entre o número de esporos e a colonização micorrízica. A taxa de germinação dos esporos é de fundamental importância para este comportamento, pois pode-se ter um grande número de esporos e estes possuem baixa taxa de germinação, por conseqüência baixa percentagem de colonização micorrízica.

A disponibilidade de P e a fertilidade dos substratos mecplani e turfa fértil, não foram suficientes para promover efeitos negativos na multiplicação e esporulação dos FMAs, bem como no crescimento das plantas micorrizadas, permitindo boa colonização das mudas tanto por *G. clarum* quanto por *G. etunicatum*. Ambos os fungos mostraram-se eficientes em colonizar as mudas da *Acacia mearnsii*. A boa colonização das mudas é de extrema

importância para garantir sua sobrevivência e estabelecimento após o transplante para uma área degradada de baixa fertilidade e com poucos propágulos de FMAs, (SIBINEL, 2003).

A micorrização de mudas de *A. mearnsii* é possível em substrato rico em fósforo, e embora possa não refletir em benefícios imediatos no crescimento das plantas, pode favorecê-las quando transplantada para áreas degradadas.

O maior diâmetro do colo das mudas de *Acacia mearnsii* ocorreu nas mudas inoculadas com *Glomus etunicatum*, cultivadas no substrato turfa fértil, na maior dose de fósforo (1000 mg kg^{-1}), (Figura 2.3).

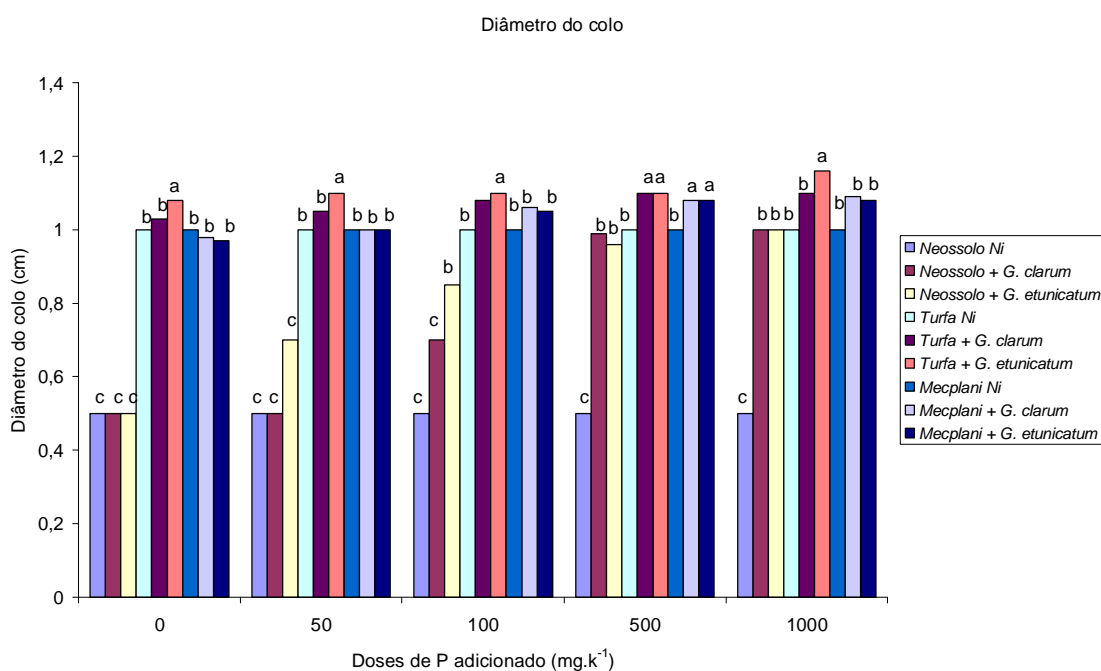


Figura 2.3 - Diâmetro (cm) das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições). Médias seguidas da mesma letra em cada dose de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%

A nodulação das mudas de *A. mearnsii* foram maiores quando inoculadas com os isolados *G. clarum* e *G. etunicatum*, em todas as doses de P adicionada com exceção da dose de 1000 mg k^{-1} , onde a maior nodulação se deu no substrato sem inoculação de FMAs (Figura 2.4).

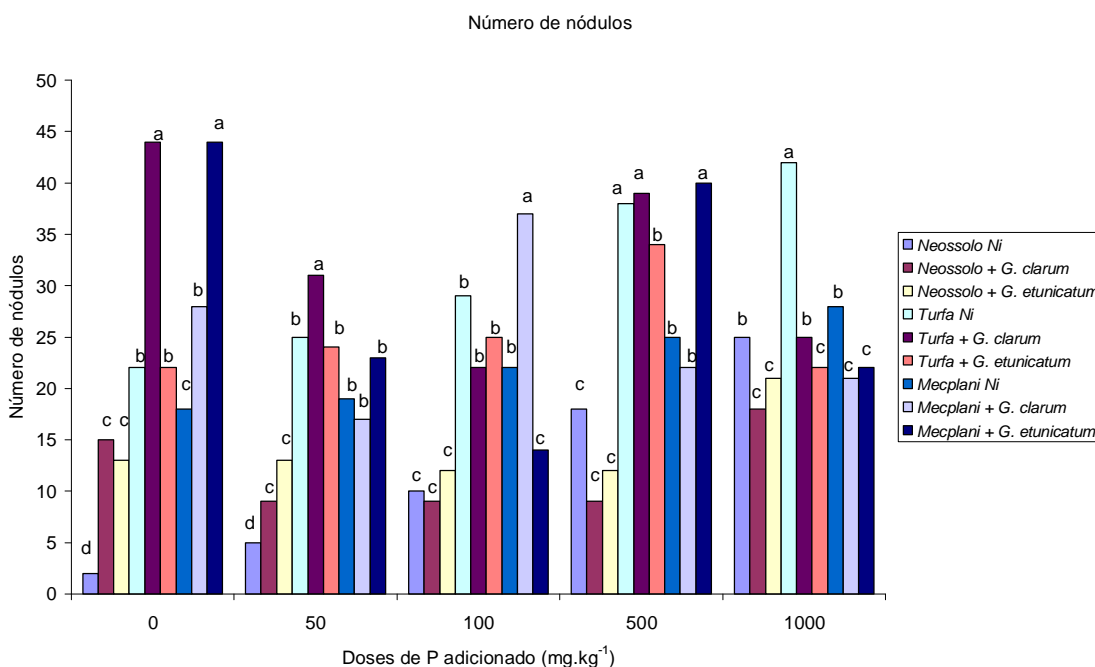


Figura 2.4 - Número de nódulos das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições). Médias seguidas da mesma letra em cada dose de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

O peso da parte aérea seco das mudas de *A. mearnsii* também acompanhou o comportamento dos outros parâmetros estudados, sendo que o maior peso se deu nas mudas produzidas nos substratos comerciais inoculados com os FMAs (Figura 2.5). O isolado *G. etunicatum* promoveu maior eficiência no crescimento das mudas de *A. mearnsii*, no que se refere ao maior diâmetro e maior esporulação. Já o *G. clarum* promoveu maior colonização das raízes, bem como maior nodulação.

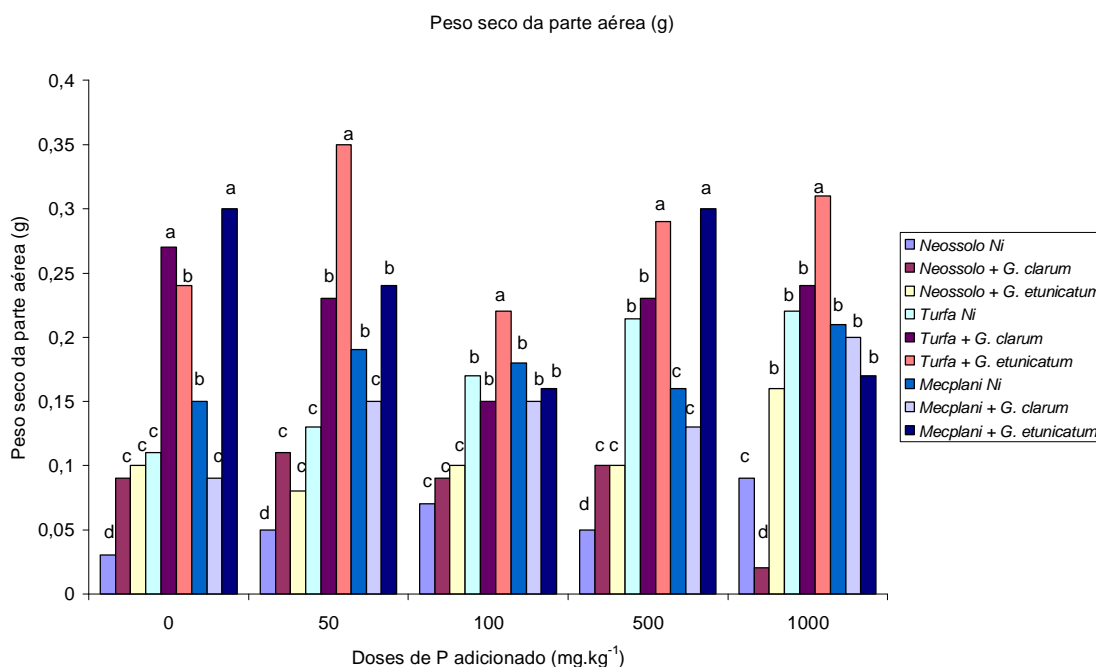


Figura 2.5 - Peso (g) da parte aérea seca das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições). Médias seguidas da mesma letra em cada dose de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

Os estudos com acácia negra ainda apresentam carências quanto à informações científicas sobre ciclagem de nutrientes, bem como sobre os aspectos de sua cultura e utilização.

A quantidade de nutrientes acumulada na parte aérea das plantas, é consequência de suas concentrações e da produção da matéria seca.

Neste trabalho, verifica-se que as maiores quantidades de nutrientes acumuladas na parte aérea das mudas, ocorreram nos tratamentos de inoculação de FMAs, independente das doses de fósforo adicionadas ao substrato de plantio.

A eficiência da utilização dos nutrientes acumulados na parte aérea da acácia negra pode ser atribuída à espécie, idade e disponibilidade de nutrientes no solo. A interação micorriza x substrato para a produção das mudas, foi eficiente em todos os parâmetros analisados neste trabalho, bem como nos resultados dos teores de nutrientes acumulados na parte aérea das mudas.

A acácia negra também mostrou-se apta para se desenvolver em solos pobres e deficientes em bases, como o Neossolo Quartzarênico, pois apresentou grande eficiência no uso do fósforo (Figura 2.6), o que corrobora com o trabalho de CALDEIRA et al (1999 a),

que verificaram a grande eficiência da acácia negra em utilizar este nutriente para a produção de biomassa.

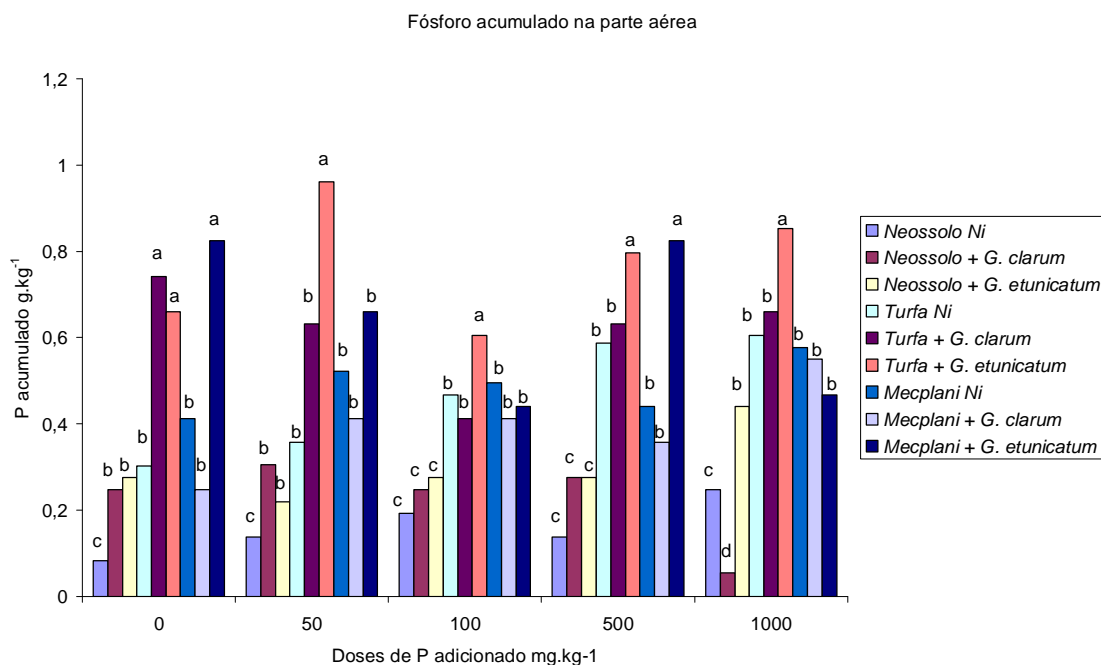


Figura 2.6 - Teores de fósforo acumulado na parte aérea das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições). Médias seguidas da mesma letra em cada dose de P adicionado não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

Em todos os tratamentos de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, a concentração de Ca na parte aérea das mudas foi maior (Figura 2.7).

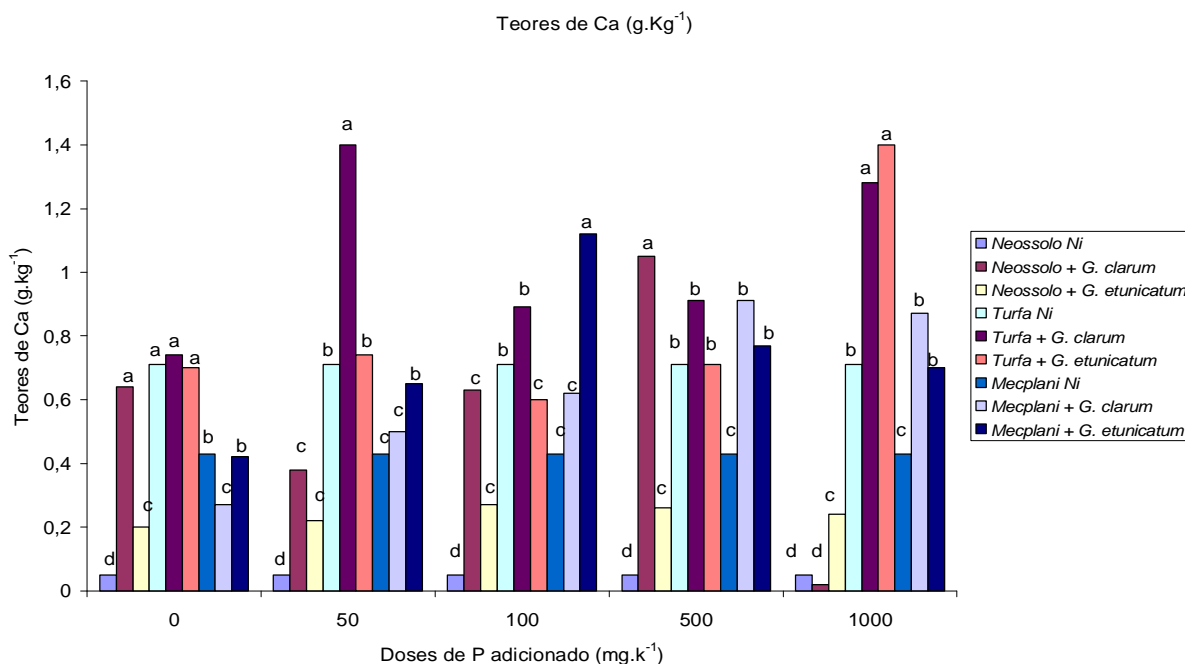


Figura 2.7 - Teores de cálcio (Ca) das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições). Médias seguidas da mesma letra em cada dose de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

Conforme ATTIWILL et al (1978), o cálcio está associado à lignificação das paredes celulares, não sendo redistribuído internamente na planta, pois faz parte da estrutura das paredes celulares e, portanto, é essencial nas partes novas da planta. É o elemento menos redistribuído na planta, pelo fato de possuir uma baixa mobilidade, porém, é o nutriente que se acumula em maiores proporções na casca das árvores de acácia negra.

Em todos os tratamentos de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, as concentrações de N na parte aérea das mudas também foi maior (Figura 2.8), podendo ser justificadas pela sua capacidade, como espécie leguminosa, de fixar N₂ e pelo efeito sinérgico da ação das micorrizas (FRANCO et al., 1992). Segundo AUER & SILVA (1992), a *Acacia mearnsii* em solos tropicais, pode fixar, até 200 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹.

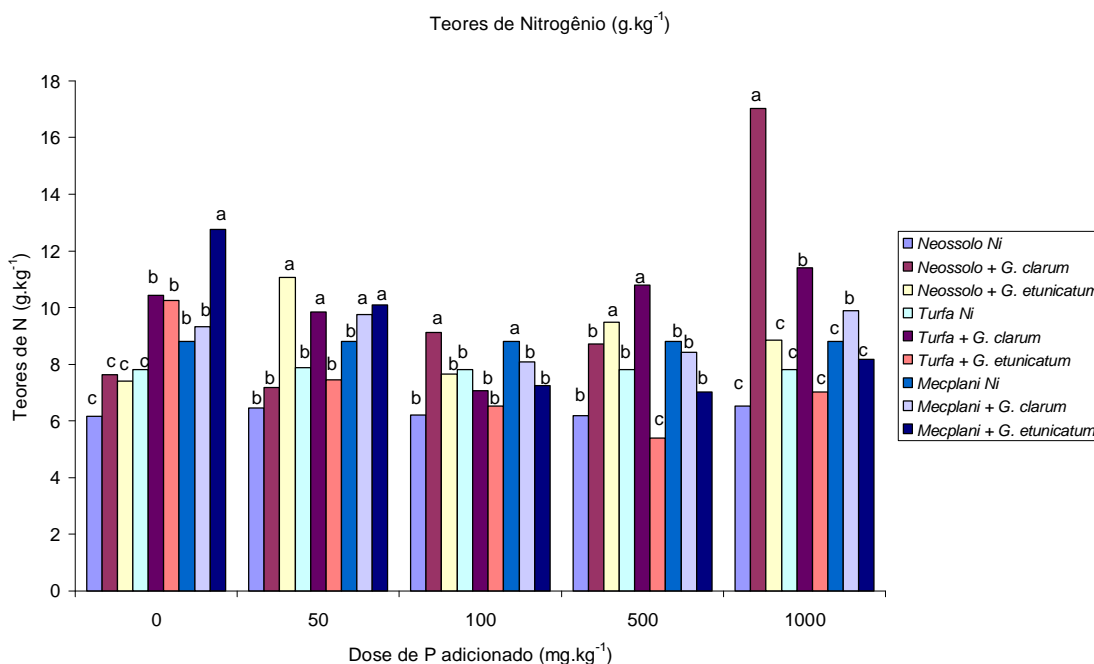


Figura 2.8 - Teores de nitrogênio (N) das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições). Médias seguidas da mesma letra em cada dose de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

O N possui eficiência de uso relativamente baixo quando comparado aos outros nutrientes, devido aos altos teores nas folhas verdes e à retranslocação interna, voltando ao solo através da queda de serrapilheira, sendo assim, novamente integrado ao ciclo biogeoquímico.

Maiores concentrações de nitrogênio na parte aérea das mudas de acácia negra evidenciam o seu maior potencial de ciclagem de nutrientes, via serrapilheira, quando comparada a outras espécies, como por exemplo o eucalipto.

