

Micorrização das mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden comercializadas no município de Santa Maria, RS

Ricardo Bemfica Steffen¹, Zaida Inês Antonioli²,
Gerusa Pauli Kist Steffen³, Daniel Pazzini Eckhardt⁴

^{1,3}*Doutorandos do PPG-Ciência do Solo/CCR/Bolsistas CAPES*

²*Departamento de Solos/Bolsista de Produtividade do CNPq*

⁴*Mestrando do PPG-Ciência do Solo/CCR/Bolsista CNPq*

Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS

e-mail: bemfica_steffen@yahoo.com.br

Resumo

Para a formação de mudas de eucalipto são utilizados substratos de diferentes composições, os quais, muitas vezes, não apresentam inóculo micorrízico. A presença de fungos micorrízicos no substrato pode auxiliar no desenvolvimento das mudas e no estabelecimento e manutenção destas após o transplante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a população e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos nas mudas de eucalipto comercializadas no município de Santa Maria, RS. Pelos resultados conclui-se que há ocorrência de esporos de fungos micorrízicos arbusculares nos substratos das mudas de eucalipto, mas a associação com as plantas foi baixa. Não foi observada formação de ectomicorrizas nas mudas de eucalipto avaliadas.

Palavras-chave: Micorrizas, mudas florestais, controle de qualidade

Summary

For the formation of eucalyptus are used substrates of different compositions, which often have no mycorrhizal inoculum. The presence of mycorrhizal fungi in the substrate can assist in the development of seedlings and the establishment and maintenance of these after transplantation. The objective of this study was to evaluate the population and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ectomycorrhizal seedlings in the market in the municipality of Santa Maria, RS. The results concluding that there is occurrence of spores of mycorrhizal fungi on substrates of eucalyptus seedlings, but the association with the plants was low. No formation was observed in ectomycorrhizal seedlings of eucalyptus assessed.

Key-word: Mycorrhiza, seedling, quality control

Introdução

As plantações de essências florestais representam papel importante, tanto do ponto de vista econômico e energético, quanto do ponto de vista social. Atualmente, das áreas reflorestadas no Brasil, os gêneros de *Eucalyptus* são, devido principalmente a sua diversidade de espécies, adaptabilidade climática e ao seu potencial produtivo, as essências florestais de maior importância, correspondendo a 62% das espécies utilizadas, ocupando uma área de aproximadamente 6 milhões de hectares (GARAY et al., 2004), sendo a espécie *E. grandis* a mais utilizada (ANDRADE et al., 2006).

O Brasil, devido às excelentes condições edafoclimáticas e avançado desenvolvimento na área de silvicultura, apresenta o maior programa de reflorestamento do mundo (JUVENAL e MATTOS, 2002), utilizando-se predominantemente o plantio de árvores dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, os quais apresentam dependência de associação micorrízica para seu estabelecimento e desenvolvimento a campo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Dentre as inter-relações biológicas estabelecidas no ecossistema solo, as simbioses entre plantas e microrganismos heterotróficos, como o caso das micorrizas, destaca-se pelos benefícios proporcionados à produção vegetal (SMITH e READ, 2008). Segundo Brady e Weil (2002), as micorrizas são consideradas a simbiose de maior expressão ecológica e econômica entre fungos do solo e raízes de plantas vasculares.

Nas últimas décadas o interesse pela utilização dos fungos micorrízicos inoculados as espécies florestais se intensificou devido aos benefícios que esses proporcionam às plantas, tornando possível o estabelecimento das mudas em solos que apresentam condições sub ótimas de disponibilidade de nutrientes ou mesmo com a presença de poluentes (BRUNNER, 2001; SOUZA et al., 2006). As micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas promovem um incremento significativo da área de absorção radicular das plantas colonizadas, maximizando o aproveitamento de água e nutrientes, como o fósforo, o nitrogênio e o potássio e alguns micronutrientes não fungistáticos (SMITH e READ, 2008).

Devido as essências florestais micorrizadas apresentarem vantagens em relação àquelas não micorrizadas, caracterizado pelo melhor desenvolvimento em solos de baixa fertilidade, maior tolerância às condições adversas e ao estresse hídrico e incremento na absorção de nutrientes, principalmente fósforo, os programas de reflorestamento, existentes em alguns países, priorizam o controle desta micorrização (OLIVEIRA e GIACHINI, 1999; SOUZA et al., 2008).

