

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

**ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS  
COM ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS DO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Robson Andreazza**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2006**

**ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS  
COM ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS DO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**por**

**Robson Andreazza**

Dissertação apresentada ao Curso 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 **Mestre em Ciência do Solo**

**Orientadora: Prof. Dr. Zaida Inês Antonioli**

**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 Dissertação de Mestrado

**ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS COM  
ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS DO ESTADO DO RIO  
GRANDE DO SUL**

elaborada por  
**Robson Andreazza**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência do Solo**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Zaida Inês Antonioli**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Osmar Klauberg Filho**  
(UDESC)

---

**Solon Jonas Longhi**  
(UFSM)

Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2006

**A vocês dedico, meus pais, que sempre me deram apoio, incentivo nos momentos difíceis, e por mais complicados que fossem, nunca deixaram de acreditar que eu era capaz. Amo vocês pela compreensão e carinho.**

**A vocês que me deram esta oportunidade.**

**EU DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois a benção da vida é a coisa mais importante, e as dificuldades são pequenas coisas que diante dela, tornam-se insignificantes. *“O senhor é o meu pastor, e nada me faltará”*.

À professora Zaida Inês Antonioli pela orientação, mas acima de tudo, pela amizade e ensinamentos diários que me proporcionou durante esses anos de convivência.

À FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) de Santa Maria – RS, pelas sementes doadas e auxílio técnico. Principalmente, ao Diretor Nelson Henrique Abiatti da Silva e Fabio Luiz Fleig Saidelles pelo suporte a pesquisa e orientações. Especialmente, ao funcionário Paulo Pedrollo pela ajuda no campo e grande amizade conquistada pela nossa convivência.

À Professora Vetúria L. de Oliveira pela orientação, apoio e conhecimento transmitido ao longo deste percurso com toda a paciência e dedicação.

Ao amigo Luiz Borges pela orientação, hospitalidade, amizade e ajuda fornecida quando precisei.

Aos bolsistas Carlos Moro Junior e Lineu Leal pela convivência, amizade, ajuda responsável durante a execução deste trabalho e pelos finais de semanas e feriados dedicados a pesquisa.

Ao Laboratorista Antônio Bassaco pela amizade e ajuda quando necessitada, sempre realizada com boa vontade.

Aos colegas de curso Rodrigo Ferreira da Silva e Ricardo Bemfica Steffen, pelo dia a dia compartilhado juntos, amigos que serão sempre lembrados como pessoas íntegras e de bom coração.

A CAPES pela bolsa de estudos e auxílio financeiro.

A minha noiva Simone pela ajuda, apoio, carinho e amor, pois sempre que precisei foste incondicional.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I OCORRÊNCIA DE MICORRIZAS EM PLANTIO DE ESSÊNCIAS FLORESTAIS NATIVAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.....</b>	<b>18</b>
<b>1 RESUMO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Espécies nativas estudadas.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Caracterização das áreas coleta.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Coleta das amostras.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Coletas de corpos de frutificação dos fungos ectomicorrízicos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Isolamento e multiplicação.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6 Coleta de raízes e solo.....</b>	<b>24</b>
<b>3.7 Avaliações das raízes.....</b>	<b>24</b>
<b>3.8 Identificação dos esporocarpos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.9 Análises químicas do solo.....</b>	<b>24</b>
<b>3.10 Análises estatísticas.....</b>	<b>25</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Associações micorrízicas.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Caracterização química do solo.....</b>	<b>29</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO II. FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS EM GRÁPIA (<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F. Macbride) E CANAFÍSTULA (<i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert) EM CONDIÇÕES <i>in vitro</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>1 RESUMO.....</b>	<b>44</b>
<b>2 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Esterilização das sementes.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Germinação das sementes.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Preparação dos erlenmeyers.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4 Multiplicação dos isolados com meio MNM.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5 Inoculação das plântulas.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6 Condução do experimento.....</b>	<b>50</b>
<b>3.7 Parâmetros analisados.....</b>	<b>51</b>
<b>3.7.1 Altura de planta.....</b>	<b>51</b>
<b>3.7.2 Massa verde da parte aérea e do sistema radicular e massa seca da parte aérea.....</b>	<b>51</b>
<b>3.7.3 Colonização micorrízica.....</b>	<b>51</b>
<b>3.8 Análise estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>

<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>
<b>3 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>63</b>
<b>4 ANEXOS.....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I OCORRÊNCIA DE MICORRIZAS EM PLANTIO DE ESSÊNCIAS FLORESTAIS NATIVAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Tabela 1 - Presença (+) ou ausência (-) de colonização endomicorrízica (END) e ectomicorrízica (ECT) encontradas em seis espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS, 2006.....	27
Tabela 2 – Ocorrência de fungos ectomicorrízicos em três diferentes épocas do ano em seis espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS, 2006.....	28
Tabela 3 - Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K) e alumínio (Al) do solo, em três épocas de coleta, em bosque de Araucária, Santa Maria, RS, 2006.....	30
Tabela 4 - Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Canafístula, Santa Maria, RS, 2006.....	31
Tabela 5 - Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Timbaúva, Santa Maria, RS, 2006.....	34
Tabela 6 - Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Ipê-roxo, Santa Maria, RS, 2006.....	35
Tabela 7 - Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Grápia, Santa Maria, RS, 2006.....	36
Tabela 8 - Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K),	



alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Ipê-amarelo, Santa Maria, RS, 2006.....	37
---	----

**CAPÍTULO II. FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS EM GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride) E CANAFÍSTULA (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) *in vitro***

Tabela 1. Presença (+) ou ausência (-) de associações ectomicorrízicas em plântulas de grápia e canafístula após serem inoculadas com fungos ectomicorrízicos <i>in vitro</i> , Santa Maria, RS, 2006.....	53
Tabela 2 - Altura de plântulas, Massa Verde Radicular (MVR), Massa Verde da Parte Aérea (MVPA) e Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), de plântulas de grápia inoculadas com fungos ectomicorrízicos, Santa Maria, RS, 2006.....	56
Tabela 3 - Altura de plântulas, Massa Verde Radicular (MVR), Massa Verde da Parte Aérea (MVPA) e Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), em cultivo “ <i>in vitro</i> ” com quatro fungos ectomicorrízicos e plântulas de canafístula, Santa Maria, RS, 2006.....	57

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I OCORRÊNCIA DE MICORRIZAS EM PLANTIO DE ESSÊNCIAS FLORESTAIS NATIVAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

---

Figura 1 - Raízes de araucária (A), canafístula (B), timbaúva (C), grápia (D), ipê-amarelo (E) e ipê-roxo (F), coletadas na Fepagro - Florestas, Santa Maria, RS, 2006..... 26

### CAPÍTULO II: ASSOCIAÇÕES ECTOMICORRÍZICAS EM GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride) E CANAFÍSTULA (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) *in vitro*

---

Figura 1 - Fungo ectomicorrízico *Suillus* sp. UFSM RA 2.8 (A); associação ectomicorrízica entre o isolado UFSM RA 2.8 e plântulas de grápia: cultivo “*in vitro*” fungo + plântulas (B); fungo associado com as raízes (C); manto fúngico ectomicorrízico (D); rede de Hartig (E); Santa Maria, 2006..... 54

---

Figura 2 - Fungo ectomicorrízico *Suillus* sp. UFSM RA 2.8 (A); associação ectomicorrízica entre o isolado UFSM RA 2.8 e plântulas de canafístula: cultivo “*in vitro*” fungo + plântulas (B); fungo associado com as raízes (C); manto fúngico ectomicorrízico (D); rede de Hartig (E); Santa Maria, 2006..... 54

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS COM ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Autor: Robson Andreazza

Orientadora: Zaida Inês Antonioli

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2006.