As concentrações de potássio na parte aérea das mudas de acácia negra, foram maiores nas mudas inoculadas com os FMAs nos substratos comerciais (Figura 2.9) e são superiores as encontradas por PEREIRA et al (2000), que variou em torno de $8,70 \text{ g.k}^{-1}$.

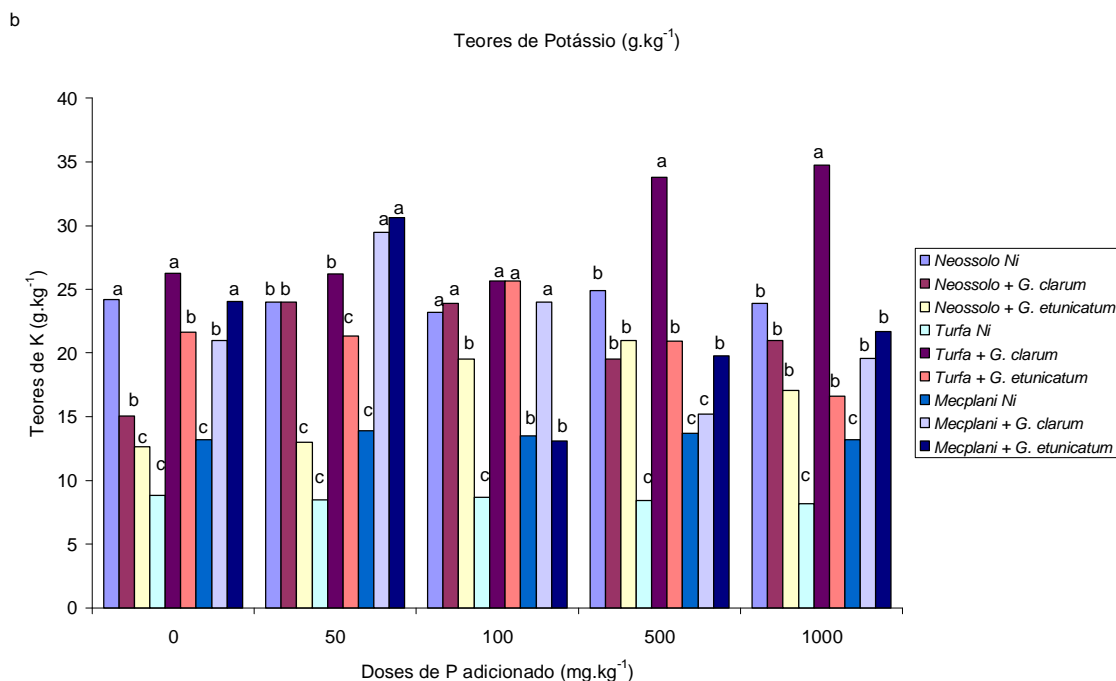


Figura 2.9 - Teores de potássio (K) das mudas de *Acacia mearnsii* inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) aos 120 dias após a germinação em diferentes substratos e doses de fósforo (Média de 5 repetições). Médias seguidas da mesma letra nas doses de P adicionado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott 5%.

Todas as concentrações de nutrientes encontradas na parte aérea da *Acacia mearnsii*, neste trabalho, são superiores aos valores encontrados por CALDEIRA et al, (1999), evidenciando que a presença dos fungos micorrízicos contribuíram para a melhor absorção e redistribuição dos elementos.

Mesmo apresentando uma situação ascendente no setor florestal, os estudos sobre a *A. mearnsii* ainda apresentam carências quanto às informações científicas básicas em relação à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da composição do substrato para uma otimização da produção de mudas desta espécie.

A interação significativa entre os fatores fungo x substrato x dose de P, revelou que a *Acacia mearnsii* apresenta uma dependência intermediária quanto à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, e que o teor de fósforo adicionado no solo, não impede a sua colonização. Isto se deve ao fato, que as diferenças de eficiência dos FMAs em beneficiar as plantas, são verificadas quando várias espécies de FMAs são inoculadas em uma mesma planta, sendo que estas diferenças podem existir até dentro de isolados de uma mesma espécie de FMA (SAGGIN JÚNIOR & LOVATO, 1995; BETHLENFALVAY et al., 1989).

Neste sentido, CAPRONI et al (2005), observaram que quando mudas de *Acacia mangium* são inoculadas com *G. clarum*, há uma alta produção de esporos na fase inicial do plantio, declinando com o tempo, enquanto de *Gigaspora margarita* aumenta a esporulação dependendo das condições edafoclimáticas locais.

As diferenças de eficiência verificadas podem ser devido à habilidade maior da combinação *A. mearnsii*, FMAs e substratos em absorver nutrientes como P e promover nodulação com o rizóbio. Alguns estudos sobre ciclagem, concentração e exportação de nutrientes da acácia negra já foram feitos no Brasil, basicamente envolvendo os macronutrientes (CALDEIRA, et al., 1999 c). Entretanto, atualmente as pesquisas realizadas com micronutrientes na acácia negra relacionam-se apenas aos teores de nutrientes nas folhas, BELLOT et al (2000). É evidente a necessidade de estudos sobre a distribuição dos micronutrientes nos outros componentes das árvores de acácia negra, sendo fundamental para estudos de nutrição, ciclagem e exportação dos nutrientes.

Os resultados aqui encontrados, evidenciam que o substrato para a produção de mudas deve ser rico em compostos orgânicos com altas doses de P, e inoculados com o FMA *Glomus etunicatum*, pois propiciam melhor crescimento das mudas, com boa formação do sistema radicular.

5 CONCLUSÕES

O *Glomus etunicatum* apresentou-se eficiente em colonizar as raízes das mudas de *Acacia mearnsii*, formando colonização micorrízica mesmo em substratos com alto nível de fósforo adicionado.

Os substratos comerciais mecplani e turfa-fértil, foram eficientes para a promoção do crescimento das mudas de *Acacia mearnsii*, propiciando melhor crescimento das mudas, com boa formação do sistema radicular e na produção da biomassa aérea.

A *Acacia mearnsii* apresentou grau de dependência micorrízica intermediária, típica de plantas de pioneiras de crescimento rápido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. The effect of VA mycorrhizae on plant growth. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. **VA MYCORRHIZAL S.I**: CRC Press, 1992. p.113-130.

ATTIWILL, P.M.; GUTHRIE, H.B.; LEUNING, R. Nutrient cycling in a *Eucalyptus oblique*. L' Herit forest. I. Litter production and nutrient return. **Australian Journal of Botany**. v.261, p.79-91, 1978.

AUER, C.G.; SILVA, R. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1992. p;157-172.

BELLOTE, A.F.J.; SILVA, H.D.; DEDECEK, R.A. Teores de macro e micronutrientes em acácia negra, com três anos de idade, plantada no Estado do Rio Grande do Sul. In. FERTBIO 2000 – **BIODINÂMICA DO SOLO; REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 24.; 2000. REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 3.; 2000**. Resumos expandidos. Santa Maria: SBOS/SBM: 2000. CD-ROM.

BETHLENFALVAY, G.J.; FRANSON, R.L.; BROWN, M.S.; MIHARA, K.L. The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX Nutricional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geografic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Physiology Plant**. v.76, n.2, p .226-232, 1989.

CALDEIRA, M.V.W.; SCHUMACHER, M.V.; PEREIRA, J.C.; DELLA-FLORA, J.B.; SANTOS, E.M. Concentração e redistribuição de nutrientes nas folhas e no folheto em um povoamento de *Acácia mearnsii* De Wild. no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v.9, n.1, 1999.

CALDEIRA, M.V.W.; SCHUMACHER, M.V.; TEDESCO, N. Crescimento de mudas de *Acacia mearnsii* em função de diferentes doses de vermicomposto. **Scientia Forestalis**, n.57, p.161-170, 1999 a.

CALDEIRA, M.V.W.; PEREIRA, J.C.; SCHUMACHER, M.V. Comparação entre as concentrações de nutrientes nas folhas e no folheto em procedência de *Acacia mearnsii* De Wild. **Revista Árvore**, v.23, n.4, p.489-492, 1999 c.

CALDEIRA, M.V.W.; RONDON NETO, R.M.; SCHUMACHER, M.V. Avaliação da eficiência nutricional de três procedências australianas de acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Revista Arvore**. v.26, n.5, p.615-620, 2002.

CAPRONI, A.L.; FRANCO, A.A.; BERBARA, R.L.L. GRANHA, J.R.D.O.; MARINHO, F.N. Fungos micorrízicos arbusculares em área estéril revegetado com *Acacia mangium* após mineração de bauxita. **Revista Árvore**, v. 29, n.3, p.373-381, 2005.

CARDOSO, E.J.B.N. Interaction of mycorrhiza, phosphate and manganese in soybean. In: AZCON-AGUILAR, C. & BAREA, J.M., (eds). **Mycorrhizas in integrated systems from**

genes to plant development. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities, 1986. p.304-306.

FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C.; SILVA, E.M.R. & FARIA, S.M. Revegetação de solos degradados., Seropédica, R.J., **EMBRAPA/CNPBS**, 1992. 11p. (Comunicado Técnico 9).

FRANCO, A. A ; DÖBEREINER, J. . A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**. v. 20, n. 11, p. 68-74, 1994.

FERNANDES, A.B.; SIQUEIRA, J.O.; MENEZES, M.A.L.; GUEDES, G.A.A. Efeito diferenciado do P sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose endomicorrízica em milho e soja. **Revista Brasileira Ciência do Solo**. v.11, n.2, p.101-108, 1987.

FERREIRA, D.F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados.** Lavras:UFLA/DEX/SISVAR, 145p, 2000.

GRACE, C.; STRIBLEY, D.P. A safer procedure for roution staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**. v.95, n.10, p.1160-1162, 1991.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wt-sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**. v. 46, p. 235-244, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. Na evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytology**. v. 84, p. 489-500, 1980.

HIGA, A.R. Desarrollo de sistemas de producccón para acacia negra (*Acacia mearnsii* De Wild). Inç Congresso Latino Americano IUFRO. Valdivia: IUFRO. **O manejo sustentable de los recursos forestales, desafío del siglo XXI**. Congresso. 1998.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkely, CA: University of California, (California Agricultura Experiment Station). Circular, 1951. 347 p.

JANOS, D.P. Mycorrhiza applications in tropical forestry: are temperate-zone approaches appropriate? In: NG, F.S.P. **Trees and mycorrhiza**. 1988, p.133-188.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technibique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report** , v.48, p. 692. 1964.

KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. dos S. Micorrização da Pensacola afetada por culturas precedentes. II. Taxa de crescimento e absorção de fósforo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRÍZAS, II, 1994. Florianópolis, SC. **Resumos...**Florianópolis, 1994, p.38.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for stining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v.92, n.4, p.468-488, 1989.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 626p, 2002.

NEWMAN, E.E.J. A method of estimating the total length of root sample. **Journal of Applied Ecology**. v.3, p.139-45, 1966.

PEREIRA, J.C.; CALDEIRA, M.V.W. SCHUMACHER, M.V.; HOPPE, J.M.; SANTOS, E.M. Estimativa do conteúdo de nutrientes em um povoamento de *Acacia mearnsii* De Wild no Rio Grande do Sul – Brasil. *Revista Árvore*. v.24, n.2, p.193-199, 2000.

PERRY, D.A.; MOLINA, R.; AMARANTHUS, M.P. Mycorrhizae, mycorrhizospheres and reforestation: current knowledge and research needs. **Canadian Journal of Forest Research**. v.8, n.17, p.929-940, 1987.

ROCHA, F.S.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E.M.R.; LIMA, W.L. Dependência e resposta de mudas de cedro e fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**.v.41, n.1, p.77-84. 2006.

RHEINHEIMER, D.S.; ERNANI, P.R.; SANTOS, J.C.P. Influência da micorriza no crescimento do *Trifolium riograndense* e na predição de absorção de fósforo por um modelo mecanístico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.21, p.191-197, 1997.

SAGGIN JÚNIOR, O.J.; LOVATO, P.E. Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J.O; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. CARVALHO, J.G. (eds.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa:, SBCS Lavras: UFLA/DCS, 1995. p. 725-774.

SIBINEL, A.H.M. Resposta da leguminosa *Mimosa artemisiana* à inoculação de diferentes fungos micorrízicos arbusculares na recuperação de áreas degradadas. 2003. 57 f. Dissertação(Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solo, plantas e fertilizantes**. Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária – Brasília. 1999.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JUNIOR, O.J. The importance of mycorrhizae association in natura in low fertility. In: MACHADO, A. T. Poc. Int. Symposium on Environmental Stress: maize in perspective. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA. 1995. p. 240-280.

SIQUEIRA, J.O. Micorrizas: forma e função. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, I, Lavras, 1995. **Anais....**Lavras: FAEPE, 1996, p.5-32.

TEDESCO, K.J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca, Mg em tecidos de plantas por digestão com H₂O₂ e H₂SO₄**. 1986. 23p. Porto Alegre, UFRGS, (Informativo Interno 01).

VICENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford Blackwell Scientific Publications.1970, 164p.

CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Eucalyptus grandis* INOCULADAS COM *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) EM DIFERENTES DOSES DE FÓSFORO

1 RESUMO

A qualidade das mudas de essências florestais é determinante para o êxito na formação de povoamentos florestais. Estas mudas, devem apresentar vigor suficiente para resistir ao estresse inicial do transplante, sendo importante que sejam produzidas em substrato fértil, onde não tenham limitações de nutrientes essenciais. A simbiose com ectomicorrizas torna possível o estabelecimento das mudas em solos em condições sub ótimas de disponibilidade de nutrientes. A ectomicorriza apresenta uma rede de hifas extracelulares que aumenta significativamente a área de absorção das raízes, portanto, a adição de fósforo no substrato usado em viveiro pode afetar a eficiência micorrízica. Assim, a maior eficiência simbiótica entre *Eucalyptus grandis* e isolados do *Pisolithus microcarpus* parece ocorrer quando os níveis de P encontram-se em nível sub-ótimo. Por isso, as mudas desenvolvidas em viveiros devem apresentar, além da condição ótima nutricional, colonização com ectomicorrizas, de modo que ela mesma seja o veículo para forçar o estabelecimento da simbiose após transplante no campo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento do isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) na colonização radicular, e no crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis*, produzidas sob diferentes substratos e doses de P adicionado. Os substratos utilizados na produção das mudas foram a turfa fértil e amostras de Neossolo Quartzarênico, e as doses de P adicionado foram 0, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 mg kg⁻¹. O isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) mostrou-se eficiente na promoção do crescimento das mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes substratos e doses de fósforo. A máxima eficiência simbiótica do fungo do isolado foi verificada até a dose de P adicionada de 100 mg kg⁻¹ (15,4 mg kg⁻¹ de P extraível Mehlich-1) no substrato turfa fértil, sendo que sua eficiência tende a ser maior em menores doses de P adicionado, porém, não foi inibido na maior dose de P adicionado de 800 mg kg⁻¹ onde colonizou as raízes de *Eucalyptus grandis*, em ambos os substratos.

Palavras chave: Eucalipto, fungos ectomicorrízicos.

2 INTRODUÇÃO

A qualidade das mudas de essências florestais é determinante para o êxito na formação de povoamentos florestais. Estas mudas, devem apresentar vigor suficiente para resistir ao estresse inicial do transplante (GOMES et al., 2002). No entanto, para a muda apresentar o vigor necessário, é importante que seja produzida em substrato fértil, onde não tenha limitações de nutrientes essenciais e uma boa aderência das raízes no substrato para evitar plantio com raízes nuas (GRACIANO et al., 2005; GOMES et al., 2003), por isso, há a preferência por tubetes na produção das mudas e a alta fertilização com NPK.

Por outro lado, a simbiose com ectomicorrizas torna possível o estabelecimento das mudas em solos em condições sub ótimas de disponibilidade de nutrientes, ou mesmo na presença de poluentes de deposição atmosférica (BRUNNER, 2001).

A ectomicorriza apresenta uma rede de hifas extracelulares que aumenta significativamente a área de absorção das raízes. Há várias espécies capazes de realizar a associação micorrízica, entre elas, isolados do *Pisolithus* sp que têm formado associações com espécies de eucalipto.

A adição de fósforo no substrato usado em viveiro pode afetar a eficiência micorrízica. Assim, a maior eficiência simbiótica entre *Eucalyptus grandis* e isolados do *Pisolithus microcarpus* parece ocorrer quando os níveis de P encontram-se em nível sub-ótimo (VIEIRA e PERES, 1988 a e b; SOARES, et al., 1990). Porém, mesmo com eficiência simbiótica baixa, os elevados teores de P não impedem completamente a colonização das raízes.

Por isso, as mudas desenvolvidas em viveiros devem apresentar, além da condição ótima nutricional, colonização com ectomicorrizas, de modo que ela mesma seja o veículo para forçar o estabelecimento da simbiose após transplante no campo.

O sucesso da colonização está associado à obtenção de fungos mais compatíveis com a área onde o eucalipto será cultivado do que com as condições do viveiro.

No entanto, quando um isolado do fungo falha na colonização, por falta de especificidade, pode ocorrer a contaminação por fungos oportunistas, formando uma associação atípica, mas de fácil identificação. Por isso, o inóculo deve ser analisado, como também, o material do substrato (BRUNDRETT et al., 2005).

A ocorrência natural de *Pisolithus* em povoamentos de eucalipto é comum, porém em viveiros não é tão frequente, o que é, muitas vezes atribuído à adubação do substrato com altas doses de fósforo (SOARES et al., 1990).

O mecanismo pelo qual o teor de P no substrato prejudica a colonização ainda não está elucidado. Como a formação e a simbiose da micorriza não é um processo controlado só pela planta ou só pelo ambiente, onde se inclui solo e clima, o teor sub ótimo de P parece estimular a formação da associação, mas deve haver um ajustamento entre os fatores envolvidos, especialmente na disponibilidade de água e nutrientes, de modo que a planta possa modular a sua atividade fenológica, adequando a sua demanda à habilidade do solo em atendê-la (GRACIANO et al., 2005; SMITH & READ, 1997).

Não há uma explicitação sobre os teores adequados de fósforo nos substratos para obter-se as mudas em viveiros, bem como, os teores que afetam negativa ou positivamente a colonização micorrízica, até porque, são utilizados diferentes tipos de substratos e diferentes extratores para sua avaliação. Soares et al (1990), relatam que teores extraídos com Mehlich 1, acima de 13 mg kg^{-1} em solo argiloso arenoso, textura 2 para o Rio Grande do Sul e Santa Catarina, nível médio a alto (COMISSÃO QUÍMICA DE FERTILIDADE DO SOLO, 2004), seria o teor que inibiria completamente a formação da micorrização. Este valor seria atingido com a adição maior que 75 mg Kg^{-1} de P. Já VIEIRA & PERES (1988 b) obtiveram 50% de colonização com teor de P similar.

Como nos viveiros produtores de mudas de *Eucalyptus* sp do Rio Grande do Sul, não são adotadas as técnicas de inoculação com fungos ectomicorrízicos, e como há uma rápida expansão neste Estado de áreas com cultivo de eucalipto, as mudas colonizadas com ectomicorrizas responderiam favoravelmente, especialmente em solos com baixa fertilidade natural (BRUNDRETT et al., 2005). Sendo assim, há a necessidade de se avaliar a partir de que grau de fertilização com fósforo no substrato no viveiro ocorre a inibição da formação desta associação, afetando o seu desenvolvimento pós transplante, e por outro lado, é importante identificar a presença da colonização antes de transferir as mudas para as áreas de cultivo.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento do isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) na colonização e no crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis*, produzidas sob diferentes substratos e doses de P adicionado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de fungos ectomicorrízicos.