Desde a seleção do isolado micorrízico a ser utilizado, até a inoculação destes nas espécies florestais ainda no viveiro, visando à simbiose mutualística fungo-planta, a micorrização controlada apresenta-se como prática de fundamental importância para o sucesso no estabelecimento e

desenvolvimento das plantas após o transplante para o campo e manutenção da estabilidade de comunidades florestais (ANDREAZZA et al., 2004). Além disso representa uma alternativa de baixo impacto ambiental no estabelecimento de essências florestais a campo (OLIVEIRA e GIACHINI, 1999; SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

No entanto, no Rio Grande do Sul, tem sido verificado baixo índice de sobrevivência das mudas de essências florestais após o transplante para o campo (SILVA et al., 2003), devido principalmente, ao não controle da micorrização das mudas ou pela baixa eficiência dos isolados fúngicos utilizados. O controle da micorrização nos viveiros florestais é fundamental para o sucesso no estabelecimento dos programas de reflorestamento (ANDREAZZA et al., 2004; SOUZA et al., 2004).

Sabendo-se que para o gênero *Eucalyptus* ocorre uma sucessão no tipo de colonização micorrízica, sendo inicialmente colonizado por fungos micorrízicos arbusculares e posteriormente por fungos ectomicorrízicos (OLIVEIRA e GIACHINI, 1999; SANTOS, 2001; ZEPPA et al., 2005; SMITH e READ, 2008), as mudas dessas essências florestais devem conter esses inóculos micorrízicos desde a fase inicial de desenvolvimento da planta. O objetivo deste trabalho foi avaliar a população e a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e presença de ectomicorrizas nas mudas de *Eucalyptus grandis* comercializadas no município de Santa Maria, RS.

Material e métodos

Para a avaliação da presença de esporos micorrízicos arbusculares, foram adquiridas seis mudas de *Eucalyptus grandis* por estabelecimento, em seis locais onde é realizada a comercialização de mudas de eucalipto no município de Santa Maria, RS. Estes foram nomeados de A, B, C, D, E e F, a fim de manter a integridade dos estabelecimentos comerciais.

Após a aquisição das mudas, as quais apresentavam de 120 a 170 dias de viveiro, estas foram levadas ao laboratório para análise da presença e diversidade de esporos micorrízicos.

No laboratório, as mudas foram retiradas dos recipientes e lavadas em água corrente sobre peneira de 0,147 mm a fim de separar a planta do substrato. Após a separação, as raízes foram acondicionadas em recipientes plásticos contendo solução FAA (5% de formalina a 40%, 5% de ácido acético e 90% de álcool etílico a 50%), conforme Kormanik e McGraw (1982) para análise posterior. Das mudas amostradas, pesou-se 100 g do substrato utilizado pelos viveiristas e efetuou-se a extração de esporos pelo método de peneiramento úmido (GERDEMANN e NICHOLSON, 1963) e centrifugação em sacarose (JENKINS, 1964). Os esporos obtidos foram

preparados em lâminas e visualizados em microscópio ótico para identificação das espécies segundo suas características morfológicas (INVAM, 2001).

Para a determinação da diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares presentes nos substratos, utilizou-se os índices de diversidade de Simpson's e Berger-Parker calculados pelo software Bio-Dap (THOMAS e CLAY, 2000).

Para avaliação da colonização por micorrizas arbusculares e ectomicorrízica, as raízes, previamente separadas do substrato e armazenadas, foram clarificadas e coradas, segundo a metodologia de KOSKE e GEMMA (1989).

A porcentagem de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada (GIOVANETTI e MOSSE, 1980), adaptado a partir do método de medidas de comprimento de raízes de NEWMAN (1966). As amostras de raízes mantidas em FAA foram espalhadas aleatoriamente no interior de placas de Petri de 9 cm de diâmetro 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 (40X), observando-se a presença ou ausência de colonização micorrízica nos pontos de intersecção entre as raízes e as linhas da placa.

Resultados e discussão

O número de esporos micorrízicos encontrados nos substratos analisados (Figura 1A) condiz com resultados observados em análises de solos de povoamentos florestais (MELLO et al., 2006), mas fica aquém do número médio de esporos micorrízicos ideal para uma boa colonização micorrízica, cujo número deve estar entre 80 a 100 esporos por 100 g de substrato (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Segundo Araújo et al., (2004) a baixa colonização micorrízica das mudas florestais pode representar fator limitante para o seu estabelecimento a campo.