O trabalho foi desenvolvido na Fepagro Florestas, Santa Maria – RS e no Laboratório de Microbiologia e Biologia do Solo e do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria. Primeiramente, o objetivo foi realizar um levantamento da ocorrência bem como a identificação das associações micorrízicas em seis espécies florestais nativas presentes no Estado do Rio Grande do Sul. O estudo foi conduzido em 3 épocas do ano com a coleta de amostras de solo, raízes e esporocarpos dos fungos. As raízes foram processadas e analisadas quanto ao tipo de colonização micorrízica. Os esporocarpos fungos ectomicorrízicos nativos encontrados foram identificados, isolados e multiplicados. As espécies estudadas foram o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.), canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl.), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.), grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride). As espécies florestais estudadas não apresentaram colonização ectomicorrízica a campo, entretanto, foram encontrados esporocarpos próximos de algumas plantas. Observou-se a presença de associações com fungos endomicorrízicos em todas as espécies. Posteriormente, estudou-se a possibilidade de formar associações com fungos ectomicorrízicos, grápia e canafístula. Foram utilizados os seguintes isolados: na grápia os fungos utilizados foram os isolados UFSM RA 2.8 e UFSM RA 3.6 oriundos da Fepagro Florestas, Santa Maria-RS, classificados como *Suillus* sp. e *Scleroderma* sp., respectivamente e os isolados UFSC Pt 116 (*Pisolithus microcarpus*) e UFSC Pt 24 (*Pisolithus* sp.), oriundos da Universidade Federal de Florianópolis, mais a testemunha sem fungo. Na canafístula o fungo UFSM RA 3.6 foi substituído pelo fungo UFSC Sc 124 (*Scleroderma* sp.). As avaliações foram: altura de planta, massa verde da parte aérea, massa verde radicular, massa seca da parte aérea e colonização micorrízica. Ocorreu a formação de

associação ectomicorrízica nas plântulas de grápia e indícios desta formação com a canafístula quando inoculadas com o fungo ectomicorrízico *Suillus* sp. UFSM RA 2.8. Além disso, os resultados mostram que ocorreu melhor desenvolvimento nas plântulas de grápia quanto a altura de plantas, massa verde radicular e da parte aérea, e massa seca da parte aérea. A grápia apresentou associações ectomicorrízicas com o isolado UFSM RA 2.8, “in vitro”. A canafístula apresentou características morfológicas evidenciando uma possível associação ectomicorrízicas com o inóculo UFSM RA 2.8 em condições de laboratório.

**Palavras Chaves:** Micorrizas, Fungos ectomicorrízicos, espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul, *Araucaria angustifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Peltophorum dubium*, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia impetiginosa*, *Apuleia leiocarpa*.

## ABSTRACT

Dissertation in Soil Science  
Program of Pós-Graduation in Soil Science  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### ASSOCIATION OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI WITH NATIVE FORESTRY SPECIES OF STATE OF RIO GRANDE DO SUL

Author: Robson Andreazza  
Advisor: Zaida Inês Antonioli  
Santa Maria, 24 of February of 2006

The work was development in Forestry Fepagro, Santa Maria, RS and in Laboratory of Biology and Microbiology of Soil and Environment Prof. Marcos Rubens Fries, from Department of Soil of Federal University of Santa Maria. First, the objective was to identify mycorrhizal associations in six native forestry species of Rio Grande do Sul State. This research was conducted in tree seasons of the year, in six native forestry species of State of Rio Grande do Sul. The roots were processed and analyzed according to mycorrhizal colonization type. The sporocarps found of native ectomycorrhizal fungi were identified, isolated and multiplied. The studies species were *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.), *Peltophorum dubium* (Spreng) Taub.), *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl.), *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.), *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride). The forestry species didn't show ectomycorrhizal colonization in native conditions, although, it was found in some sporocarps near to some plants. It was observed the presence of associations with endomycorrhizal fungi in all species. The following study had the objective to test the possibility to form associations with ectomycorrhizal fungi and *Apuleia leiocarpa* and, in the fungi isolated UFSM RA 2.8 and UFSM RA 3.6 from Fepagro Forestry, respectively. These fungi were classified as *Suillus* sp. and *Scleroderma* sp. respectively. The fungi UFSC Pt 116 (*Pisolithus microcarpus*) and UFSC Pt 24 (*Pisolithus* sp.), were from of Federal University of Florianópolis, including the treatment without fungi. In *Apuleia leiocarpa* the fungi UFSM RA 3.6 was substituted by UFSC Sc 124 (*Scleroderma* sp.) fungi. It was analyzed seedling length, brash mass of aerial part and root, dry mass of part aerial, length and root and mycorrhizal colonization. It was observed the formation of ectomycorrhizal association in little plants of *Apuleia leiocarpa* and in *Peltophorum dubium* when inoculated with the ectomycorrhizal fungi *Suillus* sp.(UFSM RA 2.8). Furthermore, the results showed the best development in *Apuleia leiocarpa* in high

plants, brash mass of aerial part and root, dry mass of part aerial. The *Apuleia leiocarpa* showed ectomycorrhizal association with isolated UFSM RA 2.8, “*in vitro*”. The *Peltophorum dubium* showed evidence that is possible have ectomycorrhizal associations with the isolate UFSM 2.8 in laboratory conditions.

**Key Words:** Mycorrhizal, Ectomycorrhizal fungi, natives forestry species of Estado do Rio Grande do Sul, *Araucaria angustifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Peltophorum dubium*, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia impetiginosa*, *Apuleia leiocarpa*.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de mudas de essências florestais nativas é de grande importância para o setor florestal, pois existem grandes dificuldades com seu crescimento e desenvolvimento. Por estes percalços atrasa todo o ciclo produtivo destas essências, inviabilizando a produção e estabelecimento destas espécies. Assim, é interessante procurar alternativas para a produção de mudas, madeira e subprodutos, com alta qualidade e baixo impacto ambiental, como é o caso dos fungos ectomicorrízicos, para reflorestar áreas com essências florestais nativas do estado do Rio Grande do Sul.

CARVALHO, (1998), sugere o reflorestamento de áreas no Sul do Brasil, utilizando espécies que tenham algum tipo de valor comercial ou utilitário, sendo assim de maior aceitação pelo agricultor para o reflorestamento e conservação de muitas áreas que são ou serão problemáticas no futuro.

Alguns microrganismos do solo podem auxiliar no estabelecimento de plantas em áreas de difícil adaptação, como áreas em processo de arenização. Dentre esses destacam-se os fungos ectomicorrízicos, que ao associarem-se com as raízes das plantas, desenvolvem estruturas muito hábeis na absorção de água e nutrientes, os quais são posteriormente transferidos às plantas (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003a; 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2004). Os fungos ectomicorrízicos formam associações mutualísticas com plantas, e absorvem nutrientes para o crescimento das plantas. Muitas espécies de fungos ectomicorrízicos fazem simbiose, e há uma grande importância em identificar e caracterizar sua função, crescimento e ambiente em que eles ocorrem, sendo que a identificação de ectomicorrizas seja fundamental para a pesquisa (GOODMAN *et al.*, 2000).

Estas ectomicorrizas são um tipo de fungos micorrízicos em que o seu componente fúngico localiza-se nos espaços intercelulares do córtex radicular, sem que ocorra penetração intercelular. Esses fungos, embora ocorram em um grupo restrito de plantas, são muito importantes economicamente para o setor florestal (BELLEI & CARVALHO, 1992).