O isolado de fungo ectomicorrízico testado neste experimento, oriundo de plantações de *Eucalyptus* spp foi doado pelo Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina e multiplicado no Laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia Professor Marcos Rubens Fries da Universidade Federal de Santa Maria.

O isolado foi mantido em meio de cultura sólido Melin-Norkrans Modificado (MNM – MARX, 1969), no interior de placas de Petri (9cm de diâmetro), em estufa a 25° C e foi multiplicado a partir de culturas da coleção, através de repicagens para o meio da mesma composição, sob condições assépticas.

3.2 Produção de inóculo de fungo ectomicorrízico.

O inóculo do fECM foi obtido inicialmente à partir da multiplicação e crescimento de culturas da coleção após trinta dias. Em seguida, foram feitas suspensões micelianas em 25 mL de MNM líquido em erlenmeyers de 250 mL, a partir de discos de 8mm de diâmetro obtidos das culturas em placa, seguindo-se de incubação a 25° C, durante 30 dias.

Após esse período, o conteúdo de dois frascos foi fragmentado em 200 mL de meio MNM, em liquidificador, durante 5 segundos, e utilizado para inocular 500 mL de uma mistura turfa-vermiculita (1: 4) (v/v) mais 200 mL de meio MNM líquido, em frascos de vidraria tipo conserva de 900 mL. A mistura foi previamente esterilizada em autoclave a 121° C, durante 60 minutos, antes da adição do meio. Posteriormente, foi realizada a esterilização pelo período de 20 minutos sob as mesmas condições de temperatura e pressão. Após, foi inoculado o fungo UFSC Pt 116, no meio. Os frascos foram mantidos em estufa a 25° C para o crescimento miceliano, durante 90 dias (Figura 3).



Figura 3 - Inóculo de *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, crescidos em substrato sólido, turfa e vermiculita e meio de cultura em estufa a 25° C por 90 dias.

3.3 Substrato de plantio das mudas de *Eucalyptus grandis*.

O substrato de plantio foi composto pelo substrato turfa fértil e amostras de solo Neossolo Quartzarênico. O substrato turfa fértil foi produzido pela empresa Floresta S.A. A composição do substrato foi de turfa, perlita, calcário aditivado com fertilizante natural, apresentando as seguintes características químicas: pH = 6,5; P = 39,55 mg L⁻¹; K = 82 mg L⁻¹; Al = 0, Ca = 5,3 cmol_c L⁻¹ e Mg = 3,3 cmol_c L⁻¹. A proporção do substrato foi de turfa-vermiculita (1:3) (v/v). O Neossolo Quartzarênico apresentou as seguintes características químicas: pH = 4,7; P = 8 mg L⁻¹; K = 30 mg L⁻¹; Al = 0,6 cmol_c L⁻¹; Ca = 0,3 cmol_c L⁻¹ e Mg = 0,1 cmol_c L⁻¹ e também foi misturado à vermiculita na proporção de (1:3) (v/v). Ambos os substratos, foram previamente esterilizados em autoclave a 121° C, durante 60 minutos, três vezes consecutivas, com um intervalo de 24 horas entre cada esterilização. Nos substratos, foi adicionada solução nutritiva contendo os seguintes elementos (mg kg⁻¹), baseados em ALVES et al., (2001): K, 16; Mn, 0,15; Mg, 3; Zn, 0,0375; Cu, 0,125; Mo, 0,05; B, 0,05 e Fe, 0,375.

3.4 Fósforo.

Para o fósforo foram testadas sete doses adicionadas no substrato de plantio: 0; 25; 50; 100; 200, 400, 800 mg kg⁻¹, com base em estudos preliminares de ALVES et al., (2001). Neste estudo, foi utilizado P solúvel, na forma de Ca(H₂PO₄)₂.H₂O, administrado em solução ao substrato de plantio das sementes. Após a colheita das mudas foi extraído o fósforo disponível pelo método de Mehlich 1, correspondendo à 0,5; 4,8; 8,8; 15,4; 33; 140 e 310 mg kg⁻¹ no substrato turfa fértil e 0,3; 3,7; 7,5; 13,2; 21; 110; 280 mg kg⁻¹ no Neossolo Quartzarênico.

3.5 Sementes

As sementes de *Eucalyptus grandis* foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO. As mesmas foram pré germinadas durante três dias sob agitação. Para isso, foram inicialmente desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, lavadas em água destilada, e transferidas para uma solução de germinação de ácido bórico ($3\mu\text{M}$), glicose (2 g L^{-1}) e sulfato de cálcio ($500\mu\text{M}$), a pH 5,7.

3.6 Montagem e condução do experimento.

A inoculação do *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) foi no momento da sementeira, adicionando-se 10% (v/v) do inoculante, previamente lavado com água destilada estéril (ALVES et al., 2001). A homogeneização do inoculo foi feita manualmente, com uso de luvas descartáveis. O tratamento testemunha recebeu a mesma quantidade da mistura turfa-vermiculita-MNM não inoculada, e submetida às mesmas condições de manutenção que o inoculante.

Os substratos inoculados foram distribuídos em tubetes cônicos de PVC de 50 cm^3 , previamente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio 1%. Os tubetes foram etiquetados de acordo com o tratamento e distribuídos em bandejas aleatoriamente. Cada tubete recebeu 5 sementes de *E. grandis*, depositadas a aproximadamente 1 cm de profundidade, que foram recobertas com o substrato. O conteúdo dos tubetes, foi em seguida irrigado com água destilada. Após a inoculação e o plantio, as mudas foram mantidas em casa de vegetação por 120 dias e irrigadas diariamente com água destilada (Figura 3.1).



Figura 3.1 - Mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) aos 120 dias após a germinação em casa de vegetação.

Para cada combinação de substrato x isolado fúngico e dose de P, foram feitas 10 repetições. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com rodízio semanal dos tubetes. Quatro semanas após o plantio, quando as mudas já estavam com um par de folhas definitivas, foi feito o desbaste, deixando-se uma muda por tubete.

3.7 Avaliação da colonização micorrízica, altura e diâmetro das mudas inoculadas com fungos ectomicorrízicos.

Após quatro meses de crescimento, as mudas foram retiradas dos tubetes e analisadas quanto a percentagem de colonização radicular, altura e diâmetro do caule. A determinação da percentagem de colonização radicular foi feita pela técnica das interseções de GIOVANETTI & MOSSE (1980), modificado por BRUNDRETT et al (1996). As raízes foram colocadas em água para facilitar a separação do substrato de plantio, e foram lavadas cuidadosamente em água corrente. Na seqüência foram medidos o diâmetro e altura das mudas.

As raízes foram cortadas em seções de 2 cm constituindo a amostra destinada a avaliar a colonização micorrízica. Esta amostra foi conservada em solução de FAA (5% de formalina a 40%; 5% de ácido acético e 90% de álcool etílico a 50%), segundo KORMANIK & MC GROW (1982) até o momento da avaliação.

As amostras de raízes mantidas em FAA foram espalhadas aleatoriamente no interior de placas de Petri (diâmetro de 9 cm) apresentando a superfície inferior reticulada em quadrados de 1,27 cm de lado, para determinação da colonização radicular. As raízes assim distribuídas foram observadas em lupa binocular (30X), registrando-se a presença ou ausência de colonização micorrízica nos pontos de intersecção entre as raízes e as linhas da placa.

Os dados, foram testados quanto à sua homogeneidade e submetidos à análise de variância e teste de média (Tukey 5%) e regressão polinomial, utilizando-se dos procedimentos disponíveis no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação das mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas na casa de vegetação da Universidade Federal de Santa Maria, em diferentes substratos e doses de P e inoculadas com fungos ectomicorrízicos.

4.1.1 Colonização micorrízica das mudas de *E. grandis* produzidas no substrato turfa-férril.

Foram observadas diferenças significativas promovidas pela dose de P adicionada às mudas de *E. grandis* e pela inoculação do isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) nos diferentes substratos, considerados separadamente, sobre todos os parâmetros analisados de *E. grandis*. As interações entre os dois fatores (doses de P e tratamentos de inoculação) foram observadas neste estudo.

Foi verificado aumento no crescimento na parte aérea das mudas e no diâmetro do caule, e efeito significativo sobre a colonização das mudas pelos fungos ectomicorrízicos com a adição crescente das doses de P. Por outro lado, o teor de P adicionado, promoveu menor colonização das raízes das mudas de *E. grandis*, nas maiores doses de P extraível por Mehlich -1, porém, não as inibiu.

O isolado de fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt 116) foi capaz de colonizar as raízes do *E. grandis*, produzidas no substrato turfa fértil, com diferente grau de intensidade, variando com a dose de P adicionado (Figura 3.2).

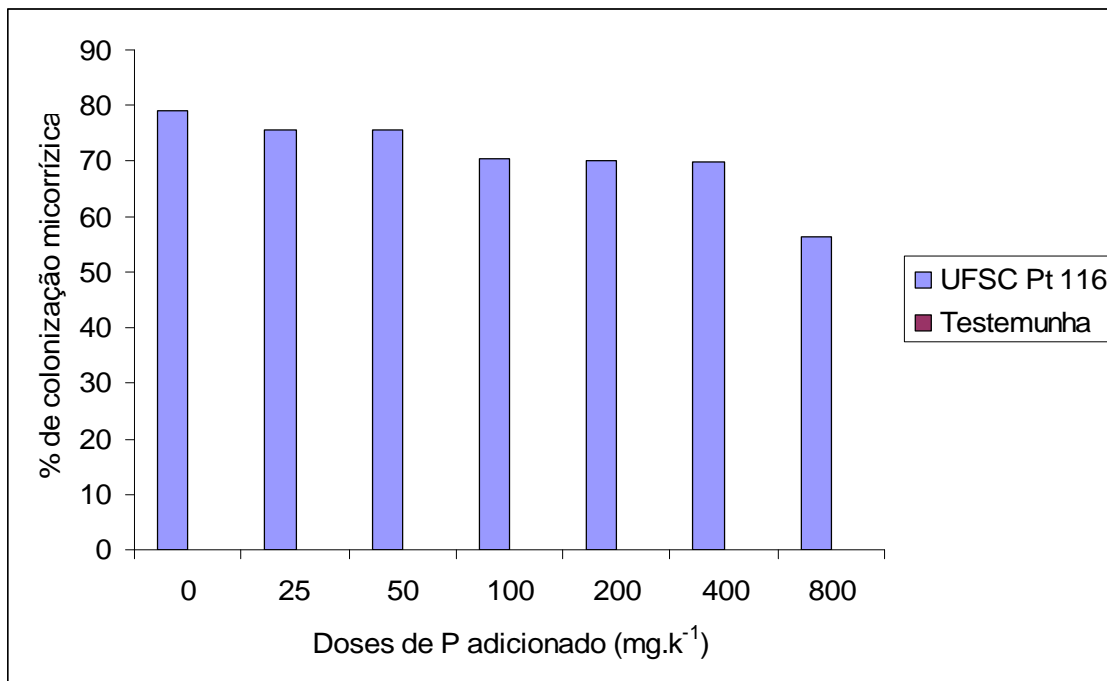


Figura 3.2 - Relação entre a dose de P adicionada e a percentagem de colonização de mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, sob condições de casa de vegetação no substrato turfa fértil. $Y = -0,192X + 2,0910$; $R^2 = 0,720^*$. Dados transformados para $\sqrt{y + 0,5}$, onde $y =$ % de colonização, (*) significativo ($p < 0,05$).

O isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), promoveu maior colonização das raízes de *E. grandis* nas menores doses de P adicionado e extraível por Mehlich-1. Assim nos tratamentos que receberam 25 e 50 mg kg⁻¹, as percentagens de colonização foram 75,74% e 75,71%, respectivamente não diferindo significativamente entre si. Porém, observa-se que ocorreu colonização mesmo sem adição de P, e também nas maiores doses adicionadas (800 mg kg⁻¹).

É importante salientar, que o teor ótimo de P no solo para a máxima eficiência do fungo não é suficiente para a produção econômica das mudas. Soares (1986) cita em seu trabalho que os teores de P usados na formação das mudas de eucalipto em viveiro é alto e inibe a colonização do fungo. Vieira et al (1988), verificaram que a colonização das raízes de *Eucalyptus grandis* pelo *Pisolithus tinctorius* foi significativamente inibida pelo teor de P extraível do solo superior à 11,1 ppm; o que não ocorreu neste trabalho, pois na maior dose de P extraível por Mehlich-1 (310 mg kg⁻¹) a colonização foi de 56,51%.

Não foi observada colonização ectomicorrízica no tratamento testemunha sem inoculação, o que evidencia a ausência de contaminação entre os tratamentos.

Os resultados aqui obtidos, sugerem a possibilidade de inocular as mudas de *E. grandis* no viveiro, para que o fungo possa ser levado ao campo com grande probabilidade de

contribuir para o bom estabelecimento e desenvolvimento das mudas. Considerando que as mudas de eucalipto são normalmente produzidas em níveis altos de P, estes resultados evidenciam que, provavelmente, para seleção de fungos mais eficientes, deverão ser utilizados dois níveis de P; o nível ótimo para a máxima eficiência simbiótica, onde serão selecionados os fungos mais eficientes, e um nível mais alto, onde será constatada a capacidade daqueles fungos de formarem micorrizas em solos com níveis maiores de P disponível.

Diante da grande variabilidade ecotípica encontrada entre isolados de uma mesma espécie de fungo ectomicorrízico (TRAPPE, 1977), poderá haver um comportamento diferenciado entre os microssimbiontes quando colocados nesses dois níveis de fósforo.

A seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes seria feita, portanto, com base na capacidade simbiótica demonstrada em baixo nível de P e na capacidade de formar micorrizas em um nível maior de P disponível.

As concentrações de P adicionado de 25 e 50 mg kg⁻¹ promoveram maior percentagem de colonização nas mudas inoculadas (75,74% e 75,71%) respectivamente. Além disso, pode-se observar um comportamento linear decrescente na colonização das raízes das mudas de *E. grandis* pelo isolado UFSC- Pt 116, em resposta ao aumento da dose de P adicionado ao substrato de plantio. A análise de regressão indicou uma correlação negativa entre as diferentes concentrações de P aplicadas no substrato de plantio e os valores de colonização das mudas de *E. grandis* inoculadas com o isolado UFSC-Pt 116.

Souza (2003), trabalhando com vários isolados de fungos ectomicorrízicos, verificou que as doses de P adicionados de 40 e 80 mg kg⁻¹ que eram consideradas as maiores, inibiram a colonização micorrízica das mudas de *E. dunnii*, com exceção das mudas inoculadas com o isolado UFSC - Pt 116 a 40 mg kg⁻¹. Vieira et. al (1988), verificaram que a maior taxa de colonização das mudas de *E. grandis* inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, ocorreram nas doses de 23,47 e 94 ppm de P adicionado.

4.1.2 – Colonização micorrízica das mudas de *E. grandis* produzidas em amostras de Neossolo Quartzarênico.

O isolado de fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt 116) colonizou as raízes do *E. grandis*, produzidas no substrato Neossolo Quartzarênico, com diferente grau de intensidade, variando com a dose de P adicionado (Figura 3.3).

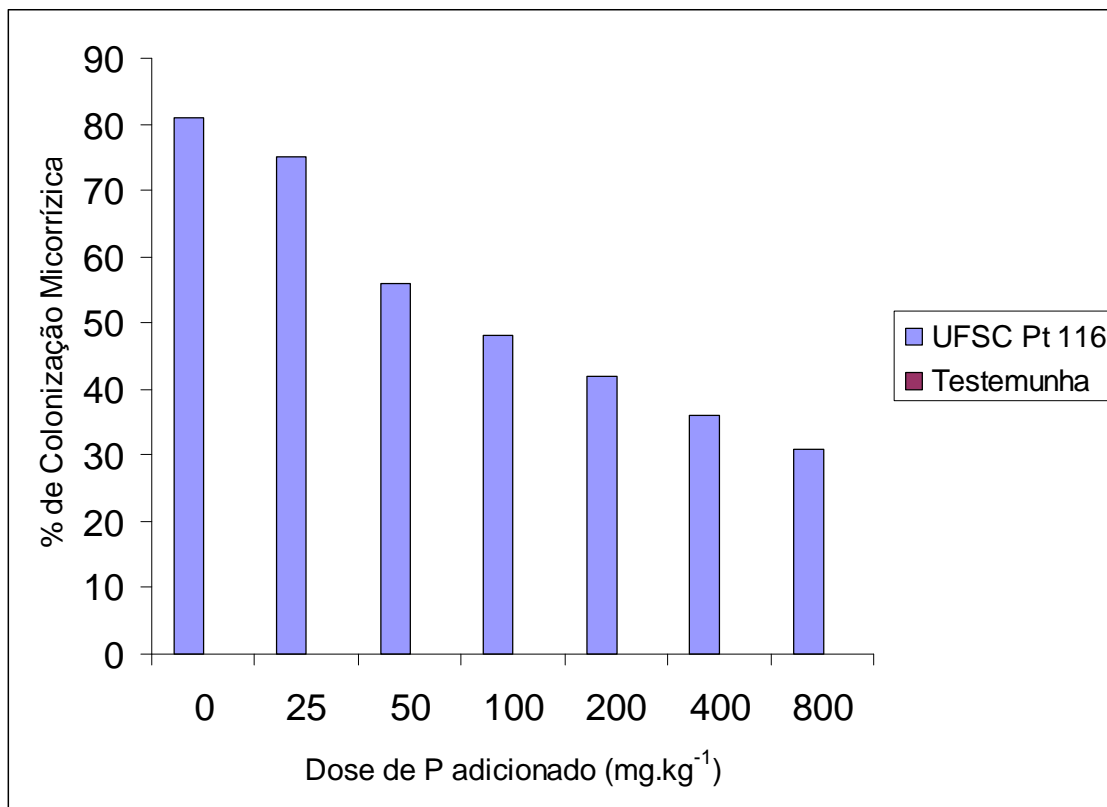


Figura 3.3 - Relação entre a dose de P adicionado e a percentagem de colonização de mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, sob condições de casa de vegetação em amostras de Neossolo Quartzarênico.

A maior colonização das raízes, se deu nas menores doses de P adicionado e extraível por Mehlich – 1, sendo que nas doses de 25 e 50 mg kg⁻¹, a percentagem de colonização foi de 75 e 56% respectivamente, diferindo significativamente entre si.

Neste substrato, a taxa de colonização das raízes das mudas pelo fungo, foi menor do que no substrato turfa fértil. Este fato, pode ser atribuído às diferenças de pH dos substratos, uma vez que os *Pisolithus* sp preferem solos com teores de pH na faixa entre 6,0 e 6.5 (BRUNDRETT, 1996).

4.1.3 Altura e diâmetro do colo das mudas de *E. grandis* produzidas no substrato turfa fértil.

O crescimento das mudas de *E. grandis* não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), avaliado pela altura e diâmetro do caule respondeu positivamente à adição de P, aumentando com o valor da dose adicionada (Tabela 3).

Tabela 3 - Altura e diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Pisolithus microcarpus* (UFSC - Pt 116), no substrato turfa fértil, aos 120 dias após a germinação, na presença de diferentes doses de fósforo, sob condições de casa de vegetação. (Média de 10 repetições).