Dentre as mudas amostradas, destacam-se as comercializadas no estabelecimento D, onde foi encontrado número médio de 39 esporos por 100 g de substrato (Figura 1A). Nos demais substratos, o número reduzido de esporos encontrados pode estar relacionado a uma menor adaptação dos isolados as condições de produção das mudas, nutrição e composição do substrato.

Observou-se variação de 0 a 48% na porcentagem de colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares (Figura 1B). Segundo Araújo et al., (2004) a baixa colonização micorrízica das mudas florestais pode representar fator limitante para o seu estabelecimento a campo.

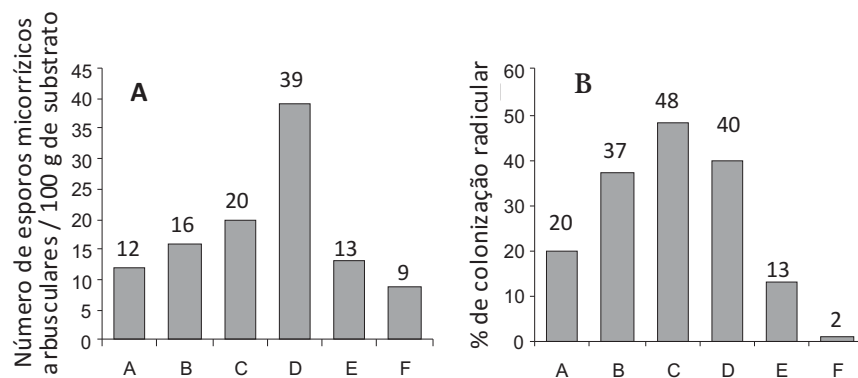


Figura 1. Número médio de esporos (A) e porcentagem de colonização radicular (B) de fungos micorrízicos arbusculares nas mudas de *Eucalyptus grandis* comercializadas em seis estabelecimentos no município de Santa Maria. (Média de 6 repetições).

Os esporos de fungos micorrízicos arbusculares (Tabela 1) presentes nos substratos analisados correspondem às espécies *Acaulospora scrobiculata* Trappe, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, *Glomus clarum* Nicolson & Schenck, *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann, *Scutellospora heterogama* Nicholson & Gerdemann e *Scutellospora persica* (Koske & C. Walker) C. Walker & F. E. Sanders. As espécies *A. scrobiculata* e *G. clarum* foram as mais abundantes (Tabela 1).

Segundo Carrenho (1998), os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* apresentam maior capacidade de sobrevivência e adaptação às variações de solo e clima, o que provavelmente tenha influenciado para a sua ocorrência em maior número nos substratos analisados.

Por meio da análise dos índices de diversidade utilizados, observa-se que os substratos oriundos dos locais C, D e E apresentaram a maior diversidade de espécies de esporos micorrízicos, o que contribui para maior probabilidade de colonização (Tabela 1).

Segundo Colozzi-Filho et al. (1994) e Saggin Júnior e Siqueira (1996) mudas micorrizadas com diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares, podem apresentar diferenças significativas no crescimento em áreas degradadas, adaptando-se mais facilmente ao ambiente.

O substrato das mudas comercializadas no local A, apresentou apenas a presença da espécie *Glomus clarum* (Tabela 1). A presença de uma única espécie micorrízica pode limitar a eficiência da colonização, devido ao fato de a simbiose entre as plantas e os fungos micorrízicos arbusculares ser modulada por fatores ambientais e pelo manejo do ecossistema (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Desse modo, a eficiência micorrízica

estará sujeita às condições ambientais do local onde as mudas serão transplantadas.

Analisando-se o número total de esporos e as espécies encontradas nos substratos (Figura 1, Tabela 1) e a colonização das raízes de *E. grandis* (Figura 1B), observa-se que, em alguns casos, a simples presença dos esporos no substrato não correspondeu ao grau de colonização das raízes.

Esta característica pode ser observada ao se comparar a porcentagem de colonização das raízes das plantas comercializadas nos locais C e D, onde o substrato do local C apresentou a metade do número de esporos encontrados no local D, mas a colonização das raízes foi superior.

Tabela 1. Número médio de esporos e espécies de fungos micorrízicos arbusculares encontrados em 100 g de substrato das amostras de mudas de *Eucalyptus grandis* comercializadas em seis estabelecimentos no município de Santa Maria. (Média de 6 repetições).