Embora haja poucos estudos sobre associações ectomicorrízicas em espécies nativas na região tropical do sul do Brasil, GIACHINI *et al.*, (2000) observou uma grande diversidade de fungos ectomicorrízicos, e esta região têm um grande potencial de exploração e identificação destes fungos, podendo ocorrer associações simbióticas entre essências florestais nativas e fungos ectomicorrízicos.

Sendo assim, estas associações simbióticas entre espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul e fungos ectomicorrízicos podem ser uma alternativa para o estabelecimento, sustentabilidade e desenvolvimento de espécies arbóreas das matas no Estado. Com os desmatamentos e diminuição da diversidade ecológica de nossas florestas, é imprescindível que a preservação e o estudo das mesmas ocorra quase que simultaneamente.

Assim, há a necessidade de procurar alternativas para a produção de madeira e de mais subprodutos, com alta qualidade e menor impacto ambiental, com o uso de espécies florestais nativas. Neste contexto, a associação de espécies florestais com fungos que formem associações simbióticas mutualísticas, provavelmente sejam uma alternativa promissora (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003a; 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2004). Este trabalho visa estudar a presença de processos simbióticos de fungos ectomicorrízicos, bem como a identificação, isolamento e multiplicação destes organismos para melhorar a produção de mudas nestas espécies florestais nativas de pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*), canafístula (*Peltophorum dubium*), ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha*), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), grápia (*Apuleia leiocarpa*) no Estado do Rio Grande do Sul.



## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREAZZA, R.; et al. Espécies de *Pisolithus* sp. na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.14, n.2, p.51-60, 2004.
- BELLEI, M.; CARVALHO, M.S. Ectomicorrizas. 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.297-318.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies alternativas para o reflorestamento e o seu futuro industrial nos estados do Sul do Brasil. In: SIMPÓSIO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, I SIMADER - RS. v.1, 1998, Santa Maria - RS. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1998, p.21-28.
- GIACHINI, A.J.; et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycological Society of America**, Lawrence, v. 92, n.6, p.1166-1177, 2000.
- GOODMAN, D.M.; TROFYMOW, J.A.; THOMSON, A.J. Developing an online database of descriptions of ectomycorrhizae. **Journal of Ecosystems and Management. Extension Note**, v.1, n. 1, p.1-8, 2000.
- SILVA, R.F. **População de fungos micorrízicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii* em solo arenoso**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.
- SILVA, R.F.; ANTONIOLLI, Z.I; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.1, p.33-42, 2003a.
- SILVA, R.F.; et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. **Bioscience Journal**, v.19, n.3, p.9-17, 2003b.

# CAPÍTULO I. OCORRÊNCIA DE MICORRIZAS EM PLANTIO DE ESSÊNCIAS FLORESTAIS NATIVAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

## 1. RESUMO

A associação micorrízica pode ser um fator importante para o estabelecimento e desenvolvimento das essências florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de associações micorrízicas em seis espécies florestais: pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.), canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.), ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl.), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.), grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride), presentes no Estado do Rio Grande do Sul. O local de coleta das amostras foi na Fepagro - Florestas – Boca do Monte, Santa Maria, em bosques de espécies nativas plantadas. As amostras de solo, raízes e corpos de frutificação dos fungos, foram analisadas no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo e do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, do Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria. As raízes foram processadas e analisadas quanto à presença ou ausência de associações com ecto e endomicorrizas. Os fungos ectomicorrízicos nativos encontrados foram identificados, isolados e multiplicados. As espécies estudadas não apresentaram colonização ectomicorrízica, embora em algumas espécies florestais como a araucária, o ipê-amarelo e a grápia, foram encontrados esporocarpos na projeção da copa. Contudo observou-se a presença de associações com fungos endomicorrízicos em todas as espécies estudadas.

**Palavras Chaves:** *Araucaria angustifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Peltophorum dubium*, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia impetiginosa*, *Apuleia leiocarpa*, fungos micorrízicos, ectomicorriza, endomicorriza.

## 2. INTRODUÇÃO

O Estado do Rio Grande do Sul apresenta grande diversidade de espécies florestais nativas e com ampla abrangência em praticamente todo o território regional. O uso excessivo dos recursos naturais agiliza o processo de esgotamento dos mesmos em uma grande velocidade. No Estado, problemas ocasionados pelo desequilíbrio dos processos que sustentam os ecossistemas, como perdas de produção devidas a inundações, esgotamento de solos e secas, fazem com que se tenha um panorama pouco otimista para as diferentes atividades econômicas (SCHROEDER, 1991).

Segundo levantamentos florestais, as famílias encontradas no Estado do Rio Grande do Sul foram as seguintes: Myrtaceae (69 espécies), Lauraceae (25 espécies), Mimosaceae e Euphorbiaceae (16 espécies), Fabaceae (15 espécies), Asteraceae e Rubiaceae (13 espécies), Solanaceae (11 espécies), Flacourtiaceae, Rutaceae, Verbenaceae e Bignoniaceae (10 espécies), Meliaceae, e Sapindaceae (9 espécies), Moraceae (8 espécies), Anacardiaceae, Aquifoliaceae, Caesalpiniaceae, Sapotaceae e Celastraceae (7 espécies), Annonaceae (5 espécies), Myrsinaceae (6 espécies), Apocynaceae, Araliaceae, Melastomataceae, Monimiaceae, Rhamnaceae e Ulmaceae (4 espécies) (IFCRS, 2006).

No Rio Grande do Sul, embora também tenha ocorrido o desmatamento, têm-se pontos isolados de matas nativas e algumas propostas de recuperação destas matas (ZACHIA *et al.*, 2002). Estas matas estão localizadas na região sudoeste, região de Santa Maria e as matas nativas da metade norte do Rio Grande do Sul. O Estado possuía originalmente, 42% de sua superfície territorial coberta com florestas. Já no início do século XX, foi reduzida para aproximadamente 25%, chegando a apenas 4% em 1965. As poucas áreas nativas existentes restringem-se às áreas de preservação, aos parques, às reservas e aos pequenos percentuais de matas em áreas de difícil acesso. Nas propriedades rurais existem pequenos remanescentes, em sua grande maioria parcialmente explorados (MATTEI & ROSENTHAL, 2002).

Sabe-se que alguns organismos do solo podem auxiliar o estabelecimento de plantas em áreas de difícil adaptação, como áreas em processo de arenização. Entre esses organismos destacam-se os fungos micorrízicos, que ao associar-se com as raízes das plantas, desenvolvem estruturas muito hábeis na absorção de água e nutrientes, que são transferidos às plantas (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003a; 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2003; 2004).

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre fungos do solo e a maioria das plantas vasculares. Através desta associação, a planta fornece ao fungo os carboidratos necessários ao seu crescimento, enquanto que o fungo por meio de suas estruturas externas

(hifas), auxilia na absorção dos nutrientes da solução do solo e os transfere para as plantas (PASCOAL & NAVARRO, 1985; ANTONIOLLI & KAMINSKI, 1991; SMITH & READ, 1997). Dentre as micorrizas, encontram-se as ectomicorrizas, que são um tipo em que o componente fúngico localiza-se nos espaços intercelulares do córtex radicular, sem que ocorra penetração intracelular e as endomicorrizas que podem apresentar penetrações intracelulares, podendo formar estruturas como arbúsculos e vesículas no caso das arbusculares. Os fungos ectomicorrízicos embora ocorram em um grupo restrito de plantas (aproximadamente 5%), no entanto, são muito importantes economicamente para o setor florestal (BELLEI & CARVALHO, 1992).