Doses de P adicionado	P extraível (Mehlich-1)	Altura		Diâmetro	
		Testemunha	UFSC Pt 116	Testemunha	UFSC Pt 116
Mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹				
0	0,5	18,6 Bc ¹	31,1 Aa	2,6 Bc	4,5 Aa
25	4,8	18,7 Bc	28,9 Ab	2,8 Bc	4,5 Aa
50	8,8	23,6 Bc	28,1 Ab	3,5 Bb	4,5 Aa
100	15,4	24,5 Bc	25,5 Ab	3,8 Ab	3,9 Ab
200	33,0	24,8 Bc	24,6 Bb	3,9 Aa	3,8 Ab
400	140,0	29,2 Ab	24,1 Bb	4,0 Aa	3,7 Bb
800	310,0	30,6 Aa	20,1 Bc	4,2 Aa	3,6 Ab

¹Médias seguidas pela mesma letra, na linha (maiúscula) ou na coluna (minúscula), não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<-0,05).

- * significatio (p<_0,5); ** não significativo (p<_0,01).
- Equações de regressão: **Altura da Testemunha:** $Y = 19,635 + 4,0062X - 0,4905X^2$, $R^2 = 0,7733$ *
Altura do UFSC Pt 116: $Y = 21,852 + 4,1409 X - 0,4218 X^2$, $R^2 = 0,9245$ **
Diâmetro da Testemunha: $Y = 3,5269 + 0,3307X - 0,0304X^2$, $R^2 = 0,824$ *
Diâmetro do UFSC Pt 116: $Y = 3,1759 + 0,188X$, $R^2 = 0,5033$ **

As mudas inoculadas com o isolado UFSC-Pt 116 apresentaram altura superior à das mudas do tratamento testemunha, até a dose de 100 mg kg⁻¹ de P adicionado e 15,4 mg kg⁻¹ de P disponível por Mehlich -1, característica típica de mudas inoculadas e não inoculadas com fungos micorrízicos.

Houve uma correlação positiva entre altura das mudas inoculadas com as não inoculadas nas diferentes concentrações de P adicionado.

Nas mudas inoculadas com o UFSC- Pt 116, observa-se que quanto maior a dose de P, menor a sua altura, independente da taxa de colonização. Segundo HARLEY (1978), a ausência de efeitos das ectomicorrizas no crescimento das plantas na presença de altos níveis

de P está provavelmente relacionada a um dreno de fotossintatos do hospedeiro pelo fungo micorrízico.

Nas mudas inoculadas, a maior altura (31,1 cm), se deu na dose 0 de P adicionado (0,5 mg kg⁻¹ Mehlich -1), seguida das doses de 25 e 50 mg kg⁻¹, e nas não inoculadas, a maior altura ocorreu na dose 800 mg kg⁻¹ (30,6 cm). Isto se deve ao fato, que a fertilidade do substrato, na ausência de isolado de fungo ectomicorrízico, foi suficiente para promover o maior crescimento das mudas.

Houve um incremento no diâmetro do caule das mudas de *E.grandis* com o aumento do teor de P nas mudas não inoculadas sendo possível observar diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação de fungo ectomicorrízico. (Tabela 3).

As análises de regressão indicam uma correlação negativa entre o diâmetro do caule das mudas de *E.grandis* inoculadas com o *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), e as diferentes concentrações de P adicionado.

4.1.4 Altura e diâmetro do caule das mudas de *E. grandis* produzidas no substrato Neossolo Quartzarênico.

O crescimento das mudas não inoculadas com UFSC Pt 116, avaliado pela altura e diâmetro do caule respondeu positivamente à adição de P, aumentando com o valor da dose adicionada (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Altura e diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Pisolithus microcarpus* (UFSC - Pt 116), em amostras de Neossolo Quartzarênico, aos 120 dias após a germinação, na presença de diferentes doses de fósforo, sob condições de casa de vegetação. (Média de 10 repetições).

Doses de P adicionado	P extraível (Mehlich-1)	Altura		Diâmetro	
		cm		mm	
mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	Testemunha	UFSC Pt 116	Testemunha	UFSC Pt 116
0	0,3	12,8 Bb ¹	19,0 Aa	2,6 Ac	2,9 Ac
25	3,7	13,2 Bb	17,7 Ab	2,8 Ac	2,9 Ac
50	7,5	14,5 Bb	16,5 Ab	3,6 Ab	3,9 Ab
100	13,2	15,2 Bb	15,8 Bb	3,7 Ab	3,7 Ab
200	21,0	16 Aa	14,9 Bb	4,5 Aa	4,5 Aa
400	110,0	16,8 Aa	14,4 Bb	4,0 Aab	4,4 Ba
800	280,0	17 Aa	12,5 Bc	4,5 Aab	4,6 Aa

¹Médias seguidas pela mesma letra, na linha (maiúscula) ou na coluna (minúscula), não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<-0,05).

* significativo (p<_0,5); ** significativo (p<_0,01); ^{ns} não significativo a 5%.

- Equações de regressão: **Altura da Testemunha:** $Y = 19,635 + 26,739X + 0,6241X^2$; $R^2 = 0,2702$ ^{n.s}
Altura do UFSC Pt 116: $Y = 19,580 + 4,0241 X - 0,3966 X^2$, $R^2 = 0,8637$ ^{**}
Diâmetro da Testemunha: $Y = 3,1628 + 0,1689X$; $R^2 = 0,4845$ ^{ns}
Diâmetro do UFSC Pt 116: $Y = 3,0502 + 0,6677X - 0,0617X^2$, $R^2 = 0,7839$ ^{ns}

As mudas inoculadas com o isolado UFSC Pt 116, apresentaram altura superior à das mudas do tratamento testemunha até a dose 100 mg kg⁻¹ de P adicionado e 13,2 mg kg⁻¹ de P extraível por Mehlich-1 (Tabela 3.1), seguindo o padrão de crescimento das mudas produzidas no substrato turfa fértil (Tabela 3).

Nas mudas inoculadas com o isolado UFSC Pt 116, observa-se que quanto maior a dose de P adicionado, menor sua altura, mostrando o efeito detrimental do P no estabelecimento da colonização das mudas de *E.grandis* pelo isolado UFSC Pt 116.

O crescimento micotrófico das mudas inoculadas, somente foi maior, nos tratamentos onde o P extraível era de 13,2 mg kg⁻¹, apesar das elevadas taxas de colonização das mudas.

Houve um incremento no diâmetro do caule das mudas de *E.grandis* com o aumento do teor de P adicionado nas mudas não inoculadas e inoculadas com o isolado UFSC Pt116, sendo possível observar diferenças significativas entre os tratamentos.

Com base nos resultados aqui encontrados, evidencia-se a importância de se produzir mudas de *Eucalyptus grandis* em viveiros, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos. Neste trabalho, o *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), foi eficiente em promover o melhor crescimento das mudas em diferentes substratos e doses de fósforo.

A máxima eficiência simbiótica do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) foi verificada até a dose de P adicionado de 100 mg kg⁻¹ (15,4 mg kg⁻¹ de P extraível Mehlich-1) no substrato turfa fértil e de 13,2 mg kg⁻¹ de P extraível Mehlich – 1 no Neossolo Quartzarênico, confirmando a indicação de SOARES et al., (1990).

A eficiência deste isolado tende a ser maior em menores doses de P adicionado, porém, não foi inibido na maior dose de P adicionado de 800 mg kg⁻¹, onde colonizou as raízes de *Eucalyptus grandis*, em ambos os substratos.

Sendo assim, foi escolhido o substrato turfa fértil e a dose de P adicionado de 50 mg kg⁻¹ como sendo os melhores tratamentos para a produção de mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) em casa de vegetação, e também, para serem levadas à campo, em áreas de baixa fertilidade, em Neossolo Quartzarênico ocorrentes no município de São Francisco de Assis – RS, (Ver capítulo 4).

5 CONCLUSÕES

O isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) mostrou-se eficiente na promoção do crescimento das mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes substratos e doses de fósforo.

A máxima eficiência simbiótica do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) foi verificada até a dose de P adicionada de 100 mg kg⁻¹ (15,4 mg kg⁻¹ de P extraível Mehlich-1) no substrato turfa fértil, e de 13,2 mg kg⁻¹ de P extraível por Mehlich – 1 no Neossolo Quartzarênico.

A eficiência deste isolado tende a ser maior em menores doses de P adicionado, porém, não foi inibido na maior dose de P adicionado de 800 mg kg⁻¹ onde colonizou as raízes de *Eucalyptus grandis*, em ambos os substratos.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, J. R. et al. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.2, p.307-313, 2001.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra:ACIAR, 374p. 1996 (monograph, 32).

BRUNDRETT, M.; MALAJAZUK, N. MINGQIN, X.D.; SNELLING, S.; DELL, B. Nursery inoculation of *Eucalyptus* seedlings in Western Austrália and Southern China using spores and mycelial inoculum of diverse ectomycorrhizal fungi from different climatic regions. **Forest Ecology and Management**, v.209, p.193-205, 2005.

BRUNNER, I. Ectomicorrizas: their role in Forest ecosystem under the impact of pollutants. **Perspectivas in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. v.4, n.1. p.13-17, 2001.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre, 2004.400p.

FURTADO, D. F. Sistemas de análise estatística para dados balanceados. Lavras:UFLA/DEX/SISVAR, 145p, 2000.

GIOVANETTI, M.G.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v.84, n.3, p.489-500, 1980.

GOMES, J.M.; COUTO, L.; LEITE, H.G.; XAVIER, A.; GARCIA, S.L.R. Crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes tamanhos de tubetes e fertilização com NPK. **Revista Árvore**. v.27, n.2, p.113-127, 2003.

GOMES, J.M.; COUTO, L.; LEITE, H.G.; XAVIER, A.; GARCIA, S.L.R. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.26, n.6, p.655-664, 2002.

GOMES, J.M.; COUTO, L.; LEITE, H.G.; XAVIER, A.; GARCIA, S.L.R. Crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes tamanhos de tubetes e fertilização N-P-K. **Revista Árvore**. v.27, n.2, p.113-127, 2003.

GRACIANO, C.; GUIAMÉT, J.J.; GOYA, J.F. Impact of nitrogen and phosphorus fertilization on drought responses as *Eucalyptus grandis* seedlings. **Forest Ecology and Management**. v.212, p.40-49, 2005.

HARLEY, J.L. Ectomicorrizas as nutrient absorbing organs. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.203, p. 1-21, 1978.

HOGBERG, P. et al. Natural C13 abundance reveals trophic status of fungi and host origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.96, p.8534-8539, 1999.

KORMANIK, P.P.; MCGRAW, A.C. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: SCHENK, N.C. (eds). **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982, p.37-45.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**. v.59, n.2, p.153-163, 1969.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 605 p, 1997.

SOARES, I. Níveis de fósforo no desenvolvimento de ectomicorrizas por *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch e no crescimento de mudas de *Eucalyptus*. 1986; 51p. Dissertação (Mestrado), UFV, Viçosa, 1986.

SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; BELLEI, M.M. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.14, p.327-332, 1990.

SOUZA, L.A.B. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2003.100p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFSC, Florianópolis, 2003.

TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.15. p 203-222, 1977.

VIEIRA, R.F.; PERES, J.R.R. Definição do teor de P no solo para máxima eficiência da associação ectomicorrizica em *Eucalyptus grandis*. **Revista Bras. Ci. Solo**, v 12, p 237-241, 1988 b

VIEIRA, R.F; PERES, J.R.R. Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para *Eucalyptus grandis*. **Revista Bras. Ci. Solo**. v.12, p 231-235, 1988 a.

CAPITULO 4 – ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE *Eucalyptus grandis* HILLEX MAIDEN MICORRIZADA COM *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) EM SOLO SUJEITO À ARENIZAÇÃO

1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas na sua formação com o isolado de fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), após o transplante para uma área sujeita à arenização no município de São Francisco de Assis – RS. A área foi dividida em 4 blocos, cada qual com 4 tratamentos (turfa fértil com fungo, turfa fértil sem fungo, Neossolo Quartzarênico com fungo, Neossolo Quartzarênico sem fungo). Cada parcela foi composta por 16 mudas dispostas em 4 linhas no espaçamento de 1,5 m x 1,5 m, totalizando em cada bloco 64 mudas. Aos 90 dias após o plantio no campo, as mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas no substrato turfa fértil com fungo, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%, enquanto que as produzidas em turfa fértil sem fungo a taxa de sobrevivência foi de 92,18%. As mudas produzidas no Neossolo Quartzarênico com fungo e sem fungo, tiveram uma taxa de sobrevivência variando em torno de 98,43 e 89,06% respectivamente. Em todas as avaliações as mudas produzidas com turfa e fungo, foram as que apresentaram maior crescimento em altura, diâmetro do caule, e as que acumularam maior quantidade de nutrientes na parte aérea das mudas. Este trabalho evidencia que mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas em substrato turfa fértil e micorrizadas com o isolado *Pisolithus microcarpus*, conseguem manter bom desenvolvimento no campo, apresentando-se bem adaptadas para áreas arenosas do município de São Francisco de Assis - RS.

Palavras chave: Fungos ectomicorrízicos, fósforo e areais.

2 INTRODUÇÃO

O eucalipto têm a capacidade de formar dois tipos de micorrizas, a arbuscular e a ectomicorriza (ZAMBOLIM & BARROS, 1982), sendo predominantemente as ectomicorrizas responsáveis no estabelecimento dessas espécies em solos pobres em nutrientes. A presença destes fungos nas mudas, favorecem o estabelecimento e sobrevivência da planta no campo, pelo aumento na capacidade de absorção de nutrientes, aumento na longevidade de raízes, proteção contra patógenos, aumento no rendimento de massa seca e na absorção de fósforo (BARROS, 1978).

A necessidade de produzir mudas destinadas à áreas específicas, com características definidas, se deve ao fato de que estas mudas, são geralmente frágeis, necessitando de proteção inicial e de manejo adequado para se obter maior uniformização de crescimento.

Para que haja êxito na implantação das mudas de Eucalipto, em áreas com condições precárias, há necessidade de que elas cresçam em substrato com nutrientes suficientes para o arranque inicial, mas com fósforo abaixo do limite que dificulte a sua colonização com ectomicorrizas, para que a colonização ocorra e sobreviva pós plantio.

A importância dos fungos ectomicorrízicos para o crescimento e desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* está bem documentada, porém embora experimentos em casa de vegetação constatarem a necessidade de inoculação das mudas, são poucos os trabalhos que demonstram a adequabilidade desta inoculação para melhorar o desempenho das mudas no campo.

Os fungos ectomicorrízicos são fisiológica e ecologicamente diversos, e uma forte variação ecotípica é encontrada entre isolados de uma mesma espécie (TRAPPE, 1977). Baseado na variação existente entre os fungos micorrízicos em colonizar as mudas de *Eucalyptus*, é necessário que, após ter selecionado o isolado, estes devam ser testados quanto a sua eficiência na promoção do crescimento das mudas no campo, em especial nas áreas de implantação do povoamento.

A Sudoeste do Rio Grande do Sul existem áreas com Neossolos Quartzarênicos que estão sujeitas aos processos de arenização. Esta ocorrência é associada ao substrato arenítico, mapeado para a região Sudoeste como formação Botucatu, com cobertura vegetal predominante de gramínea. Moller et al (1975) afirmaram haver no município de São Francisco de Assis, cerca de 432 ha de áreas arenosas. Hoje, avalia-se que já são mais de 5 mil hectares cobertos por dunas, numa área que abrange dez municípios gaúchos, entre eles, São Francisco de Assis, (Kaminski, 2006, comunicação pessoal). A fragilidade desse solo

deriva de sua dificuldade em compensar as perturbações impostas pela ação antrópica, notado pela suscetibilidade natural à erosão hídrica e eólica, que contribuem para sua degradação. Estas características dificultam a utilização econômica e/ou ecológica deste solo. Estas áreas estão sendo destinadas para o plantio de essências florestais, como eucaliptos, pinus e acácia negra. Mas a dificuldade dos solos arenosos em reter água e nutrientes é fator que dificulta a manutenção e o desenvolvimento da vegetação nessas áreas, sendo importante a busca de alternativas, que são baseadas, na produção das mudas em substratos férteis e micorrizadas com fungos ectomicorrízicos.

Este trabalho teve como objetivo, avaliar a sobrevivência e o crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas na sua formação com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), após o transplante para uma área sujeita à arenização no município de São Francisco de Assis – RS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em agosto de 2005, na Fazenda Ynhacundá de propriedade do Sr. Nelci Salbego, situada no 1º Distrito de São Francisco de Assis, no município de São Francisco de Assis – RS, altitude de 62 metros, 23° 13' 25,2" Latitude Sul, 44° 44' 58,7" Longitude Oeste, em uma área sujeita ao processo de arenização. O solo foi classificado como Neossolo Quartzarênico, que apresentou as seguintes características químicas, segundo métodos do Laboratório de Rotina de Análise de Solo da Universidade Federal de Santa Maria: pH = 5,1; Al = 0,5 cmol_c/L; Ca+Mg = 0,5cmol_c/dm³; P=8,0 mg/L (Mehlich – 1) e K = 48 mg/L.

As mudas de *Eucalyptus grandis* Hillex Maiden foram produzidas em casa de vegetação da Universidade Federal de Santa Maria, por 120 dias em tubetes de 50 cm³ de capacidade, constituindo-se de diferentes tratamentos de substrato, doses de fósforo e inoculação de fungo ectomicorrízico, conforme descrito no capítulo 3. Os substratos utilizados na produção das mudas foram turfa fértil e o solo Neossolo Quartzarênico. Neste estudo foi utilizado o P solúvel, na forma de Ca(H₂PO₄)₂.H₂O administrado em solução ao substrato de semeadura, e o fungo inoculado foi o *Pisolithus microcaropus* (UFSC – Pt 116).

As mudas transplantadas no campo, foram as dos tratamentos de substratos x fungo x dose de fósforo, que melhor responderam em casa de vegetação aos parâmetros de crescimentos avaliados, como altura, diâmetro do colo e percentagem de colonização. Estas mudas foram transplantadas em covas de 20 cm x 20 cm e adubadas com NPK 30 10 30, segundo recomendações de GONÇALVES (1994).

O delineamento experimental utilizado no campo foi em blocos ao acaso, com 4 tratamentos (turfa com fungo, turfa sem fungo, Neossolo Quartzarênico com fungo e Neossolo Quartzarênico sem fungo), e 4 repetições. Cada bloco foi composto por 64 mudas, sendo 16 de cada tratamento, dispostas em 4 linhas no espaçamento de 1,5 x 1,5 m.

Após o plantio, as mudas foram irrigadas com 5 litros de água (Figura 4).



Figura 4 - Disposição dos blocos e das parcelas da área experimental no município de São Francisco de Assis – RS.

Devido a presença de formigas saúvas, a cada 15 dias um controle foi realizado na área, aplicando o formicida Klap (Fenil Pirazol) em solução.

As avaliações foram aos 90, 120, 150, 270, 330 e 360 dias após o plantio (DAP), onde avaliou-se a sobrevivência das mudas de *Eucalyptus grandis*, bem como altura e diâmetro do colo das mudas. Aos 120 DAP, foi feita uma nova adubação de NPK 30 10 30 nas covas, colocando-se 100 gramas em cada cova.

Aos 360 dias, foram coletadas três folhas recém maduras, para avaliação dos teores de P, K, Mg e Ca da parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis*.

Estas foram secas a 65° C em estufa com circulação de ar, até atingir peso constante. Foram então moídas e digeridas com extrator nitro-perclórico (2:1) para extração de P, K, Ca e Mg. Os teores de P foram determinados por colorimetria, K por fotometria de chama e Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica.

A colonização micorrízica das raízes e esporulação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no início da instalação do experimento e aos 360 dias após o plantio, também foram determinados.

Na avaliação da colonização micorrízica, as raízes foram observadas a olho nú, e também, clarificadas e coradas, segundo a metodologia de KOSKE & GEMMA (1989) e GRACE & STRIBLEY (1991). A porcentagem do comprimento de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada descrito no trabalho de GIOVANETTI & MOSSE (1980), adaptado à partir do método de medidas de comprimento de raízes de NEWMAN (1966).