Espécies encontradas	Estabelecimentos comerciais					
	A	B	C	D	E	F
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0	8	2	9	3	6
<i>Gigaspora margarita</i>	0	0	0	3	1	1
<i>Glomus clarum</i>	12	8	4	8	3	1
<i>Glomus etunicatum</i>	0	0	5	9	3	1
<i>Scutellospora heterogama</i>	0	0	7	6	3	0
<i>Scutellospora persica</i>	0	0	2	4	0	0
Total de espécies	1	2	5	6	5	4
Índice de diversidade de Berger-Parker	0,13	0,50	0,65	0,77	0,77	0,34
Índice de diversidade de Simpson's	0,16	0,54	0,80	0,84	0,85	0,59

Este resultado corrobora com os dados de Douds Jr. (1994), o qual descreve que não há correlação entre colonização micorrízica e a esporulação no solo. Segundo Moreira e Siqueira (2006) e Smith e Read (2008), a presença de esporos micorrízicos no solo ou substrato resultará em benefícios nutricionais e adaptativos a planta hospedeira, se as condições bióticas e abióticas do meio permitirem a colonização.

Para o substrato do local F, apesar deste apresentar nove esporos micorrízicos em 100 g de solo, não foi observada colonização nas raízes.

Estes resultados reforçam a afirmativa de que a eficiência na simbiose micorrízica está relacionada à espécie utilizada e as condições ambientais.

A análise das raízes das plantas estudadas não demonstrou a presença de estruturas externas características da associação ectomicorrízica, evidenciando a ausência de fungos ectomicorrízicos.

Através da análise visual dos substratos das mudas de *E. grandis* amostradas foi possível identificar que em dois locais amostrados, as mudas eram cultivadas em substrato composto por materiais orgânicos constituído basicamente por turfa comercial e nos outros locais, as mudas eram cultivadas em uma mistura de solo arenoso e material orgânico. Provavelmente, a utilização de solo para constituição dos substratos tenha proporcionado à presença de esporos micorrízicos, visto que, segundo Smith e Read (2008) solos retirados de comunidades florestais estabelecidas possuem uma vasta diversidade de esporos.

Porém, segundo os mesmos autores, esta prática pode resultar em contaminação do material a ser cultivado, disseminando fitopatógenos para outros locais. Este fato pode ser evidenciado em dois lotes de mudas, onde foram observadas a presença de nematóides e fungos fitopatogênicos (Figura 2).

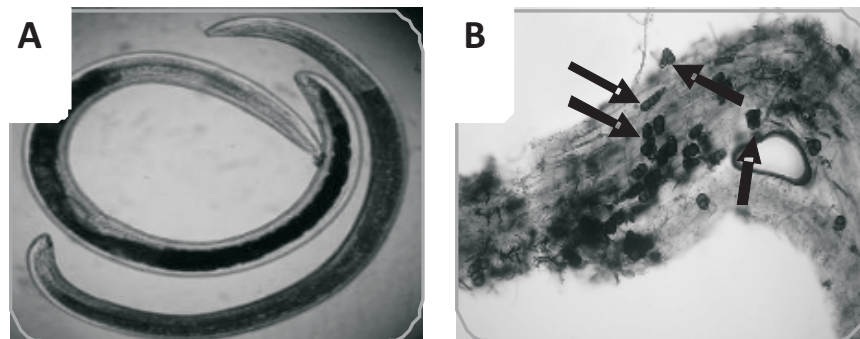


Figura 2. Nematóides e de fungos fitopatogênicos encontrados em três dos seis substratos amostrados (Fotos: Steffen, 2009).

Embora ainda não seja uma tecnologia amplamente utilizada, a utilização dos inoculantes micorrízicos em sistemas de produção de mudas é viável e apresenta grande potencial de mercado no Brasil, porém, a aplicação em larga escala só acontecerá se houver interesse comercial do setor privado para essa tecnologia.

Conclusões

Há a presença de esporos de fungos micorrízicos arbusculares nos substratos das mudas de *Eucalyptus grandis* comercializadas nos seis estabelecimentos em Santa Maria, RS;

A colonização por micorríza arbuscular é baixa nas mudas comercializadas e variou entre os locais amostrados;

A condição de micorrização das mudas de *Eucalyptus grandis* analisadas sugere uma deficiência quanto ao controle da micorrização das mudas comercializadas;

Não há formação de ectomicorriza nas mudas de *Eucalyptus grandis* comercializadas nos seis estabelecimentos em Santa Maria, RS.