As endomicorrizas são importantes na fase inicial de desenvolvimento das espécies florestais. Embora a maioria dessas espécies sejam colonizadas pelos fungos ectomicorrízicos, na fase de muda são as endomicorrizas que desempenham um importante papel na absorção de nutrientes (ROJAS & SIQUEIRA, 2000; NOVAIS *et al.*, 2005). Nesse sentido, tem se observado efeitos benéficos de algumas espécies de fungos micorrízicos arbusculares. Por exemplo, CHU *et al.* (2001), observaram um efeito significativo no crescimento de gravioleira quando inoculada com *Scutellospora heterogama* e *Gigaspora margarita*. Aumento de crescimento na ordem de 800% foi também observado em mudas de *Colvillea racemosa* Boj. quando inoculadas com uma mistura de fungos micorrízicos arbusculares, contendo: *Glomus etunicatum*, *G. margarita* e *Acaulospora scrobiculata* (ROJAS & SIQUEIRA, 2000). CALDEIRA *et al.* (1997) observaram maior taxa de sobrevivência de duas leguminosas arbóreas (*Copaifera martii* Hayne e *Dimorphandra macrostachya* Benth.) quando inoculadas com *G. margarita*. BOWEN *et al.* (1974), observaram que no estágio inicial de desenvolvimento de mudas de araucaria a colonização com endomicorrizas aumenta a absorção de zinco.

Os fungos micorrízicos arbusculares são de fundamental importância para a maioria das plantas, pois estas se desenvolvem melhor quando colonizadas por estes fungos devido a um aumento de sua capacidade em explorar o solo, tanto em área de superfície de contato quanto em volume, absorvendo, maiores quantidades de nutrientes (NOVAIS *et al.*, 2005). Assim, o conhecimento da ocorrência dos fungos micorrízicos arbusculares principalmente em áreas degradadas, é um fator biológico importante para maximizar os efeitos da simbiose destes fungos com as mudas das espécies florestais usadas no reflorestamento ou revegetação.

O crescimento e o estabelecimento de plantas são alterados com a colonização dos fungos ectomicorrízicos, isto pelos efeitos morfogenéticos proporcionado ao sistema radicular, como alteração das raízes e redução da dominância apical (ALEXANDER, 1981). O

estabelecimento da simbiose micorrízica é um processo complexo e com muitas etapas, estas requerem complexação morfogenética, bioquímica, fisiológica e mudanças moleculares (HILBERT & MARTIN, 1988; HILBERT *et al.*, 1991). Dois isolados com o início do contato no mesmo período com as raízes do hospedeiro podem ter rotas, estágios e tempos de colonização diferentes, mesmo que os isolados sejam de mesmo gênero de ectomicorrizas (MALAJCZUK *et al.*, 1990).

Geralmente a taxa de sobrevivência de espécies arbóreas pode ser significativamente influenciada pela associação micorrízica (ANDREAZZA *et al.* 2003; BRUNDRETT *et al.*, 1996). Em um estudo sobre o comportamento de quatro leguminosas em relação à inoculação micorrízica, observou-se que plantas inoculadas apresentaram maior percentagem de colonização micorrízica de raízes finas e maior taxa de sobrevivência das mudas (CALDEIRA *et al.*, 1997; 1999).

A influência das relações espaciais e temporais entre os fungos ectomicorrízicos e as plantas influenciam na redução da competição entre plantas de mesma espécie e de espécies diferentes, aumentando a disponibilidade de nutrientes, água, e reduzindo o efeito de intempéries e a incidência de fungos patogênicos e pragas, (AMARANTHUS & PERRY, 1994; DODD & THOMSON, 1994). Com a constante mudança dos ecossistemas nas florestas, os fungos ectomicorrízicos reduzem o efeito da variação dos ecossistemas, como clima, manejo, ventos, aumentando a resistência das plantas associadas, favorecendo sua estabilização (AMARANTHUS & PERRY, 1994).

Por isso sabe-se que é de grande importância estudos sobre quais são estas espécies florestais que podem formar associações simbióticas micorrízicas (FRIONI *et al.*, 1999). Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar associações micorrízicas em bosque de essências florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul e avaliar as características químicas do solo que influenciam o estabelecimento de associações micorrízicas em condições de campo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido na Fepagro - Florestas – Santa Maria – RS e no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). No centro de Pesquisas em Recursos Florestais da Fepagro – Florestas, foram realizadas as coletas de corpos de frutificação dos fungos ectomicorrízicos, raízes das essências florestais e solo. Posteriormente, o material foi analisado no Laboratório Prof. Marcos Rubens Fries, para identificação, isolamento dos isolados dos fungos ectomicorrízicos e avaliação morfológica das raízes das espécies florestais estudadas.

#### 3.1. Espécies nativas estudadas

As espécies nativas estudadas foram: pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*), canafístula (*Peltophorum dubium*), ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha*), ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*) e grápia (*Apuleia leiocarpa*).

#### 3.2. Caracterização das áreas de coleta

A coleta foi realizada na estação experimental da Fepagro com aproximadamente 280 ha, localizada em Boca do Monte no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Na área de araucária o terreno é plano, o bosque tem em torno de 10 ha, com idade aproximadamente de 40 anos, sendo localizado próximo ao plantio de pinus (*Pinus elliottii* Engelm.). A área de mata nativa avaliada está localizada próximo da sede da Fepagro. A vegetação é arbustiva e com uma camada de serrapilheira (20 cm) e pequenas palmeiras.

As áreas de canafístula, timbaúva, ipê-roxo e grápia estão localizadas próximas e em terreno ondulado, sendo em ordem da parte mais alta (próximo ao asfalto) até a parte mais baixa (indo próximo ao centro da estação), em declive. Estas quatro espécies foram plantadas na mesma época e tem 17 anos de implantação. A vegetação predominante nesta área é de gramíneas, sendo de alta densidade e tamanho.

A área de ipê-amarelo está localizada em terreno plano e o bosque tem 0,5 ha, e a vegetação predominante é de gramíneas de porte baixo.

Em todas as áreas das espécies nativas faziam parte de plantios homogêneos instalados para pesquisa.

Observou-se a ocorrência espontânea de a ocorrência de plantas de pinus como invasoras, próximas ou dentro das áreas de plantio das espécies estudadas.

### **3.3. Coleta de amostras**

Foi marcado cinco plantas por espécie florestal. As plantas marcadas e identificadas foram escolhidas aleatoriamente e de forma que representasse a população de plantas na área.

As coletas a campo foram efetuadas em três épocas do ano, no Outono, Inverno e Primavera de 2004. Na mata de araucária, foram realizadas as amostragens nos dias 13/05, 23/08, 25/11/2004. No ipê-amarelo foram realizadas nos dias 24/06, 28/08 e 25/11/2004, e na canafistula, timbaúva, ipê-roxo e grápia as amostragens ocorreram nos dias, 20/05, 21/10 e 21/11/2004.

### **3.4. Coleta de corpos de frutificação dos fungos ectomicorrízicos**

A identificação das plantas foi feita com tinta óleo para futura localização. Foi realizada dentro do perímetro da copa da planta a contagem do número de corpos de frutificação dos fungos ectomicorrízicos e medida a distância entre esporocarpos e o tronco da planta. O local de emissão dos corpos de frutificação dos fungos, foi marcado com uma estaca de madeira e enumerado com o número do fungo. Os corpos de frutificação dos fungos foram coletados em sacos de papel e levados ao laboratório acondicionados em caixa de isopor.