Para a quantificação da densidade de esporos dos FMAs, amostras de solos em cada cova, foram coletadas e o processo de extração de esporos se deu pelo método de

peneiramento úmido (GERDEMANN & NICHOLSON, 1963) e centrifugação em sacarose 40% (JENKINS, 1964).

Os dados foram testados quanto a sua normalidade e submetidos à análise de variância e teste de médias (Tukey, 5%), utilizando-se dos procedimentos disponíveis no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No momento do plantio das mudas de *Eucalyptus grandis*, foram encontrados em cada cova, cerca de 25 esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em 50 g de solo analisado. As espécies encontradas foram *Acaulopora scrobiculata* Trappe, *Gigaspora margarita* Becker & Hall; *Glomus clarum* Nicolson & Schenck; *Glomus etunicatum* Becker & Gerdeman e *Scutelospora heterogama* Nicolson & Gerdemann.

Após 360 dias da instalação do experimento, uma nova avaliação da esporulação dos FMAs foi realizada, e encontrou-se cerca de 107 esporos em 50 g de solo analisado, e as espécies identificadas foram as mesmas do início da instalação do experimento. Estes dados, revelam a capacidade dos fungos micorrízicos arbusculares em se multiplicarem nas áreas sujeitas ao processo de arenização.

Quanto às avaliações realizadas, os resultados obtidos mostram diferenças significativas promovidas pelo tipo de substrato e a presença do isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC – Pt 116 sobre a sobrevivência das mudas, altura, diâmetro, e teores de nutrientes na parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis*.

Aos 90 dias após o plantio (DAP) a percentagem de mudas vivas no campo variou entre 89,06 e 100 % (Tabela 4).

Tabela 4 - Sobrevivência nos blocos das mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas em diferentes substratos e inoculadas ou não com fungo ectomicorrízico UFSC – Pt 116, aos 90 dias após o plantio em São Francisco de Assis, - RS.

Tratamento	Número de mudas vivas	% de mudas vivas
Turfa com Fungo	64 a	100,0
Turfa sem Fungo	59 b	92,2
Neossolo com Fungo	63 a	98,4
Neossolo sem fungo	57 b	89,1

Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey 5%.

As mudas inoculadas com fungo apresentaram a maior taxa de sobrevivência no campo. Estes resultados evidenciam a importância da inoculação das mudas de *Eucalyptus grandis* com fungos ectomicorrízicos em sua formação, uma vez, que os fungos as tornam aptas a enfrentarem os fatores bióticos e abióticos que interferem na sua sobrevivência.

Aos 90, 120 e 150 dias após o plantio das mudas de *Eucalyptus grandis* no campo, estas apresentaram diferenças significativas quanto à altura e o diâmetro do caule (Tabela 4.1) e Figura 4.3.

Tabela 4.1 - Altura e diâmetro das mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas em diferentes substratos e inoculadas ou não com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt 116, aos 90, 120 e 150 dias após o plantio em São Francisco de Assis – RS. (Média de 64 mudas).

Tratamento	Altura (cm) e Diâmetro (cm)											
	90 dias		90 dias		120 dias		120 dias		150 dias		150 dias	
Turfa Fértil com Fungo	24,8	a	0,4	a	28,3	a	0,6	a	75,0	a	1,0	a
Turfa Fértil sem Fungo	22,8	b	0,4	a	27,9	b	0,6	a	45,0	b	0,8	a
Neossolo com Fungo	18,2	ab	0,3	a	22,4	ab	0,5	a	25,0	c	0,5	a
Neossolo sem Fungo	14,7	c	0,3	a	18,6	c	0,5	a	21,0	c	0,5	a

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.



Figura 4.1 - Mudanças de *Eucalyptus grandis* inoculadas ou não com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116 aos 120 dias após o transplante no campo. São Francisco de Assis – RS.

As mudas inoculadas com o isolado UFSC Pt 116 e produzidas no substrato turfa fértil, foram as que apresentaram maior crescimento em altura e diâmetro aos 90, 120 e 150 dias após o plantio, seguidas do tratamento turfa fértil sem fungo, Neossolo com fungo e Neossolo sem fungo. Aos 150 dias após o plantio, o diâmetro do caule das mudas do substrato turfa fértil e inoculadas com o isolado UFSC Pt 116, foi duas vezes maior do que nas mudas que foram produzidas no Neossolo sem fungo. Estes resultados comprovam a importância da inoculação das mudas de *Eucalyptus grandis* com o isolado ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), uma vez que as mudas de eucalipto tiveram aumento na altura, diâmetro do caule e taxa de sobrevivência, e resistiram melhor às condições de adversidade presentes nestas áreas, como a seca e a presença de formigas.

A mesma tendência de crescimento foi observada aos 330 e 360 dias após o plantio das mudas (Tabela 4.2) e (Figura 4.4).

Tabela 4.2 - Altura e diâmetro do colo das mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas em diferentes substratos e inoculadas ou não com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt 116, aos 270, 330 e 360 dias após o plantio em São Francisco de Assis – RS (Média de 64 plantas).

Tratamento	Altura (cm) e Diâmetro (mm)											
	270 dias		270 dias		330 dias		330 dias		360 dias		360 dias	
Turfa Fértil com Fungo	110	a	1,5	a	125	a	1,8	a	138	a	2,2	a
Turfa Fértil sem Fungo	94,3	b	1,0	b	95	b	1,1	b	97	b	1,6	b
Neossolo com Fungo	38,6	c	0,8	ab	42	c	0,8	b	59	c	1,1	b
Neossolo sem Fungo	29,6	c	0,6	c	35	c	0,6	b	39	c	1,0	b

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.



Com fungo (UFSC Pt 116)



Sem fungo

Figura 4.2 - Aspectos das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas ou não com fungo ectomicorrízico UFSC Pt 116 aos 360 dias após o transplante no campo. São Francisco de Assis – RS.

Os teores de nutrientes nas folhas das mudas de *Eucalyptus grandis* não variaram significativamente (Tabela 4.3), embora, nos tratamentos com inoculação do UFSC Pt 116, os teores de P, K, Ca e Mg, foram maiores do que nos tratamentos sem a inoculação dos fungos.

Tabela 4.3 - Teores de nutrientes na parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis* 360 dias após o plantio em São Francisco de Assis-RS.

Tratamentos	P g kg ⁻¹	K g kg ⁻¹	Ca g kg ⁻¹	Mg g kg ⁻¹
Turfa com fungo	1,40 a	5,42 a	10,87 a	2,41 a
Turfa sem fungo	1,23 a	4,90 a	8,02 a	2,15 a
Neossolo com fungo	1,35 a	4,45 a	7,38 a	2,24 a
Neossolo sem fungo	1,15 a	5,14 a	9,95 a	1,99 a
CV (%)	22,99	34,19	66,99	56,59

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.

A taxa de colonização micorrízica das raízes também foi analisada aos 360 dias, nas 4 mudas centrais de cada parcela. A taxa de colonização variou de acordo com os tratamentos (Figura 4.5).

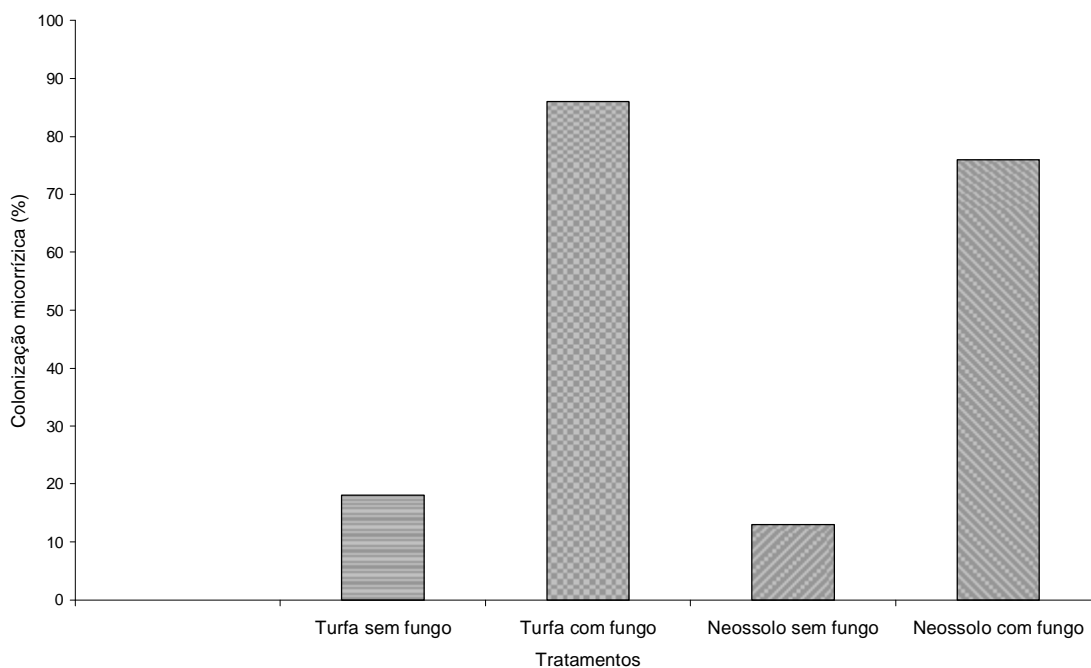


Figura 4.3 - Colonização micorrízica das raízes das mudas de *Eucalyptus grandis* aos 360 dias após o plantio em São Francisco de Assis - RS.

As mudas produzidas com o substrato turfa fértil e com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116 apresentaram 86% de colonização micorrízica em suas raízes, 360 dias após o plantio, sendo a maior taxa de colonização em relação aos demais tratamentos.

As mudas que não foram inoculadas com o fungo no momento de sua produção, aos 360 dias após o plantio, tiveram uma pequena percentagem de colonização micorrízica, variando entre 13 e 18%. Este comportamento é devido à presença de esporos de FMAs presentes na área, o que é comum em cultivos de eucaliptos novos, já que o *Eucalyptus grandis* tem a capacidade de formar simbiose com os dois tipos de micorrizas (arbusculares e ectomicorrizas), até aproximadamente dois anos de idade, sendo a partir daí, a presença das ectomicorrizas predominantes (ZAMBOLIM & BARROS, 1982).

As mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, tiveram um bom desenvolvimento no campo, apresentando-se bem adaptadas para a revegetação das áreas sujeitas à arenização na Região de São Francisco de Assis – RS. Apresentaram rápido crescimento quando as condições hídricas foram abundantes e grande resistência à estiagem, insolação e ataque de formigas. Foram capazes de rebrotar à partir do caule, mesmo quando quase toda a parte aérea havia sido dessecada pelo estresse hídrico ou quando decaptadas por formigas cortadeiras.

Outros aspectos deverão ser estudados no futuro neste experimento, como os teores de nutrientes acumulados na parte aérea das mudas, em especial, o P e N nos folíolos, que poderão indicar melhores efeitos dos tratamentos de inoculação do fungo ectomicorrízico.

5 CONCLUSÕES

As mudas de *Eucalyptus grandis* produzidas com turfa fértil e o isolado de fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, foram as que apresentaram maior taxa de sobrevivência no campo, bem como maior altura, diâmetro do caule e teores de nutrientes seguida das mudas produzidas com Neossolo Quartzarênico com fungo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, N.F.; BRANDI, R.M.; REIS, M.S. Micorriza em eucalipto . Uma revisão sobre a morfologia, a fisiologia e os efeitos mútuos da associação fungo-planta. **Revista Árvore** 2(2).p.130-140, 1978.
- FERREIRA, D.F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras:UFLA/DEX/SISVAR, 145p, 2000.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wt-sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**. v. 46, p. 235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. Na evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytology**. v. 84, p. 489-500, 1980.
- GONÇALVES, J.L.M. **Relatório de pesquisas sobre nutrição mineral de espécies nativas**. Piracicaba. Convênio CESP-ESALQ-IPEF. 1994.25p.
- GRACE, C.; STRIBLEY, D.P. A safer procedure for roution staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**. v.95, n.10, p.1160-1162, 1991.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v.48, p.692. 1964.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v.92, n.4, p.458-488, 1989.
- MOLLER, D.O.; GARCIA, I.S.; GESKE, A.C.S.P.; RANGO, A.T.; ROSA, M.L. **Diagnóstico sobre a presença de areais na região sudoeste do Rio Grande do Sul**. SUDESUL. Porto Alegre, 1975.
- NEWMAN, E.E.J. A method of estimating the total lenght of root sample. **Journal of Applied Ecology**. v.3, p.139-45, 1966.
- TRAPPE, J.M.; FOGEL, R.D. Ecosystematic functions of mycorrhizae. In: The bellow ground ecsystem: A synthesis of plant-associated process. **Rang Science**, v.26.n.3.p.205-244, 1977.
- ZAMBOLIN, L.; BARROS, N.F. Constatação de micorriza vesículo-arbuscular em Eucalyptus spp na região de Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v.6.n.1, p.95-97, 1982.

CAPÍTULO 5 - ESTOQUE DE FÓSFORO EM MUDAS MICORRIZADAS DE *Eucalyptus grandis* HILLEX MAIDEN

1 RESUMO

A eficiência de utilização do P pela planta é dependente do estoque de P metabólico e de P vacuolar. Mudanças de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o isolado de fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) foram produzidas em casa de vegetação, cultivadas em diferentes doses de fósforo para serem avaliadas quanto a acumulação de algumas frações de P (P total solúveis – P_{ts}); P_i (fósforo inorgânico) e P_o (fósforo orgânico) na parte aérea das mudas, pela técnica de fracionamento de fósforo. O conteúdo médio máximo de P na parte aérea nas mudas inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus*, foi atingido nas mudas que receberam as maiores doses de P adicionado. Houve interação entre a dose de P adicionado e o fungo testado. Assim, pode-se observar que em todas as concentrações de P adicionado, os teores de P acumulados na parte aérea das mudas de *E. grandis* inoculadas com o isolado UFSC Pt 116 foram maiores do que nas mudas não inoculadas. A análise de regressão indicou o que padrão de acumulação de P pelas mudas de *E. grandis*, em resposta às diferentes concentrações de P adicionado e à inoculação pelo isolado de fECM, seguiu um padrão linear crescente para plantas não inoculadas, diferente das plantas inoculadas com o isolado UFSC Pt 116. A inoculação com o isolado UFSC Pt 116 reduziu o uso de P inorgânico na produção das mudas de *E. grandis*. O P_o não variou consideravelmente entre as mudas inoculadas ou não com o UFSC Pt 116, e a fração P_i refletiu a capacidade de acumulação do P pelas mudas inoculadas com o isolado UFSC Pt 116.

Palavras-chave: Fósforo metabólico, fósforo vacuolar, fracionamento de fósforo.

2 INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm sido realizados visando identificar e avaliar fatores responsáveis pelas diferenças na eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo (P) em plantas. A identificação dos fatores responsáveis por estas diferenças, contribuí decisivamente para a compreensão dos aspectos e mecanismos envolvidos na adubação fosfatada das plantas.

Na avaliação do “status” nutricional das plantas utiliza-se um conceito básico, o de concentração crítica. Embora FRITZ (1976), defina como a concentração mínima de um nutriente na planta, quando o crescimento máximo é atingido, correspondendo, na realidade, mais a uma estreita zona de transição do que a um ponto definido. Bates (1971) alerta que das variações decorrentes de diferenças entre espécies ou cultivares, a concentração crítica pode variar com o tecido e com a idade do tecido vegetal escolhido para análise, com a forma do nutriente considerado, com a interação entre nutrientes e com as condições ambientais.

Muitas plantas inferiores acumulam e armazenam quantidade significativa de fosfato inorgânico como polifosfatos, enquanto que plantas superiores geralmente armazenam Pi no vacúolo. Em plantas superiores o Pi citoplasmático é mantido em um nível relativamente constante, as custas do Pi vacuolar. A concentração do P citoplasmático é geralmente mantida sob variados níveis de fornecimento de fósforo externo. Os níveis de Pi vacuolar diminuem a medida que o fornecimento externo baixa. A maioria do P celular (85 a 95%) é tipicamente encontrada no vacúolo, quando há alta disponibilidade de P no solo, por isso a concentração de P na solução do solo é fator capaz de influenciar diretamente a absorção de P e seu acúmulo na parte aérea das plantas (THOMAS et al., 2006).

A concentração de (Pi) no citoplasma é regulada pelo seu conteúdo no vacúolo, podendo haver, em algumas espécies biossíntese de polifosfatos nessas organelas como forma alternativa de acumular Pi. As acentuadas mudanças no conteúdo de Pi das células ocorrem quase exclusivamente no “pool” vacuolar, não havendo alterações significativas no “pool” citoplasmático (BIELESKI, 1973; CHAPIN et alii. 1982; LEFEBRIRE & GLASS, 1982; LICHKO et alii, 1982; LEE & RATCLIFFE, 1983). Por isso o Pi vacuolar teria, fundamentalmente, uma função de reserva. Se, por quaisquer circunstâncias, a quantidade de P absorvida for menor que sua demanda pela célula, o Pi do vacúolo retorna ao citoplasma atendendo à exigência metabólica da célula (BIELESKI & FERGUSON, 1983). Como se observa a planta possui mecanismos regulatórios capazes de tamponar internamente o P absorvido, e assim, manter o equilíbrio Pi vacuolar – Pi citoplasmático.

Portanto, em situações que restringem a absorção de P, a planta tem no seu conteúdo de Pi vacuolar uma reserva de P capaz de ser mobilizada para manter seu ritmo metabólico de crescimento. Por outro lado, quando o ritmo de crescimento for lento, e portanto, a demanda de P for pequena, um aporte elevado deste à planta resultará em grande acúmulo de Pi vacuolar (BIELESKI & FERGUSON, 1983).

A existência de correlações negativas entre os níveis críticos de P total (Pt) e características do solo associadas à capacidade tampão de P, à semelhança do que se observa quanto aos níveis críticos deste elemento no solo, constatada por MUNIZ et alii (1985), mostra a importância de se proceder a uma melhor caracterização do P na planta, principalmente Pi e P orgânico (Po), para se ter um indicador preciso de seu “status” em P e, indiretamente, da disponibilidade deste elemento no solo. Fato que corrobora com a importância e a variação, encontrada na literatura, de concentração crítica de P em plantas, ainda quando se considera uma mesma cultivar.

Thomas et al., (2006) estudando o comportamento das frações celulares de P sobre parâmetros fotosintéticos e acúmulo de biomassa do *Eucalyptus grandis*, relatam que todos os parâmetros de crescimento, são favorecidos com o aumento do Pi, mas os teores de P total e P citoplasmático não se alteram. Por isso, o Pi vacuolar é potencialmente um melhor indicador de crescimento e desenvolvimento de mudas de eucalipto do que o P total, que é costumeiramente usado para avaliar o seu estado nutricional.

A concentração baixa de Pi disponível na solução do solo e a alta demanda por Pi nas células propõem um problema único para as plantas. O P requerido para um crescimento ótimo dos vegetais varia durante o estágio de crescimento vegetativo. A concentração de Pi no citosol é geralmente em variação milimolar e, portanto, as raízes devem adquirir o Pi contra um gradiente de concentração, mil vezes ou mais, através da membrana plasmática.

A homeostase do fosfato no citoplasma é mantida pelo transporte de Pi através do tonoplasto, ativado em resposta às alterações da concentração de fósforo. O transporte de Pi através do tonoplasto requer ATP, e está associado com a alcalinização do citoplasma. O vacúolo aparentemente exerce um duplo papel de fonte e dreno para Pi em células vegetais.