Agradecimentos

A CAPES pelas bolsas de Doutorado, ao CNPq pelas bolsas de produtividade e de iniciação científica e ao Departamento de Solos pelo apoio financeiro e logístico.

Literatura citada

- ANDRADE, W. F. de.; ALMEIDA, M. de.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p.1715-1719, 2006.
- ANDREAZZA, R.; ANTONIOLLI, Z. I.; SILVA, R. F. da., LONGHI, S. J. *Pisolithus* sp. na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hillex Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 51-59, 2004.
- 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**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 513-520, 2004.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and proprieties of soils**. 13 ed. Upper Saddle River, New Jersey, 2002, 960p.
- BRUNNER, I. Ectomicorrizas: theiun role in Forest ecosystem unders the impact of pollutants. **Perspectivas in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zürich, v. 4, n. 1. p.13-17, 2001.
- CARRENHO, R. **Influência de diferentes espécies de plantas hospedeiras e fatores edáficos no desenvolvimento de fungos micorrízicos arbusculares (FMA)**. 1998. 226f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- COLOZZI FILHO, A.; SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; GUIMARÃES, P. T. G.; OLIVEIRA, E. Efetividade de diferentes fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas, crescimento pós-transplante e produção de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 9, p. 1397-1406, 1994.
- DOUDS Jr, D. D. Relationship between hyphal and arbuscular colonization and sporulation in mycorrhiza of *Paspalum notatum* Flugge. **New Phytologist**, Sheffield, v. 126, n. 2, p.233-237, 1994.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wt-sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 46, p.235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. A evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Sheffield, v. 84, 489-500, 1980.

- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, Illinois, v. 48, p.692-694. 1964.
- JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, set. 2002.
- 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.
- KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Dundee, v.92, n.4, p.458-488, 1989.
- 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**, Dublin, v. 27. p.177-187. 2004.
- INTERNATIONAL CULTURE COLLECTION OF VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI – INVAM, 2001. Disponível: em <http://invam.caf.wvu.edu/mycinfo/methods/cultures/monosp.htm>. Acesso em: 2006.
- MELLO, A. H. de., ANTONIOLLI, Z. I., KAMINSKI, J., SOUZA, E. L., OLIVEIRA, V. L. de. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 293-301, 2006.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2º Ed. Editora UFLA:Lavras, 2006. 729p.
- NEWMAN, E. E. J. A method of estimating the total length of root sample. **Journal of Applied Ecology**, London, v. 3, p.139-145, 1966.
- OLIVEIRA, V. L.; GIACHINI, A. J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. UFLA: Lavras, 1999, 818p.
- SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J. O. (ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras:Universidade Federal de Lavras / DCS e DCF, 1996, p.203-254.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3ª ed., San Diego,

Academic Press, 2008, 787p.

SILVA, R. F. da.; ANTONIOLLI, Z. I.; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 33-42, 2003.

SANTOS, V. L. dos; MUCHOVEJ, R. M.; BORGES, A. C.; NEVES, J. C. L.; KASUYA, M. C. M. Vesicular-arbuscular and ecto-mycorrhiza sucesoión in seedling of *Eucalyptus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 81-86, 2001.

SOUZA, L. A. B. de.; FILHO, G. N. S.; OLIVEIRA, V. L. de. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p.349-355, 2004.

SOUZA, V. C. de.; SILVA, R. A. da.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p.612-618, 2006.

SOUZA, L. A. B. de.; BONNASSIS, P. A. P.; SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. de. Novos isolados de fungos ectomicorrízicos e o crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 235-241, 2008.

THOMAS, G.; CLAY, D. 2000. **Bio Dap**. Ecological diversity and its measurement. Alma, New Brunswick, Canada, Fundy National Park. Disponível em <<http://nhsbig.inhs.uiuc.edu/wes/populations.html>>. Acesso em julho de 2006.

ZEPPA, S.; SISTI, D.; PIERLEONI, R.; POTENZA, L.; GUESCINI, M.; VALLORANI, L.; STOCCHI, V. *Tilia platyphyllos* Scop.-*Tuber brumale* Vittad. vs. *T. platyphyllos* Scop.- *T. borchii* Vittad. Ectomycorrhizal systems: a comparison of structural and functional traits. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 43, p. 709-716, 2005.

Submetido em: 21/outubro/2009

Aceito em: 12/abril/2010