### **3.5. Isolamento e multiplicação**

Os corpos de frutificação foram catalogados e fotografados. Uma parte dos basidiocarpos foi seca em estufa a 50°C e guardados em local seco. Amostras dos esporocarpos foram isoladas em laboratório conforme BRUNDRETT *et al.*, (1996). Para isto os esporocarpos foram desinfetados externamente pincelando solução de álcool 70% com pincel n° 12. Os esporocarpos foram então, partidos ao meio e foi retirada uma alíquota do interior do micélio e posto para incubação em placa de Petri contendo meio Hagen (Anexo 1). As placas foram incubadas e as não contaminadas e apresentaram crescimento micelial, foram transferidas para placas de Petri com meio MNM (MARX, 1969) (Anexo 2). Após o isolamento os fungos foram processados em laboratório utilizando-se de técnicas assépticas para a multiplicação dos fungos ectomicorrízicos (BRUNDRETT *et al.*, 1996). O meio foi preparado, esterilizado e colocado 20 mL por placa de Petri, em câmara de fluxo. Posteriormente, os fungos ectomicorrízicos foram incubados a 25°C em incubadora.

### **3.6. Coleta de raízes e solo**

O solo coletado foi homogeneizado e separado dos restos vegetais para a análise química no Laboratório Central de Análises de Solo da Universidade Federal de Santa Maria.

As raízes separadas foram lavadas em água corrente dentro de uma peneira 50  $\mu\text{m}$ , e separada das raízes contaminantes e armazenadas por 20 dias em um recipiente contendo 80 mL de álcool 50%. Após este período foi realizada a visualização e identificação da morfologia radicular para análise de colonização micorrízica, cortadas em pedaços de 5 cm e separada uma porção representativa para armazenagem em frascos de vidro com álcool 50% para posterior caracterização de associação micorrízica.

### **3.7. Avaliações das raízes**

As avaliações das alterações morfológicas foram feitas de três maneiras: a) identificação visual da raiz, observando as alterações morfológicas, como manto, ramificações e coloração, que possivelmente teriam sido provocadas por fungos ectomicorrízicos. b) no Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, sob o auxílio da Prof. Dra. Vetúria L. de Oliveira, foram realizados cortes transversais nas raízes com microton para visualização em microscópio, observando as estruturas e rede de Hartig do fungo ectomicorrízico (BRUNDRETT *et al.*, 1996). c) as associações endomicorrízicas foram observadas pelo método de coloração micorrízica (BRUNDRETT *et al.*, 1996).

### **3.8. Identificação dos esporocarpos**

A identificação final dos isolados foi feita no Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, sob o auxílio da Prof. Dra. Vetúria de Oliveira, e usados alguns sites como o BCERN (2004), que possuem fotos ilustrativas e descrição de caracteres taxonômicos, e morfológicos como cor, tamanho, forma entre outras características.

### **3.9. Análises químicas do solo**

As análises químicas do solo foram realizadas pelo Laboratório Central de Análise de Solos, no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria – RS. As variáveis analisadas foram o teor de argila (%), teor de matéria orgânica (%), saturação por bases (%), saturação por alumínio (%), pH em água (1:1), teor de fósforo Merlich (mg/L), potássio



(mg/L), teor de alumínio (cmol<sub>c</sub>/L), teores de cálcio (cmol<sub>c</sub>/L) e magnésio (cmol<sub>c</sub>/L) do solo (TEDESCO *et al.*, 1995).

### **3.10. Análises estatísticas**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições. Os dados em porcentagem foram transformados pelo método da raiz quadrada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando da significância dos efeitos apontado pela análise de variância, foram submetidos ao teste de comparação de médias (teste Tukey), tomando como base os níveis de significância maiores que 95% ( $p < 0,05$ ). Utilizou-se para a análise o programa estatístico SOC, desenvolvido pelo Núcleo Tecnológico para Informática NTIA/EMBRAPA (EMBRAPA, 1997).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Associações micorrízicas

Na análise de colonização micorrízica não foram observadas associações ectomicorrízicas entre as seis espécies florestais nativas, embora todas as espécies avaliadas apresentaram associações com fungos endomicorrízicos (Tabela 1 e Figura 1).

Em trabalho realizado por ZANGARO *et al.*, (2002), a canafistula não apresentou associações endomicorrízicas, mas nas espécies ipê-roxo, ipê-amarelo e timbaúva foi constatado associações com estes fungos micorrízicos.

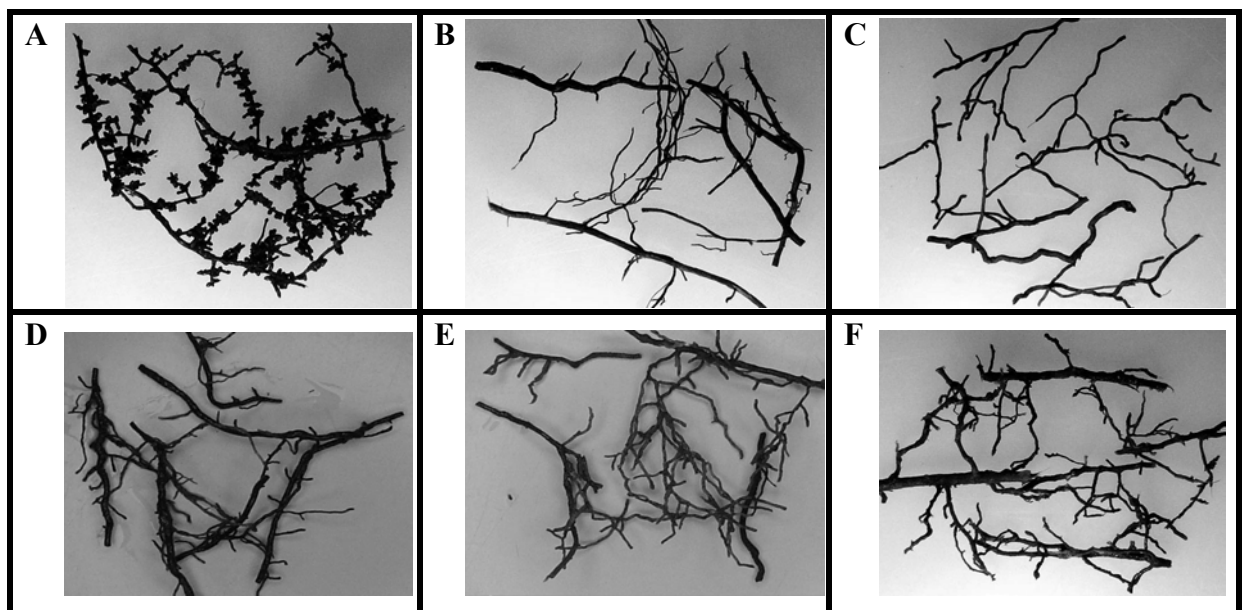


Figura 1. Raízes de araucária (A), canafistula (B), timbaúva (C), grápia (D), ipê-amarelo (E) e ipê-roxo (F), coletadas na Fepagro - Florestas, Santa Maria, RS, 2006.

Em geral, essências florestais nativas podem formar simbiose com fungos micorrízicos, como plantas da família das Leguminosas que podem associar-se com dois tipos de fungos micorrízicos, geralmente endomicorrizas e ectomicorrizas (STURNER & BELLEI, 1994). Importantes árvores como da subfamília Caesalpinioideae são normalmente ectomicorrizadas (ALEXANDER, 1989). Arbóreas da subfamília Papilionoideae são associadas normalmente com fungos micorrízicos arbusculares, Mimosoideae podem associar-se tanto com fungos ectomicorrízicos quanto endomicorrízicos (GROVE & LE TACON, 1993).