Há no mínimo para as plantas, dois diferentes mecanismos sinalizadores para manutenção da homeostase do Pi sendo um operando a nível celular e outro envolvendo órgãos múltiplos, provavelmente originário da parte aérea. Celularmente, o movimento do Pi é em direção ao vacúolo e a regulação do influxo e efluxo da membrana plasmática são os principais mecanismos para a manutenção da homeostase do Pi. Quando o fornecimento de Pi da parte aérea para as raízes é restrito, sob deficiência de Pi, o Pi armazenado em folhas

velhas é remobilizado e transportado para folhas mais jovens e outros drenos ativos. As raízes são geralmente consideradas como uma fonte de Pi para as outras partes da planta, tornando-se um dreno durante a depleção do Pi. Isso parece ser uma resposta adaptativa da planta visando promover a proliferação de raízes e assim aumentar a exploração do solo e absorção do Pi.

Muitos trabalhos têm sido focados no conteúdo pelo qual o vacúolo, como um potencial armazenador de Pi, pode contribuir para a manutenção do pool citoplasmático sob diferentes condições fisiológicas. Investigações detalhadas de tecidos radiculares têm mostrado que o nível do Pi citoplasmático pode ser mantido às custas do pool vacuolar, em resposta à depleção de P, em um curto período de tempo, durante o crescimento normal (LEE et al., 1990; LEE & RATCLIFFE, 1993) enquanto que uma demanda repentina do Pi citoplasmático, induzida por exemplo, pela absorção e fosforilação da manose, pode exaurir o pool citoplasmático na presença de um pool citoplasmático substancial (LOUGHMAN et al. 1989 a, b).

Além do fracionamento do fósforo, o uso da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) nestes estudos são constantes. Esta técnica tem sua origem nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. Muitos elementos, incluindo os de importância biológica, apresentam isótopos com momentos magnéticos, e esses isótopos dão origem a uma rede de magnetização que pode ser detectada espectroscopicamente usando irradiação de frequência de rádio. A espectroscopia de RMN possibilita a detecção de vários íons e metabólicos no funcionamento dos tecidos vegetais (RATCLIFFE & ROBERTS, 1990).

Os isótopos de maior interesse para estudos de RMN com nutrientes essenciais de plantas são o ^{14}N , ^{15}N , ^{31}P e ^{39}K . Conforme RATCLIFFE (1986) estudos, usando técnicas de RMN, podem possibilitar a exploração das diferenças na composição do pH citoplasmático e vacuolar, podendo-se, então fazer deduções referentes aos pools citoplasmáticos e vacuolar de um íon ou metabólico.

Segundo RATCLIFFE (1987) a diferenciação do pH entre o citoplasma e o vacúolo, junto com a lenta troca do fosfato através do tonoplasto, permitem a detecção de dois diferentes sinais claramente determinados, indicando os pools citoplasmático e vacuolar, no espectro de RMN da maioria dos tecidos vegetais. Assim, conforme LEE & RATCLIFFE (1983), a RMN do ^{31}P fornece um importante método para o estudo dos pools citoplasmático e vacuolar, sob diferentes condições nutricionais e em resposta a diferentes modelos da utilização de fósforo.

Lee & Ratcliffe (1993), salientam que uma das vantagens do método de RMN ^{31}P é que as alterações nos pools citoplasmáticos e vacuolar podem estar correlacionadas com outros parâmetros metabólicos, incluindo os valores do pH citoplasmático e vacuolar e o nível de muitos metabólicos fosforilados incluindo o nucleosídeo trifosfato (NTP).

Segundo ROBERTS et al. (1980) e ROBERTS (1985) uma maneira para examinar a distribuição do Pi entre o vacúolo e o citoplasma é com a técnica da RMN ^{31}P , sendo que esta técnica permite diferenciar entre os pools citoplasmático e vacuolar de fósforo, devido a diferença do pH das moléculas de Pi. Tipicamente, o pH vacuolar é 5,5 e o do citoplasma é de aproximadamente 7,0, produzindo uma mudança do espectro de Pi para cerca de 1,5 ppm. O gradiente de pH permite diferenciar o Pi entre os pools citoplasmático e vacuolar.

Estima-se que 90% do Pi da folha pode ser seqüestrado no vacúolo e que o fosfato vacuolar é lentamente liberado para o citoplasma e, portanto, não é prontamente disponível para o metabolismo vegetal.

Dependendo da quantidade de P no tecido, por adição ou supressão de Pi em um meio de cultura, pode-se observar, através da RMN ^{31}P , que com a diminuição do fornecimento de P, o pico do P vacuolar diminui, enquanto que o P citoplasmático permanece relativamente constante. Porém, com o aumento da concentração de Pi, em células originalmente deficientes em P, observa-se um aumento do P vacuolar, enquanto que o P citoplasmático permanece relativamente constante, sugerindo que nesse sistema, o P citoplasmático é mantido em níveis relativamente constante.

Este trabalho, teve o objetivo de avaliar o estoque de P em folhas de mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, e produzidas em diferentes doses de fósforo, através do método de fracionamento de fósforo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação do substrato de plantio das mudas de *Eucalyptus grandis*.

O substrato de plantio foi composto pelo substrato turfa fértil produzido pela empresa Floresta S.A. A composição do substrato foi de turfa, perlita, calcário aditivado com fertilizante natural, apresentando as seguintes características químicas: pH = 6,5; P = 39,55 mg L⁻¹; K = 82 mg L⁻¹; Al = 0, Ca = 5,3 cmol_c L⁻¹ e Mg = 3,3 cmol_c L⁻¹. A proporção do substrato foi de turfa-vermiculita (1:3) (v/v). O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a 121° C, durante 60 minutos, três vezes consecutivas, com um intervalo de 24 horas entre cada esterilização. No substrato, foi adicionada solução nutritiva contendo os seguintes elementos (mg kg⁻¹), baseados em ALVES et al., (2001): K, 16; Mn, 0,15; Mg, 3; Zn, 0,0375; Cu, 0,125; Mo, 0,05; B, 0,05 e Fe, 0,375.

3.2 Fósforo

Para o fósforo foram testadas seis doses adicionadas no substrato de plantio: 0; 50; 100, 200, 400, 800 mg kg⁻¹, o que representa 0,5; 8,8; 15,4; 33,0; 140; 310 mg kg⁻¹ de P extraível por Mehlich – 1, com base nos resultados obtidos no capítulo 3 desta tese. Neste estudo, foi utilizado P solúvel, na forma de Ca(H₂PO₄)₂H₂O, administrado em solução ao substrato de plantio das sementes.

3.3 Sementes

As sementes de *Eucalyptus grandis* foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO. As mesmas foram pré germinadas durante três dias sob agitação. Para isso, foram inicialmente desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, lavadas em água destilada, e transferidas para uma solução de germinação de ácido bórico (3µM), glicose (2 gL⁻¹) e sulfato de cálcio (500 µM), a pH 5,7.

3.4 Montagem e condução do experimento.

A inoculação do *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) foi no momento da semeadura, adicionando-se 10% (v/v) do inoculante, previamente lavado com água destilada estéril (Alves et al., 2001). A homogeneização do inóculo foi feita manualmente, com uso de luvas descartáveis. O tratamento testemunha recebeu a mesma quantidade da mistura turfa-

vermiculita-MNM não inoculada, e submetida às mesmas condições de manutenção que o inoculante.

Os substratos inoculados foram distribuídos em tubetes cônicos de PVC de 50 cm³, previamente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio 1%. Os tubetes foram etiquetados de acordo com o tratamento e distribuídos em bandejas aleatoriamente. Cada tubete recebeu 5 sementes de *E. grandis*, depositadas a aproximadamente 1 cm de profundidade, que foram recobertas com o substrato. Para cada combinação de substrato x isolado fúngico e dose de P, foram feitas 10 repetições. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com rodízio semanal dos tubetes. Quatro semanas após o plantio, quando as mudas já estavam com um par de folhas definitivas, foi feito o desbaste, deixando-se uma muda por tubete.

As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 120 dias e irrigadas diariamente com água destilada (Figura 5).



Figura 5. Mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) aos 120 dias após a germinação em casa de vegetação.

3.5. Avaliação

Após quatro meses de crescimento, as mudas de *Eucalyptus grandis* foram colhidas, sendo que cinco mudas tiveram sua parte aérea seca à 70° C em estufa com ventilação forçada até peso constante, trituradas em moinho tipo Wiley, e analisadas quanto ao teor de fósforo no extrato, segundo BRAGA E DEFELIPO (1974). As outras 5 plantas, foram utilizadas para o fracionamento de fósforo, tomando-se para tal, amostras de folhas fisiologicamente maduras. Para esse procedimento, utilizaram-se as mudas correspondentes a seis níveis de P

adicionados (0, 50, 100, 200, 400 e 800 mg kg⁻¹) inoculadas e não inoculadas com o isolado UFSC Pt 116.

O método de fracionamento utilizado, com modificações, foi o de SMILE & KRATKOW, descrito por HOGUE et al (1970). Neste trabalho, foram obtidas as seguintes frações: fósforo total solúvel (Pts), fósforo inorgânico solúvel (Pi) e fósforo orgânico solúvel (Po), além do fósforo total pela digestão nitroperclórica.

3.6. Extração de P através do ácido perclórico (HClO₄).

As folhas de *Eucalyptus grandis*, dos diferentes tratamentos com inoculação e sem inoculação do isolado UFSC Pt 116, foram coletadas, lavadas e picadas. A esse material foi adicionado 15 mL de HClO₄ 0,2 N para cada grama de matéria fresca, e após realizou-se o congelamento a -20° C durante 3 dias.

Passado os 3 dias, o material foi descongelado e homogeneizado com o auxílio de um liquidificador. A densa massa resultante foi centrifugada a 3° C a 15.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi neutralizado com bicarbonato de potássio (KHCO₃) na relação 1:2, obtendo-se assim, o extrato para determinação do Pi. Desse mesmo extrato, 10 mL foram submetidos à digestão com ácido perclórico, obtendo-se novo extrato, centrifugando a 10.000 g durante 10 minutos. Deste extrato, quantificou-se o Pts. Pela diferença entre Pts e Pi, obteve-se o Po.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto a sua normalidade, submetidos a análise de variância e modelos de regressão, segundo ferramentas disponíveis no software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Modelos de regressão foram ajustados para os dados de produção de matéria seca como variável dependente de P para cada tratamento. Nos tratamentos em que foram obtidas equações quadráticas, estimou-se as doses críticas de P necessária à obtenção de 90% da produção máxima. Para os tratamentos em que foram obtidas equações de regressão lineares, adotou-se o critério de 100% da maior produção para estimar as doses de P correspondentes a estas produções.

Foram também, ajustadas equações de regressão para as diversas frações de P avaliadas na muda como variáveis dependentes das doses de P testadas, para cada tratamento. Pela substituição das doses críticas de P nessas equações, obtiveram-se as concentrações críticas de diferentes frações de P na parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não

inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116). A concentração crítica de fósforo orgânico (Po) foi obtida por diferença entre as concentrações críticas de Pts e Pi.

4 RESULTADO E DISCUSSÕES

As quantidades de fósforo absorvidas pelas mudas inoculadas e não inoculadas com o isolado UFSC Pt 116, aumentaram com as doses de P adicionado (Tabelas 5 e 5.3), embora a magnitude desses aumentos, tenha variado entre os tratamentos de inoculação com fungo ectomicorrízico.

Tabela 5 - Fósforo total (Pt) na parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116 e não inoculadas, na presença de diferentes doses de fósforo, após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.

Doses de P adicionado mg kg ⁻¹	P extraível (Mehlich-1) mg kg ⁻¹	Pt na parte aérea (%)	
		Não inoculada	UFSC Pt 116
0	0,5	-	0,10
50	8,8	0,03	0,33
100	15,4	0,08	0,58
200	33	0,16	0,64
400	140	0,38	0,69
800	310	0,41	0,90

Os coeficientes que expressam a relação ΔP absorvida/ ΔP adicionado foram variáveis entre os tratamentos (Tabela 5.1), indicando a influência de características do fungo na absorção de fósforo em relação às doses adicionadas.

Tabela 5.1 – Equações de regressão lineares ajustadas para o fósforo total (Pt) acumulado, na parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, na presença de diferentes doses de fósforo, após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.

Tratamentos	Equação	R ² ⁽¹⁾
Não inoculado	Y = -1,9620 + 0,0155X	0,911
UFSC Pt 116	Y = 4,3922 + 0,0523X	0,947

⁽¹⁾ Todos os valores de R² são significativos à 1%

Estes dados indicam diferentes coeficientes de utilização do fósforo entre os tratamentos, já que a produção de matéria seca não diferiu muito entre eles (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Doses de fósforo estimadas para proporcionar 90% da produção máxima de matéria seca da parte aérea, fósforo total (Pt) absorvido e coeficiente de utilização das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, na presença de diferentes doses de fósforo após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.

Tratamento	Matéria seca g/planta	Doses de P estimada mg kg ⁻¹	P absorvido mg/planta	Coeficiente de utilização g mat. seca/g Pt absorvido
Não inoculado	3,13	1000	13,6	252
UFSC Pt 116	5,66	529	32,3	175

A resposta de natureza quadrática obtida para o tratamento de inoculação com fungo ectomicorrízico, e de natureza linear para o tratamento não inoculado (Tabela 5.3), mostra que a maior dose de fósforo testada não foi suficiente para se atingir a produção máxima das mudas não inoculadas, cujas mudas apresentaram níveis de Pi mais baixos do que os de Po, mesmo para a maior dose de P testada, fato que só se verifica em condições de intensa deficiência de fósforo, como observado por HOGUE et al (1970) em plantas de tomate.

Tabela 5.3 - Concentração de fósforo (Pt) acumulado na parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC – Pt 116 na presença de diferentes doses de fósforo, após 120 dias de cultivo sob condições de casa de vegetação.

Doses de P adicionado mg kg ⁻¹	P extraível (Mehlich-1) mg kg ⁻¹	Pt na parte aérea (mg/muda)	
		Não inoculada	UFSC Pt 116
0	0,5	0,00	0,44
50	8,8	0,05	5,47
100	15,4	0,34	20,88
200	33	1,76	34,17
400	140	9,08	40,02
800	310	15,00	54,45

Assim, os tratamentos de inoculação com o isolado UFSC Pt 116 e as doses de fósforo adicionadas, exerceram grande influência sobre a distribuição do fósforo nas frações estudadas, como mostram as diferentes declividades das equações ajustadas para Pt, Pts e Pi em função das doses adicionadas (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Equações de regressão lineares ajustadas para as frações de fósforo inorgânico (Pi) e fósforo total solúvel (Pts) e fósforo total (Pt) das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

Tratamento	Fração de P	Equação	R ² (1)
Não inoculado	Pi	Y = -0,85 + 0,0389X	0,942
	Pts	Y = 2,50 + 0,0985X	0,986
	Pt	Y = -0,008 + 0,0004020X	0,905
UFSC Pt 116	Pi	Y = -11,59 + 0,5478X	0,920
	Pts	Y = 47,95 + 0,5712X	0,945
	Pt	Y = 0,475 + 0,0003869X	0,907

(1) Todos os valores de R² são significativos a 1%

Com o aumento dessas doses, a concentração de Po apresenta uma tendência de aumento, enquanto a de Pi aumentou linearmente, atingindo, à excessão das mudas não inoculadas, mais de 70% do Pts na condição de concentração crítica (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Concentrações críticas de diferentes frações de fósforo na parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas e não inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116, e valor percentual do fósforo inorgânico (Pi) em relação ao fósforo total solúvel (Pts).

Tratamentos	Frações de P (1)				
	Pts	Pi	Po	Pt	Pi/Pts x100
	-----µg P/gmat.fresca-----			--	-----%-----
Não inoculada	101	38	63	0,40	37,6
UFSC Pt 116	350	278	72	0,67	79,4

(1) Po (fósforo orgânico) e Pt (fósforo total) por digestão nitroperclórica.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por CHAPIN & BIELESKI (1982) e CHAPIN et al (1982), que verificaram em espécies de cevada que a distribuição do fósforo entre as principais frações não diferiram significativamente entre as espécies, mas foi fortemente afetada pelo status do P nas plantas, e que tiveram altas proporções de Pi sob condições de altos teores de fósforo em solução nutritiva, enquanto os níveis de várias frações orgânicas variaram pouco com o aumento da disponibilidade do fósforo.

Chisholm et al (1981), trabalhando com *Trifolium repens* e *Stylosanthes hamata*, sugeriram que, em vez do conteúdo total de P, formas de fósforo metabolicamente ativas, como por exemplo, P-lípido, deveriam ser usadas na determinação de concentrações críticas em plantas, já que essas frações são as que menos variam com a idade da planta e com a disponibilidade do aumento no substrato. Todavia, convém notar que exatamente por este último aspecto, talvez as frações orgânicas não estimem bem as concentrações críticas em plantas, já que essas frações variam muito pouco com o “status” do nutriente na planta (LEE & RATCLIFFE, 1983). Por outro lado, o nível de Pi no tecido é mais sensível à disponibilidade do elemento no substrato, como observado neste trabalho, e sugerido por BIELESKI (1973), porque ele estima a reserva ou o estoque de P na planta, que no caso de mudas, pode estimular o seu crescimento num meio mais pobre em P, enquanto o sistema radicular e as hifas do fungo consigam se estabelecer definitivamente.

O maior conteúdo de P acumulado na parte aérea das mudas de *E. grandis* inoculadas com o isolado UFSC Pt 116, indica a eficiência deste isolado na melhora da absorção pelas mudas. Porém o aumento no teor de P absorvido pode ser resultado de outras características. Tam & Griffiths (1993), citam o efeito solubilizador dos fECMs sobre fosfatos orgânicos devido à produção de fosfatases, atuando na mineralização do P da matéria orgânica, que no presente estudo, estaria presente na turfa do substrato.

Assim, não somente houve melhor aproveitamento do P adicionado, como pode ter havido utilização do P orgânico presente na turfa, o que explicaria o efeito positivo dos fECMs nas mudas sem P adicionado.

Bougher et al (1990), também verificaram incremento do P absorvido por mudas de *E. diversicolor* inoculadas com diferentes isolados de fECMs, em relação às mudas não inoculadas. Alves et al (2001), encontraram valores de P superiores, sendo o máximo valor aqui verificado a metade do valor observados por aqueles autores. Porém, esses autores forneceram 16 vezes mais P por mudas. Souza et al (2003), verificaram que as mudas inoculadas com o isolado UFSC Pt 188, além de recuperar todo o P adicionado (50 mg kg^{-1}), apresentaram valores acima dos deste trabalho, indicando maior eficiência na absorção de P.

As concentrações críticas de Pi e, conseqüentemente, as de Pt, foram variáveis entre os tratamentos de inoculação de UFSC Pt 116, enquanto as de Po pouco variaram (Tabela 5.5), o que seria de se esperar, por se tratar do P metabólico, portanto, diretamente envolvido na fisiologia da planta.

Como já mencionado, estudos têm demonstrado que fungos ectomicorrízicos podem produzir ácidos orgânicos e fosfatases que tornam disponíveis formas não lábeis de fósforo.

Portanto, semelhantemente ao que ocorre na interpretação de níveis críticos no substrato, para uma adequada avaliação de concentrações críticas de fósforo em mudas, além dos fatores levantados por BATES (1971), características do solo e do fungo, que refletem o fator capacidade, também devem ser considerados. Nesse sentido, novos estudos deverão ser conduzidos, como a análise da ressonância magnética nuclear, para que se possa estabelecer um critério seguro de interpretação de análise foliar.