Fatores biológicos também podem ser relacionados com altos níveis de inóculo de fungos ectomicorrízicos, e a formação de associações (AMARANTHUS & PERRY, 1994). Quanto maior a quantidade de inóculo no solo, maior será a chance de formar associações micorrízicas entre plantas e fungos (DODD & THOMSON, 1994). Contudo, o declínio do

potencial de colonização em espécies florestais, pode ocorrer devido à remoção de plantas nativas, perdas de nutrientes, umidade insuficiente, predadores e a degradação da estrutura física do solo (AMARANTHUS & PERRY, 1994).

Não foi observado variação nas épocas de coleta quanto à presença da colonização endomicorrízica. Isto também foi observado no trabalho com a influência sazonal da época do estabelecimento das culturas de fungos micorrízicos arbusculares em *Brachiaria decumbens*, que não diferiu estatisticamente entre as épocas utilizadas nas variáveis estudadas (NOVAIS *et al.*, 2005).

O efeito sobre a altura de plantas, peso seco e absorção de N pela araucária, indicam que as respostas foram devidas provavelmente ao estabelecimento da simbiose micorrízica, visto em estudos com inóculos de micorrizas nativas em Araucária, em que o substrato não tinha sido fumigado, os efeitos da adição de inóculo de micorrízica são pouco acentuados (OLIVEIRA *et al.*, 1992). Isto evidencia a importância da endomicorriza para esta espécie florestal.

Tabela 1. Presença (+) ou ausência (-) de colonização endomicorrízica (END) e ectomicorrízica (ECT) encontradas em seis espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS, 2006.

<b>Nome comum</b>	<b>Nome científico</b>	<b>END</b>	<b>ECT</b>
Pinheiro-do-paraná	<i>Araucaria angustifolia</i>	+	-
Timbaúva	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	+	-
Canafístula	<i>Peltophorum dubium</i>	+	-
Ipê-amarelo	<i>Tabebuia chrysotricha</i>	+	-
Ipê-roxo	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	+	-
Grápia	<i>Apuleia leiocarpa</i>	+	-

De acordo com a Tabela 2, pode-se observar que foram encontrados esporocarpos somente no outono, evidenciando melhores condições ambientais, como temperatura e umidade para o desenvolvimento destas frutificações ectomicorrízicas. Embora tenha a presença de inóculo de fungos ectomicorrízicos, ou seja, esporocarpos presentes em algumas espécies nativas, não houve a simbiose entre fungos ectomicorrízicos e plantas (Tabela 1). Isto também foi observado no trabalho de FRIONI *et al.*, (1999), em que foram estudadas associações de micorrizas arbusculares e ectomicorrizas em leguminosas nativas do Uruguai.

A presença dos esporocarpos destes fungos não indica que eles estão realizando simbiose com estas espécies, pois estes fungos podem ser em algum período de seu ciclo saprófitos, e assim como o pinus ser um invasor nestas áreas.

Tabela 2. Fungos ectomicorrízicos encontrados em três diferentes épocas do ano em seis espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS, 2006.

Nome comum	Época	nº esporocarpos	Fungos *	Distância (cm)**
Pinheiro-do-paraná	<b>Outono</b>	48	<i>Laccaria</i> sp.	164
	<b>Inverno</b>	-	-	-
	<b>Primavera</b>	-	-	-
Timbaúva	<b>Outono</b>	-	-	-
	<b>Inverno</b>	-	-	-
	<b>Primavera</b>	-	-	-
Canafístula	<b>Outono</b>	-	-	-
	<b>Inverno</b>	-	-	-
	<b>Primavera</b>	-	-	-
Ipê-amarelo	<b>Outono</b>	2	<i>Suillus</i> sp.	10
	<b>Inverno</b>	2	<i>Scleroderma</i> sp.	40
	<b>Primavera</b>	-	-	-
Ipê-roxo	<b>Outono</b>	-	-	-
	<b>Inverno</b>	-	-	-
	<b>Primavera</b>	-	-	-
Grápia	<b>Outono</b>	9	<i>Lactarius</i> sp.	177
	<b>Inverno</b>	-	-	-
	<b>Primavera</b>	-	-	-

\*Fungos ectomicorrízicos encontrados próximos às espécies florestais.

\*\*Distância média entre os fungos ectomicorrízicos encontrados e o tronco da planta.

De acordo com levantamentos sobre micorrizas, realizados em florestas de *Araucaria angustifolia* e de *Cabrela cangerana* no Sul do Brasil na Floresta Atlântica, observou-se apenas a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (ANDRADE *et al.*, 2000). Estes autores reforçam, entretanto, a idéia de que a ausência de ectomicorrizas esta relacionada à inexistência de propágulos de fungos ectomicorrízicos nas áreas de amostragem. O

*Peltophorum dubium* em levantamentos realizados em florestas nativas no Uruguai, 48% de colonização com fungos micorrízicos arbusculares, não sendo encontrada colonização ectomicorrízica, enquanto o *Enterolobium* sp. não apresentou nenhum tipo de colonização (FRIONI *et al.*, 1999). Pode-se dizer que a grande maioria das espécies da família das leguminosas podem formar associações com fungos micorrízicos arbusculares (ZANGARO *et al.*, 2002; FONSECA *et al.*, 2005), sendo mais um indício que o ambiente é muito importante para que haja formação das micorrizas. Em estudo com mudas de espécies arbóreas nativas do sudeste brasileiro, (SAJIN-JUNIOR, 1997) observou que ipê-roxo e ipê-amarelo apresentaram formação de simbiose com o fungo micorrízico *Glomus etunicatum*.

Florestas nativas de araucária podem formar associações endomicorrízicas com maior porcentagem de colonização que em áreas de reflorestamento, e sua colonização pode ficar na faixa de 20 a 40% (MOREIRA *et al.*, 2005). A araucária é uma planta micotrófica e forma associações com fungos endomicorrízicos, podendo ser facilmente influenciado por fatores ambientais (CARDOSO *et al.*, 2005), não deixando dúvidas sobre este tipo de associação.

Assim, a associação com fungos arbusculares em espécies florestais parece apresentar uma relação importante para o benefício do vegetal. Entretanto, mais estudos nesta área são necessários para caracterizar melhor a função e importância dos fungos micorrízicos, tanto endo como ectomicorrizas.

### **4.3. Caracterização química do solo**

Na área com araucária, as variáveis argila, saturação por bases, saturação por alumínio, pH, fósforo, potássio, alumínio, cálcio e magnésio não apresentaram diferença significativa entre as três épocas de coleta no ano (Tabela 3). Neste caso, a saturação por bases, saturação por alumínio, teores de fósforo, potássio, alumínio, cálcio e magnésio, pode-se atribuir a um alto coeficiente de variação, devido ao método de coleta por ser pontualizada. Os fatores químicos podem ser influenciados por processos com a precipitação e temperatura variável dentro de um ano (SCHUMACHER *et al.*, 2004), entre vários outros fatores ambientais.

Tabela 3. Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K) e alumínio (Al) do solo, em três épocas de coleta, em bosque de Araucária, Santa Maria, RS, 2006.

Época	Argila	M.O.	S	SAL	pH-água
	----- % -----				1:1
<b>Outono</b>	18,60 a*	4,68 a	59,00 a	12,40 a	4,78 a
<b>Inverno</b>	18,00 a	3,60 ab	54,00a	15,20 a	4,72 a
<b>Primavera</b>	18,00 a	3,10 b	30,80a	33,80 a	4,26 a
<b>CV%</b>	10,23	9,63	39,89	60,40	9,35
	P	K	Al	Ca	Mg
	----- mg/L -----		----- cmol <sub>c</sub> /L -----		
<b>Outono</b>	20,52 a	81,20 a	0,70 a	6,02 a	1,22 a
<b>Inverno</b>	13,20 a	86,40 a	0,82 a	4,80 a	0,86 a
<b>Primavera</b>	13,00 a	73,20 a	1,72 a	2,54 a	0,62 a
<b>CV%</b>	47,02	43,24	98,77	46,40	44,76

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Geralmente, na primavera e verão ocorre uma maior decomposição do material sobre o solo. DIAS & OLIVEIRA FILHO (1997) relataram que a variação na formação de serrapilheira é esperada em virtude das diferenças nas condições ambientais, principalmente de pluviosidade. Na primeira coleta, ou seja, no outono, ocorreu um valor maior no teor de matéria orgânica, por apresentar neste período uma espessa camada de serrapilheira sobre o solo. Segundo SCHUMACHER *et al.*, (2004), a serrapilheira é de grande importância para a reposição química do solo, sendo que, as maiores concentrações de elementos químicos foram encontradas nas acículas, menos para o potássio, que apresentou concentração superior nos galhos.

Picos maiores de deposição da serrapilheira ocorreram entre os meses de julho e setembro, quando se inicia um período de elevação da temperatura. Tal estratégia é característica das Florestas Estacionais Deciduais do Sul do Brasil, onde uma estagnação do

crescimento provocada pelo inverno faz com que ocorra a eliminação da folhagem senescente, visando o novo período de crescimento, que se inicia com a primavera, com o aparecimento de folhagem nova, podendo aumentar a liberação de minerais a partir deste período pela decomposição do material orgânico (KÖNIG *et al.*, 2002).

Na área com canafistula, as variáveis como teor de argila, matéria orgânica, teores de fósforo, potássio, cálcio e magnésio não apresentaram diferença significativa entre as três épocas de coleta (Tabela 4). Já, a saturação por bases e o pH tiveram uma redução significativa na primavera, podendo ser, devido a maior absorção de nutrientes que reduz a concentração de sais na solução do solo, diminuindo o pH e aumentando a saturação por alumínio e conseqüentemente a concentração do íon alumínio.

Tabela 4. Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Canafistula, Santa Maria, RS, 2006.

Época	Argila	M.O.	S	SAL	pH-água
	----- % -----				
<b>Outono</b>	18,00 a*	2,44 a	47,80 a	19,40 a	4,74 a
<b>Inverno</b>	19,00 a	2,04 ab	40,60 a	24,00 a	4,66 a
<b>Primavera</b>	20,80 a	1,46 b	24,40 b	40,00 a	4,46 b
<b>CV%</b>	5,64	10,94	11,19	22,34	1,74
	P	K	Al	Ca	Mg
	----- mg/L -----		----- cmol/L -----		
<b>Outono</b>	3,86 a	87,20 a	0,66 b	1,72 a	0,78 a
<b>Inverno</b>	5,60 a	86,40 a	0,80 ab	1,96 a	0,80 a
<b>Primavera</b>	3,68 a	83,60 a	1,38 a	1,20 a	0,58 b
<b>CV%</b>	41,73	19,59	38,81	36,88	21,06

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os benefícios com fungos micorrízicos pode estar diretamente relacionado aos teores de fósforo do solo. Por exemplo, quando cultivou-se algodoeiro em solo com deficiência de

fósforo, este mostrou uma elevada dependência micorrízica (SIQUEIRA *et al.*, 1986a); em soja, a associação com fungos micorrízicos arbusculares, mostrou um efeito negativo na colonização micorrízica com um aumento nas doses de fósforo (NOGUEIRA & CARDOSO, 2000). Assim, é necessário o conhecimento do teor de fósforo disponível no solo, para se obter o melhor resultado da associação micorrízica, que geralmente caracteriza-se por um incremento da massa seca, tanto da parte aérea, quanto radicular das plantas em simbiose (ANTONIOLLI & KAMINSKI, 1991; SMITH & READ, 1997; NOGUEIRA & CARDOSO, 2000; SOUZA & CARDOSO, 2001).

O efeito positivo dos fungos micorrízicos arbusculares na nutrição das plantas, pode estar relacionado a uma melhora na eficiência de absorção de P pelas plantas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (MARX, 1980; CASTELHANO & MOLINA, 1989; BOUGHER *et al.*, 1990; CARNEIRO *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2001). Desse modo, a utilização de fungos micorrízicos arbusculares pode ser uma importante alternativa na nutrição de espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul.

A germinação dos esporos dos fungos endomicorrízicos está relacionada ao pH do meio e varia entre os gêneros de fungos micorrízicos arbusculares. De uma forma geral, considera-se que os gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* preferem pH mais ácido de 4,0 a 6,0, enquanto *Glomus*, na faixa de 6,0 a 8,0 (SIQUEIRA & FRANCO, 1988; SMITH & READ, 1997; SILVEIRA, 1998).

Para as análises do pH, realizadas neste trabalho com espécies nativas, o pH variou entre 4,0 à 5,0 (Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8). A variação no pH pode alterar a solubilidade de elementos como Al, Fe, Mn e Cu, que em níveis tóxicos podem reduzir a germinação de esporos e o crescimento do tubo germinativo (LAMBAIS & CARDOSO, 1989; SIQUEIRA *et al.*, 1982). Embora, os fungos micorrízicos tenham sido encontrados em solos com pH variando de 2,7 a 9,2, ocorrem diferenças entre as espécies e isolados de fungos quanto à capacidade de germinar e colonizar o hospedeiro em função do pH do solo (MALUF *et al.*, 1988; SIQUEIRA *et al.*, 1986b). A maior ocorrência de *Acaulospora* e *Scutellospora*, encontradas neste trabalho, pode estar relacionado a habilidade dessas espécies em desenvolver-se no pH deste solo que variou de 4,4 à 5,0.

Os fungos micorrízicos arbusculares não ocorrem de maneira generalizada nas essências florestais, mas são de grande importância na fase inicial de estabelecimento dessas espécies (BELLEI & CARVALHO, 1992). Algumas espécies como por exemplo o eucalipto, podem apresentar tanto ectomicorrizas como endomicorrizas (BELLEI & CARVALHO, 1992), contudo, quando adultos, são sobretudo colonizadas essencialmente por fungos



ectomicorrízicos (LETACON *et al.*, 1987). Embora a importância das endomicorrizas não esteja relacionada ao plantio de espécies florestais adultas, sua importância relaciona-se a fase inicial de estabelecimento dessas plantas, o que torna interessante o estudo dessas comunidades de fungos em áreas cultivadas com plantas florestais, como o pinus e o eucalipto.

Nas parcelas com a canafístula e com a timbaúva, foi observado que as variáveis como teor de argila, teores de potássio, cálcio e magnésio não apresentaram diferença significativa entre as três épocas de coleta (Tabela 4 e 5). Sendo que a saturação por alumínio e teores de íons alumínio no solo também não mostraram diferença significativa entre as três épocas de coleta (Tabela, 5). Pelos resultados obtidos, pode-se observar que ocorreu uma acidificação do outono até a primavera e ocorreu um maior acúmulo de material orgânico no inverno, ou seja, uma menor decomposição dos resíduos vegetais.

No ipê-roxo, foi observado que a porcentagem de argila, matéria orgânica e os teores de potássio alumínio e cálcio não mostraram diferenças significativas nas três estações do ano estudadas (Tabela 6). Embora, tenha ocorrido uma leve acidificação estatisticamente significativa do outono até a primavera.

Tabela 5. Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Timbaúva, Santa Maria, RS, 2006.