A interpretação dos níveis críticos de P em plantas devem considerar apenas o P_o , mas para efeito do potencial de acumulação do nutriente que possam favorecer os parâmetros de crescimento das mudas, a fração P_i tem papel relevante.

5 CONCLUSÕES

O Po não varia consideravelmente entre as mudas de *Eucalyptus grandis* colonizadas e não colonizadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

A fração Pi reflete a capacidade de acumulação do P pelas mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC Pt 116.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.R. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.2, p.307-313, 2001.

BATES, T.E. Factors affecting critical concentration. In: Plants and their evaluation > a review. **Soil Sci.** v.112. p.116-130, 1971.

BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. **Ann.Rev. Plant. Physiol.** v.24. p. 225-252.1973.

BIELESKI, R.L & FERGUSON, J.B. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: LAUCHLI, A. & BIELESKI, R.L. Inorganic plant nutrition. **Encyc. of plant Physiology.** v.15a. p.422-449, 1983.

BOUGHER, N.L.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. **New Phytologist.**v.114, p.77-85, 1990.

BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica do fósforo em extrato de solos e plantas. **Revista Ceres.** n.21. p.73-85. 1974.

CHAPIN, F.S.; FOLLETT, J.M & O' CONNOR, K.K. Growth, phosphate absorption, and phosphorus chemical fractions in two *Chicochlon spécie* (III). **J. Ecol.** v.20.p.305-321.1982.

CHAPIN, F.S.; BIELESKI, R.L. Mild phosphorus stress in barley and a related low-phosphorus adapted barleygrass; phosphorus fractions and phosphate absorption in relation to growth. **Physiol. Plant.** v.54. p.309-317. 1982.

CHISHOLM, R.H.; BLAIR, G.J.; BOWDEN, J.W.; BONFINFGER, V.J. Improved estimates of critical phosphorus concentration from consideration of plant phosphorus chemistry. **Commud. Soil Sci. Plant Anal.** n.12.

FERREIRA, D.F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados.** Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 145p. 2000.

FRITZ, G.F. Mineral nutrition. In: NOGLE, G. & FRITZ, G.F (eds). **Introductory plant physiology.** New Jersey, Prentice-Hall, 1976.396p.

LEE, R.B.; RATCLIFFE, R.G & SOUTHON, T.E. ³¹P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. **J. Exp. Botany.** v. 41. p.1063-1078, 1990.

LEE, R.B.; RATCLIFFE, R.G. Phosphorus nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in pea root tips: a quantitative study using ³¹P NMR. **J. Exper. Bot.**v. 34. p.1.222-1.244. 1983.

LEE, R.B.; RATCLIFFE, R.G. Nuclear magnetic resonance studies of the location and function of plant nutrients *in vivo*. *Plant and Soil*. v.155/156. p.45-55. 1993.

LEFEBRIERE, D.D. & GLASS, A.D.M. Regulation of phosphate influx in barley roots: effects of phosphate deprivation and reduction of influx with provision of orthophosphate. *Physiol.Plant*. v.54:199-206, 1982.

LICHKO, L.P.; OKOROKOV, L.A.; KULAEV, I.S. Participation of vacuoles in regulation of levels of K^+ , Mg^{+2} and orthophosphate ion in cytoplasm of the yeast *Saccharonces castlbergensis*. *Arch. Microbiol*. v.132. p.289-293, 1982.

LOUGHMAN, B.C.; RATCLIFFE, R.G & SCHWABE, J.W.R. Galactose metabolism in *Zea mays* root tissues observed by ^{31}P NMR espectroscopy. *Plant Science*. v. 59.p.11-23. 1989 a.

LOUGHMAN, B.C.; RATCLIFF, R.G & SOUTHON, T.E. Observations on the cytoplasmic and vacuolar orthophosphate pools in leaf tissues using *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy. *FEBS*. v. 242. p.279-284.1989 b.

MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practices. In: MARKS, G.G.; KOZLOWSKI, T.T. (eds). **Ectomycorrhizae, their ecology and physiology**. New York: Academic Press, 1973. p.383-411.

MUNIZ, A.S.; NOVAIS, R.F.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. Nível crítico de fósforo na parte aérea da soja como variável do fator capacidade de fósforo do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v.9. p.237-243, 1985.

RATCLIFFE, R. G & ROBERTS, J.K.M. Recent applications of NMR to higher plants and algae. *Mag. Reson. Med. Biol*. v.4. p.77-99, 1990.

RATCLIFFE, R. G. NMR and the inorganic composition of plants. *J. Inorg. Bicohem*, v.28.p.347-354. 1986.

RATCLIFFE, R.G. The application of NMR methods to plant tissues. **In Methods in Enzymology**. Academic Press. New York, v. 148. (Eds.) L. Packer and R Douce, p.683-700. 1987.

RHEINHEIMER, D. S. **Dinâmica do fósforo em sistemas de manejo de solos**. 2000, 210p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

ROBERTS, J.K.M.; RAY, P.M.; WADE-JARDETSKY, N.; JARDETSKY, O. Estimation of cytoplasmic and vacuolar pH in higher plant cells by ^{31}P NMR. *Nature*. n.283. p.870-872. 1980.

ROBERTS, J.K.M.; WEMMER, D.; RAY, P.M.; JARDETSKY, O. Regulation of cytoplasmic and vacuolar pH in maize root tips under different experimental conditions. *Plant Physiol*. n.69. p.1344-1347. 1985.

SOUZA, L.B.de. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden.** 2003.100p Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

TAM, P.C.F.; GRIFFITHS, D. A. Mycorrhizal associations in Hong Kong Fagaceae IV. The mobilization of organic and poorly soluble phosphates by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza**. v.2, p.133-139, 1993.

THOMAS, D.S., MONTAGU, K.D., CONROY, J.P. Leaf inorganic phosphorus as a potential indicator of phosphorus status, photosynthesis and growth of *Eucalyptus grandis* seedlings. **Forest Ecology and Management**. v.223, p.267-274, 2006.

CAPÍTULO 6 - CARACTERIZAÇÃO DO ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS) DO DNA RIBOSSÔMICO DO ISOLADO DE *Scleroderma* sp. UFSMSc1

1 RESUMO

O ácido desoxiribunocleico ribossômico (DNA) proporciona uma ferramenta importante para avaliação de polimorfismo nos fungos. Existem muitas cópias de rRNA as quais são arranjadas por espaços não codificados. As sequências codificadas do rRNA são altamente conservadas entre espécies de fungos ectomicorrízicos. A técnica mais utilizada em fungos ectomicorrízicos é a amplificação de rDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) que permite a amplificação de regiões específicas do genoma não conservado (ITS – Internal Transcribed Spacer), localizadas em regiões altamente conservadas. Este trabalho teve como objetivo estudar a sequência completa da região do ITS e analisar as diferenças genéticas no polimorfismo de sequência desta região no fungo *Scleroderma* sp UFSMSc1. O DNA do isolado de *Scleroderma* sp UFSMSc1 foi extraído utilizando-se a técnica do CTAB. A partir deste DNA foram realizadas reações de PCR com os primers universais ITS1 e ITS4, cujo produto amplificado foi purificado e sequenciado. As sequências foram alinhadas pelo programa DNASTAR. A região do ITS do fungo mostrou uma banda simples com um fragmento de aproximadamente 700 pares de base (pb). Quanto a constituição gênica dos isolados utilizados na comparação, observou-se a formação de agrupamentos com as espécies de *Scleroderma* já caracterizadas e constantes no banco de dados National Center of Biotechnology Information (NCBI) Blast. Os resultados mostraram que esta é uma excelente técnica para a identificação de espécies de *Scleroderma*, pois estes fungos são difíceis de serem identificados utilizando-se apenas caracteres morfológicos.

Palavras-chave: DNA, polimorfismo, fungos ectomicorrízicos.

2 INTRODUÇÃO

O DNA ribossômico proporciona uma ferramenta importante para avaliação de polimorfismo nos fungos. Existem muitas cópias de rRNA como 17S, 5.8S, 25S e 5S, os quais são arranjados por espaços não codificados. As sequências codificadas do rRNA são altamente conservadas entre espécies de fungos ectomicorrízicos (ECMs).

A diferenciação genética entre populações de uma espécie constitui o primeiro estágio da divergência evolutiva. Esta diferenciação resulta, na maioria dos casos, da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita sobre a variabilidade pré-existente na espécie (MARQUES, 2003).

Os métodos usuais de identificação de espécies de fECMs, são baseados em critérios morfológicos, observando-se as características dos carpóforos e dos critérios das chaves de classificação conforme TRAPPE (1982), STUNTZ et al.,(1996) e SMITH (1978). A morfologia é uma característica importante para a identificação, e em muitos casos, pode proporcionar uma rápida e confiável caracterização.

A identidade dos seres vivos é determinada pela composição e sequência do material genético. O uso de técnicas moleculares, através da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível. Estas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam afetar a morfologia do organismo (MANSO, 1984).

Todas as técnicas conhecidas de diagnóstico molecular fundamentam-se na análise direta ou indireta da composição ou na sequência dos ácidos nucleicos para identificação e caracterização de organismos e características genéticas de interesse (MARQUES et al., 2002).

A técnica mais utilizada em fungos ectomicorrízicos é a amplificação de rDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Esta técnica permite a amplificação de regiões específicas do genoma não conservado (ITS – Internal Transcribed Spacer) localizadas em regiões altamente conservadas. A região do ITS é separada pelos genes 17S e 25S, podendo ser amplificada por primers específicos para estas duas unidades. O ITS é altamente conservado na espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente usado para taxonomia (BRUNS et al, 1991; ANTONIOLLI, 1998; ANTONIOLLI, et al., 2000; GOMES et al. 2002).

O estudo do polimorfismo da região do ITS para fungos ectomicorrízicos tem sido determinado para poucas espécies. Gomes et al. 2002, trabalharam com 26 isolados de fungos

ectomicorrízicos do estado de Minas Gerais, dos quais identificaram polimorfismo em 8 gêneros de fECMs, dentre eles, o *Suillus brevipes*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Cenococcum egeophilum* e *Scleroderma* sp.

A tecnologia de sequenciamento mais amplamente utilizada combina a técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) com métodos de terminação de cadeias de dideoxynucleotídeos. Esta metodologia tem sido utilizada na identificação de microrganismos pela determinação da sequência de genes conservados (por exemplo, 5.8S para fungos ectomicorrízicos). Após o sequenciamento, softwares especializados realizam as análises filogenéticas, permitindo a identificação correta dos organismos em estudo.

Este trabalho teve por objetivo registrar a sequência completa da região do ITS do rDNA e a análise genética para caracterização do polimorfismo genético do isolado de *Scleroderma* sp. UFSMSc1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção do fungo ectomicorrízico

O isolado de fungo ectomicorrízico estudado foi coletado em plantação de cultivo de *Eucalyptus* spp situada na Fazenda Ynhacundá, primeiro distrito do município de São Francisco de Assis, RS, e multiplicado no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo Professor Marcos Rubens Fries da Universidade Federal de Santa Maria. A descrição morfológica do isolado *Scleroderma* sp UFSMSc1 foi realizada pela professora Vetúria Lopes de Oliveira, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

O isolado foi mantido em meio de cultura sólido Melin-Norkans Modificado (MNM – MARX, 1969), no interior de placas de Petri de 9 cm de diâmetro em estufa a 25° C por aproximadamente quinze dias. Em seguida, foram feitas suspensões micelianas em 25 mL de MNM líquido em erlenmeyers de 250 mL, a partir de discos de 8 mm de diâmetro obtidos das culturas em placa, seguindo-se de incubação a 25° C durante trinta dias (Figura 6).

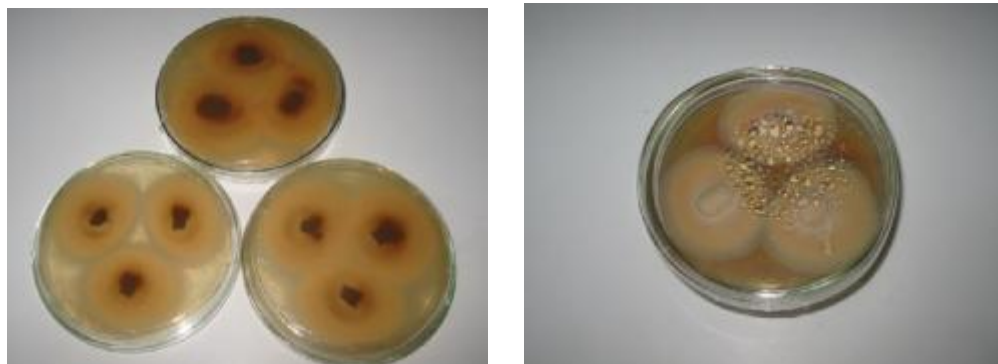


Figura 6 - Isolados de *Scleroderma* sp (UFSM Sc1) aos 15 dias sendo mantidos em meio de cultura MNM-Modificado sólido para a produção do inóculo e extração do DNA.

3.2 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada conforme metodologia SAMBROOK et al. (1989) sendo o DNA extraído a partir de micélio produzido em meio líquido MNM.

As suspensões micelianas, após serem retiradas do meio líquido, foram secas em papel toalha e submetidas à maceração com nitrogênio líquido até aparência de pó. Neste estágio foi adicionado 600 µL de buffer CTAB 2% (100 mL de H₂O MiliQ, 8,183g de NaCl, 7,444g de EDTA, 2g de CTAB e 1,576g de Tris-HCl) e novamente maceradas. Depois de maceradas foram homogeneizadas em misturador por 1 min e incubadas em banho maria a 65⁰C por 20

min. Após retiradas do banho maria foram adicionadas às amostras 600 µL de fenol: clorofórmio: isoamyl álcool (25:24:1) e estas foram novamente submetidas à homogeneização em misturador por 5 min e centrifugadas a 18894 rcf, rotor 12130 por 10 min a 15°C, em centrífuga Sigma Laboratory Centrifuge 4K15.

Após a centrifugação das amostras o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionou-se 600 µL de fenol: clorofórmio: isoamyl álcool (25:24:1) e foram centrifugadas a 18894 rcf por 10 min a 15°C. O sobrenante foi então retirado e adicionado a um novo tubo contendo 400 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas novamente em misturador e os tubos permaneceram em temperatura não controlada no laboratório por 5 min. Após este período as mesmas foram centrifugadas a 18894 rcf por 10 min. Após este processo descartou-se o líquido sobrenadante e inverteu-se o tubo por 5 min para retirar todo o isopropanol. Ressuspendeu-se o pellet com 100 µL de etanol gelado (70%), e as amostras permaneceram em temperatura não controlada no laboratório por 5 min. Após este tempo as amostras foram centrifugadas a 18894 rcf por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se o etanol evaporar por 5 min. O pellet foi então ressuspensão em 50 µL de solução TE e armazenadas a -20°C.

Após a extração do DNA as amostras foram submetidas ao tratamento com RNase. Adicionaram-se as amostras 2% do volume da amostra de RNase e as mesmas permaneceram em banho- maria a 37°C por 30 min.

Após ser submetido a tratamento com RNase, o DNA foi analisado em gel de agarose 1,2%. O gel de agarose consiste de 100 mL de solução TBE (108g de tris, 55g de ácido bórico, 40 mL de EDTA 0,5 M, 1L de H₂O MiliQ, pH 8,0) e 1g de agarose. Esta mistura foi dissolvida em forno de microondas e após esfriar adicionou-se 0,5 µL de brometo de etídeo para visualização da presença de DNA (Figura 6.1).



Figura 6.1 - Preparo das amostras para a extração do DNA do isolado *Scleroderma* sp UFSM Sc1.

O gel foi corrido em cuba em voltagem de 80 mV. Depois de realizada a corrida do gel este foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado com câmara para fotografia de gel marca Kodac.

3.3 Reação de PCR

As amostras de DNA genômico foram submetidas a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) para a amplificação enzimática do DNA. Este processo ocorre *in vitro*, através de primers de oligonucleotídeos complementares às fitas opostas do DNA desejado. Os primers utilizados possuíam a seqüência de nucleotídeos ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990) para estudo da região do ITS (Figura 6.2).

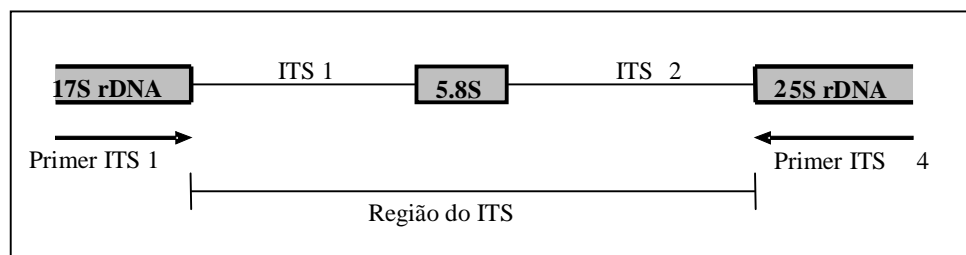


Figura 6.2- Organização esquemática da região do rDNA com o Internal Transcript Space (ITS) usada neste estudo.

A reação de PCR utilizada foi a seguinte: 1,0 μ L de DNA; 2,5 μ L de buffer de PCR; 3,0 μ L de DNTP; 2,0 μ L de $MgCl_2$; 3,0 μ L do primer ITS1; 3,0 μ L do primer ITS4; 0,5 unidades da enzima Taq polimerase (5 unidades/ μ L); 10,5 μ L de água MiliQ. Os ciclos do PCR

seguiram as seguintes condições: primeira extensão 94^oC por 3 min; desnaturação 94^oC por 45 s; anelamento 55^oC por 30 s; o número de ciclos foi de 30 ciclos seguidos por uma segunda extensão 72^oC por 10 min e mantidas a 4^oC. Posteriormente o material foi visualizado em gel de agarose e fotografado.

3.4 Purificação e sequenciamento de DNA

As amostras obtidas na reação PCR foram submetidas à purificação conforme metodologia descrita por SAMBROOK et al (1989). Junto com as amostras de PCR foi adicionado 1 volume de PEG 13% (10 mL de H₂O miliQ, 1,3 g de PEG e 0,94 g de NaCl) e deixadas em overnight na geladeira. Após serem retiradas da geladeira, as amostras foram centrifugadas a 18894 rcf por 15 minutos. A solução PEG 13% foi então descartada e acrescidos 200µL de álcool 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 18894 rcf durante 10 minutos. Após esta etapa, o álcool foi descartado e o DNA ressuspenso.

Para o sequenciamento do DNA, foi utilizado o aparelho Mega BACE 500, desenvolvido pela Amersham Biosciences. Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram editadas no aplicativo EditSeq e alinhadas no aplicativo MegaAlign do software DNASTAR (LASERGENE, 1994). Para a construção do diagrama de similaridade e a comparação da sequencia *consensus*, foram utilizadas sequências obtidas no banco de dados NCBI Blast (ALTSCHUL et al., 1990), referentes a isolados de *Pisolithus tinctorius* purificados no Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina e isolados de *Scleroderma* spp. (Tabela 6).

Tabela 6 - Organismo, código do isolado, hospedeiro, origem e número de acesso dos isolados de fungos ectomicorrízicos utilizados na comparação da similaridade genética.

Organismo	Código do isolado	Hospedeiro	Origem	Número de acesso *
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC Pt22	<i>Eucalyptus sp</i>	Três Barras-SC, Brasil	AF374704
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC Pt44	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AF374701
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC Pt26	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AF374699
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC 132	<i>Eucalyptus dunni</i>	Três Barras, SC, Brasil	AF374704
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC Pt25	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AF374698
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC 441	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AF374696
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC 145	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AB374705
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC Pt27	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AF374700
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC Pt23	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AF374697
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC Pt49	<i>Eucalyptus sp</i>	UFSC, Florianópolis, Brasil	AF374702
<i>Pisolithus tinctorius</i>	UFSC 116	<i>Eucalyptus dunni</i>	Três Barras-SC, Brasil	AF374703
<i>Scleroderma bovista</i>	AB 099901	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Tailândia	AB099901
<i>Scleroderma bovista</i>	AB 211267	<i>Salix reinii</i>	Monte Fuji, Japão	AB211267
Uncultured ectomycorrhizal	DQ 437705	<i>Eucalyptus sp</i>	África	DQ437705
<i>Scleroderma spp</i>	UFMSSc1	<i>Eucalyptus grandis</i>	São Francisco de Assis-RS, Brasil	

*Número de acesso no Natitonal Center of Biotechnology Information (NCBI) Blast (site:www.ncbi.nlm.nih.gov).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método utilizado para a extração do DNA do micélio de isolado de *Scleroderma* sp UFSMSc1 oriundo do município de São Francisco de Assis - RS, mostrou-se eficiente, resultando em quantidade de DNA suficiente para a utilização de técnicas de purificação e análises de polimorfismo da região do ITS pelo sequenciamento direto do DNA do produto do PCR (Figura 6.3).

A região ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA de micélio de *Scleroderma* sp UFSMSc1 obtido por meio de cultura foi amplificada com sucesso com os primers universais ITS1/ITS4. A região do ITS do fungo *Scleroderma* sp UFSMSc1 mostrou uma banda simples com um fragmento de aproximadamente 700 pares de base (pb) (Figura 6.3), não demonstrando contaminação por agentes externos (Figura 6.4).

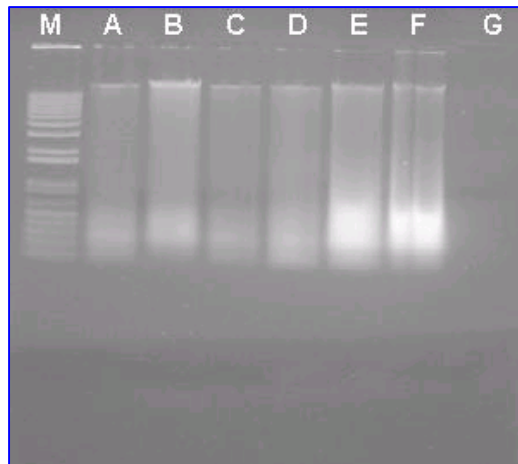


Figura 6.3 - Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico do micélio fresco do fungo *Scleroderma* sp. Isolado UFSCSc1. M: marcador molecular 1Kb (Gibco – BRL); linha A, B, C, D, E e F: DNA extraído do micélio do fungo; Linha G: controle. Santa Maria, RS, 2006.

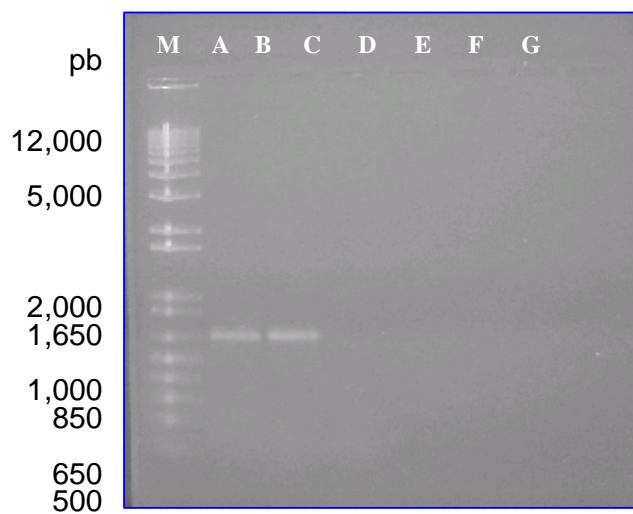


Figura 6.4 - Eletroforese em gel de agarose 1% do fragmento de amplificação da PCR com os primers ITS1 e ITS4 do fungo *Scleroderma* sp. Isolado UFSMSc1. (M) Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco Cat. No. 10787-018, (A e B) amostra contendo produto PCR do *Scleroderma* UFSMSc1, (C e D) Amostra controle. Santa Maria, RS, 2006.

Para o sequenciamento foi utilizado produto direto do PCR (Figura 6.4), e ambas as regiões do ITS foram sequenciadas do *Scleroderma* sp UFSMSc1. Comparando-se a sequência do isolado *Scleroderma* sp UFSMSc1 com as informações da estrutura genética dos isolados de *Scleroderma* sp, disponibilizada no Banco de dados NCBI Blast, a sequência de genes conservados 5.8S, encontra-se entre os pares de base 119 e 284 (Figura 6.5).

A região 5.8S apresenta 100% de similaridade com a mesma região dos três isolados de *Scleroderma* no banco de dados do NCBI/BLAST (Tabela 6 e Figura.6.5). Há uma grande similaridade da região do ITS1 e ITS2 do isolado do *Scleroderma* UFSMSc1 com a comparação molecular dos isolados com sequência depositadas no NCBI/BLAST. Embora as espécies de *Scleroderma* possam representar dificuldade para diferenciação entre espécie pelos caracteres morfológicos (MALVAREZ et.al, 2003), a análise filogenética do rDNA certifica a identificação dos isolados coletados desde vegetação natural até áreas de reflorestamento (MARTIN et al., 2002).

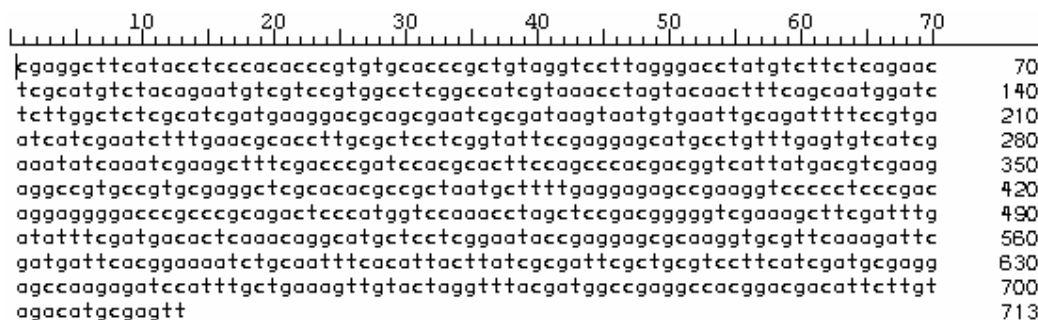


Figura 6.5 - Sequência molecular do isolado *Scleroderma* UFSMSc1, da região do ITS (Internal Transcript Spacer). Nucleotídeos sublinhados representam a região 5.8S.

	- - - T T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A T C G A G	Majority
	T T T G A A C G C A C C T T G C G C T C C T C G G T A T T C C G A G G A G C A T	Majority
	330 340 350 360	
296 T	AB099901.SEQ
299	AB211267.SEQ
320	DQ437705.SEQ
222	UFSM3C1.SEQ
	G C C T G T T T G A G T G T C A T C G A A A T A T C A G A T C G A A G C T T T C	Majority
	370 380 390 400	
336 C	AB099901.SEQ
339 C	AB211267.SEQ
360 A	DQ437705.SEQ
262 A	UFSM3C1.SEQ
	G A C C - - - T C C -	Majority
	410 420 430 440	
376	AB099901.SEQ
379	AB211267.SEQ
400 C	DQ437705.SEQ
302	. . . C G A . . . A C G C A C T T C C A G C C C A C G A C G G T C A T T A T G	UFSM3C1.SEQ
	- - G T C G G A G - - - - - - - - - - - - - - - C T C G G T T T G G A C - - - T T G	Majority
	450 460 470 480	
382	AB099901.SEQ
385	AB211267.SEQ
407 A C - A	DQ437705.SEQ
342	A C A . . A G G C C G T G C C G T G . G A . . C . C . C . . A C G C C .	UFSM3C1.SEQ
	T G G G A G T C T - - - - G C G G G C G G A A - - - - C C C C T C C C G T C G	Majority
	490 500 510 520	
404	AB099901.SEQ
407	AB211267.SEQ
428 G T T	DQ437705.SEQ
382	C T A A T . C T . T T G A G . A . A . . C . . G G T C A . A	UFSM3C1.SEQ
	G G G G G G G - - C C G T C - - - - G G C T C T C - - - - C T C A A A - - - A G	Majority
	530 540 550 560	
432 A - - - - -	AB099901.SEQ
436 A - - - - -	AB211267.SEQ
459	. . A G A . . T	DQ437705.SEQ
422	. . A A C . . . C . C G C A . A . . . C . A T G G T C C C T .	UFSM3C1.SEQ
	C A T T A G T G T T G G G T G C G A G C C T C G - - - - - - - - - C G - T G	Majority
	570 580 590 600	
458	AB099901.SEQ
462	AB211267.SEQ
488 C . G C . T A - C .	DQ437705.SEQ
462	. T C C G A C . G G . . T C . A A . . . T . . . A T T T G A T A T T T . . A . .	UFSM3C1.SEQ
	G C A C - - - - - G G C - - - C T C T T C G A C G T C A T A A T G A C C G T	Majority
	610 620 630 640	
486	AB099901.SEQ
490	AB211267.SEQ
516	DQ437705.SEQ
502	A . . . T C A A A C A . . . A T G . . . C . . . G A A . A C C G . G . . G . . C	UFSM3C1.SEQ

estudo, apresentaram um maior score ou menor número de “gaps”, ou seja, menos nucleotídeos foram alterados pelo banco de dados NCBI Blast quando da realização do alinhamento das bases.

A análise gênica do isolado suporta a identificação morfológica descrita por KANCHANAPRAYUH et al., 2003; NARA, 2006 e BOOTH et al., 2006, não publicado), para *Scleroderma bovista* e para clones de fungos ectomicorrízicos.

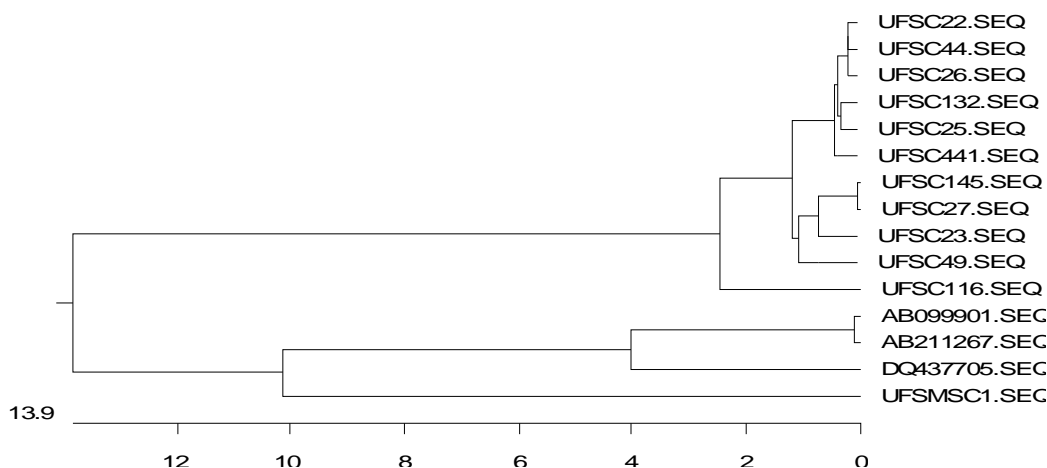


Figura 6.7 - Dendrograma das distâncias genéticas entre *Scleroderma* sp (UFSMSC1) e *Scleroderma bovista* do NCBI, número de acesso AB099901 = AB211267 = DQ = 437705; e do *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 22), número de acesso AF374704; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 44), número de acesso AF374701; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 26), número AF374699; *Pisolithus tinctorius* (UFSC 132), número de acesso AF374704; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 25), número de acesso AF 374698; *Pisolithus tinctorius* (UFSC 441), número de acesso AF374696; *Pisolithus tinctorius* (UFSC 145), número de acesso AB374705; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 27), número de acesso AF374700; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 23); número de acesso AF374697; *Pisolithus tinctorius* (UFSC Pt 49), número de acesso AF374702 e do *Pisolithus tinctorius* (UFSC 116), número de acesso AF374703.

As inserções e deleções (Figura 6.6) explicam o alto nível de polimorfismo na sequência desta espécie em população naturais deste fungo. Nível semelhante de polimorfismo foi encontrado em *Laccaria* (MARTIN et al., 1999) e em *Scleroderma* sp (KANCHANAPRAYUH et al., 2003; NARA, 2006 e BOOTH et al., 2006, não publicado).

Os resultados mostraram que a técnica de identificação através do sequenciamento direto do produto do PCR-ITS é eficiente para a identificação de espécies de *Scleroderma* pois estes fungos são difíceis de serem identificados utilizando-se apenas caracteres morfológicos. Esta ferramenta requer quantidades mínimas de DNA e apresenta alta confiabilidade nos resultados, tornando-se assim um método excelente para estudo de populações nativas de fungos ectomicorrízicos e monitoramento de isolados específicos

utilizados em programas de inoculação com estes fungos nas mais diversas condições ambientais.

5 CONCLUSÕES

A região do ITS do fungo *Scleroderma* sp UFSMSc1 apresentou uma banda simples com um fragmento de aproximadamente 700 pares de base (pb).

O fungo *Scleroderma* sp UFSMSc1 possui alta similaridade filogenética com as espécies deste gênero no banco de dados NCBI/BLAST.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFON, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**.v.25.n.3389-3402.1997.

ANTONIOLLI, Z.I.; SMITH, S.E.; OPHEL-KELLER, K.; SCHACHTMAN, D.P.; ZEZE, A. **Assessment of variation in sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* from a pasture communith.** In “Seconde International Conference on Mycorrhiza” . Uppsala, 1998.

ANTONIOLLI, Z. I. ; SCHACHTMAN, D. ; OPHELKELLER, D. ; SMITH, S. E. . Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture . **Mycological Research**. v. 104, n. 6, p. 708-715, 2000.

BRUNS, T.; WHITE, T.; TAYLOR, J. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecological Systematic**.n.22. p.525-564.1991.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C.M.; BARROS, E.G.; BORGES, A.C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**.v.25, n.4, p.477-483. 2002.

KANCHANAPRAYUDH, J.; ZHOU, Z.; YOMYART, S.; SIHANONTH, P.; HOGETSU, T. Molecular phylogeny of ectomycorrhizal *Pisolithus* fungi associated with pine, dipterocarp, and eucalyptus trees in Thailand. **Mycoscience**. v.44. p.287-294.2003.

LASERGENE. **User's guide. A manual for the Lasergene System.** Biocomputing software for windows. 253p.1994.

MALVÁREZ, G.; OLIVEIRA, V.L. A PCR/RFLP technique to characterize fungal species in *Eucalyptus grandis* Hillex Maiden ectomycorrhizas. **Mycorrhiza**. n.13. p.101-105. 2003.

MANSO, S.B.G.; TENENTE, R.C.V. Nematóides (*Heterodera glycines* Ichinohe) formador do cisto da soja. Brasília, DF; **EMBRAPA – CENARGEM** (Comunicado Técnico), p-5, 1984.

MARQUES, E. K. Diagnóstico genético molecular. Canoas: Ed. ULBRA, 372p. 2003.

MARTIN, F.; DÍEZ J.; DELL, B.; CELARUELLE, C. Phytogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. **New Phytologist**. v.153.p.345-357. 2002.

MARTIN, M.P.; HOGBERG, N.; NULUND, J.E. Molecular analysis confirms morphological reclassification of *Rhizopogon*. **Mycol Res**. v.102. p.855-858.1999.

MARQUES, E. K.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. De.; AZEVEDO, J. L. De. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 433p. 2002.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology** v.59, n.2, p.153-163, 1969.

NARA, K. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. **New Phytologist**. v.169.p.169-178.2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SMITH, T.F. A note on the effect of soil tillage on the frequency and vertical distribution of spores of vesicular-arbuscular endophytes. **Australian Journal of Soil Research**. n.16. p.359-361.1978.

STUTZ, J.; MORTON, J. Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungus in arid ecosystems. **Canadian Journal of Botany**. n.74, p.1883-1889.1996.

TRAPPE, J.M. Synoptic keys to the genera and species of Zygomycetous mycorrhizal fungi. **Phytopathology**. n.72.p.1102-1108. 1982

WHITE, T., BRUNS, T., LEE, S., and TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **“PCR Protocols – A guide to methods and applications”** (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T.J. White, eds.), p. 315 – 322. Academic Press, New York.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como proposto, este trabalho avaliou primeiramente, a população e a diversidade dos fungos micorrízicos nas espécies florestais de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii* em áreas sujeitas à arenização, e verificou a possibilidade de serem utilizados em programas de recuperação destas áreas.

O levantamento prévio dos gêneros e espécies de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos nas áreas avaliadas, permitiu verificar que a população e a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas sujeitas à arenização em campo nativo, foi maior do que nos cultivos de eucalipto 3 e 8 anos, comprovando assim, que sistemas mais estáveis, por apresentarem maior diversidade na comunidade das plantas, proporciona maior capacidade de associação para os fungos micorrízicos. As ectomicorrizas só ocorreram nos povoamentos de eucalipto.

Foi possível em seguida, evidenciar que a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos é viável em mudas de espécies florestais. O *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum* apresentaram-se eficientes na colonização das raízes das mudas de *Acacia mearnsii*, formando colonização micorrízica mesmo em substratos com alto nível de fósforo adicionado. Os substratos mecplani e turfa fértil, foram eficientes na promoção do crescimento das mudas de *Acacia mearnsii*, pois sendo ricos em fósforo, melhoraram o desenvolvimento das mudas, com boa formação do sistema radicular e maior produção de biomassa aérea. A *Acacia mearnsii* apresentou grau de dependência micorrízica intermediária, típica de plantas pioneiras de crescimento rápido.

Para a produção de mudas de qualidade de *Eucalyptus grandis*, foi comprovado, que para o êxito na formação de povoamentos florestais, estas mudas, devem apresentar vigor suficiente para resistir ao estresse inicial do transplante, sendo importante que sejam produzidas em substrato fértil, onde não tenham limitações de nutrientes essenciais. Verificou-se portanto, que a maior eficiência simbiótica entre *Eucalyptus grandis* e isolados do *Pisolithus microcarpus* ocorre quando os níveis de P encontram-se em nível sub-ótimo. Este isolado mostrou-se eficiente na promoção do crescimento das mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes substratos e doses de fósforo adicionado.

Ainda, foi possível verificar que a eficiência de utilização do P pela planta é dependente do estoque de P metabólico e de P vacuolar. Sendo assim, o Po não variou consideravelmente entre as mudas de *Eucalyptus grandis* colonizadas e não colonizadas com

o isolado *Pisolithus microcarpus*, e a fração Pi refletiu a capacidade de acumulação do P pelas mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o isolado de fungo ectomicorrízico.

Finalizando, este trabalho estudou a seqüência completa da região do ITS e analisou as diferenças genéticas do polimorfismo de seqüência desta região no fungo *Scleroderma* sp UFSMSc1, isolado da área arenizável. A região do ITS do fungo *Scleroderma* sp UFSMSc1 apresentou uma banda simples com fragmento de aproximadamente 700 pares de base (pb), e este fungo possui alta similaridade filogenética com as espécies deste gênero no banco de dados NCBI/BLAST, evidenciando que a técnica de amplificação de rDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) permite a amplificação de regiões específicas do genoma não conservado (ITS – Internal Transcribed Spacer), localizadas em regiões altamente conservadas, e é a técnica mais eficiente e utilizada para fungos ectomicorrízicos.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)