Época	Argila	M.O.	S	SAL	pH-água
	----- % -----				1:1
<b>Outono</b>	20,20 a*	1,84 b	34,00 a	42,00 b	4,52 a
<b>Inverno</b>	21,80 a	2,14 a	30,20 a	43,60 b	4,32 b
<b>Primavera</b>	21,60 a	1,48 c	17,80 b	57,40 a	4,30 b
<b>CV%</b>	3,94	8,57	12,93	12,42	2,24
	P	K	Al	Ca	Mg
	----- mg/L -----		----- cmol/L -----		
<b>Outono</b>	3,06 ab	106,80 a	1,48 a	1,32 a	0,58 a
<b>Inverno</b>	4,00 a	98,40 a	1,86 a	1,20 a	0,98 a
<b>Primavera</b>	2,74 b	101,20 a	2,10 a	0,72 a	0,62 a
<b>CV%</b>	20,00	24,81	23,50	45,80	37,77

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na floresta estudada com grápia amarela, as porcentagens de argila, matéria orgânica, saturação por alumínio e nos teores de potássio, cálcio e magnésio, não ocorreu diferenças significativas (Tabela 7). Mas a saturação por bases e o pH em água apresentou maiores valores no outono e decresceram até a primavera (Tabela 7).

Tabela 6. Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Ipê-roxo, Santa Maria, RS, 2006.

Época	Argila	M.O.	S	SAL	pH-água
	----- % -----				1:1
<b>Outono</b>	17,00 a*	1,50 a	31,80 ab	44,60 ab	4,58 a
<b>Inverno</b>	17,00 a	1,68 a	40,80 a	28,80 b	4,50 ab
<b>Primavera</b>	18,60 a	1,52 a	23,40 b	52,40 a	4,38 b
<b>CV%</b>	3,93	9,68	12,94	12,42	2,54
	P	K	Al	Ca	Mg
	----- mg/L -----		----- cmol/L -----		
<b>Outono</b>	2,92 b	61,60 a	1,12 a	0,90 a	0,34 a
<b>Inverno</b>	5,42 a	61,60 a	1,12 a	1,06 a	0,48 a
<b>Primavera</b>	3,84 b	60,00 a	1,62 a	0,94 a	0,36 a
<b>CV%</b>	23,09	26,26	29,28	34,10	16,73

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Grápia, Santa Maria, RS, 2006.

Época	Argila	M.O.	S	SAL	pH-água
	----- % -----				1:1
<b>Outono</b>	14,80 a*	1,26 a	32,60 a	49,40 a	4,54 a
<b>Inverno</b>	15,20 a	1,38 a	23,00 ab	52,00 a	4,44 ab
<b>Primavera</b>	15,80 a	1,20 a	18,20 b	62,80 a	4,32 b
<b>CV%</b>	2,63	3,01	16,62	8,53	1,74
	P	K	Al	Ca	Mg
	----- mg/L -----		----- cmol/L -----		
<b>Outono</b>	3,36 b	44,80 b	1,60 b	1,08 a	0,56 a
<b>Inverno</b>	5,86 a	60,00 a	1,54 b	0,84 a	0,52 a
<b>Primavera</b>	4,90 a	41,20 b	1,98 a	0,68 a	0,42 a
<b>CV%</b>	18,71	25,07	9,86	52,11	35,96

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O solo coletado em plantações com ipê-amarelo obteve juntamente com araucária, a timbaúva e a grápia, uma menor variação entre as épocas de coleta de solo, mostrando um solo com menores variações e ou mais estáveis dentro deste período. O solo com ipê-amarelo mostrou que as porcentagens de material orgânico, saturação por bases, pH e os teores de fósforo, potássio, alumínio e cálcio não apresentaram diferença significativa entre as estações do ano avaliado (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de argila (Argila), matéria orgânica (M.O.), saturação por bases (S), saturação por alumínio (SAL), pH em água, fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al) cálcio (Ca) e magnésio (Mg) do solo em três épocas de coleta em Floresta de Ipê-amarelo, Santa Maria, RS, 2006.

Época	Argila	M.O.	S	SAL	pH-água
	----- % -----				1:1
<b>Outono</b>	17,40 ab	1,94 a	29,00 a	30,60 a	4,54 a
<b>Inverno</b>	17,80 a	2,62 a	47,00 a	23,00 a	4,66 a
<b>Primavera</b>	15,80 b	2,24 a	40,00 a	18,20 a	4,72 a
<b>CV%</b>	2,95	7,57	12,06	34,74	5,60
	P	K	Al	Ca	Mg
	----- mg/L -----		----- cmol/L -----		
<b>Outono</b>	4,94 a	53,60 a	1,04 a	2,00 a	0,30 b
<b>Inverno</b>	3,98 ab	80,00 a	0,96 a	2,64 a	0,40 ab
<b>Primavera</b>	6,18 a	79,20 a	0,68 a	2,44 a	0,48 a
<b>CV%</b>	32,79	31,80	54,38	26,70	21,77

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Em geral, pode-se observar que não houve diferenças significativas nas diferentes estações do ano em relação as características químicas do solo. Isto pode sugerir que não há necessidade de realizar coletas amostrais de solo em um período relativamente curto, para verificar sua variabilidade química em espécies florestais nativas.

## **5. CONCLUSÕES**

As espécies florestais nativas de araucária, timbaúva, canafístula, ipê-amarelo, ipê-roxo e grápia apresentaram associação com fungos micorrízicos arbusculares, mas não com fungos ectomicorrízicos em seu habitat natural.

Não houve relação entre as associações simbióticas entre fungos ectomicorrízicos, caracterização química e as seis espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul em seu habitat natural.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, I.J. Systematic and ecology of ectomycorrhizal legumes. In: ZARUCCHI, J.L. STIRTON, C.H. (Eds.). **Advances in Legumes Biology**, St. Luis: Missoure Botanical Garden. 1989. v.29, p.607-624.
- ALEXANDER, I.J. The *Picea sitchensis* + *Lactarius rufus* mycorrhizal association and its effects on seedling growth and development. **British Mycological Society**, p.417-423, 1981.
- ALVES, J.R.; et al. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucaliptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.2, p.307-313, 2001.
- AMARANTHUS, M.P.; PERRY, D.A. The functional of ectomycorrhizal fungi in the field: linkages in space and time. **Plant and Soil**, v.159, n.1, p.133-140, 1994.
- ANDRADE, A.C.S.; et al. Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brasil. **Mycorrhiza**, v.10, p.131-136, 2000.
- ANDREAZZA, R.; et al. Espécies de *Pisolithus* sp. na produção de mudas de *Eucaliptus grandis* Hill ex Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.14, n.2, p.51-60, 2004.
- ANDREAZZA, R.; et al. Avaliação de mudas de Eucalipto inoculadas com fungos ectomicorrízicos em solo arenoso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29. 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: UESP, 2003.1 CD-ROM.
- ANTONIOLLI, Z.I.; KAMINSKI, J. Micorrizas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.2, n.3, p.441-455, 1991.
- BCERN - BRITISH COLUMBIA ECTOMYCORRHIZAL RESEARCH NETWORK. Disponível em: [www.pcf.forestry.ca/biodiversity/bcern/index\\_e.html](http://www.pcf.forestry.ca/biodiversity/bcern/index_e.html), Acesso em: 10 mai. 2004.
- BELLEI, M.; CARVALHO, M.S. Ectomicorrizas. 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.297-318.
- 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**, Cambridge, v.114, n.1, p.77-85, 1990.
- BOWEN, G.D.; SKINNER, M.F.; BEVEGE, D.I. Zinc uptake by mycorrhizal and uninfected roots of *Pinus radiata* and *Araucaria cunningghamii*. **Soil Biology and Biochemistry**, n.6, p.141-144, 1974.

- BRUNDRETT, M.; et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400 p.
- CALDEIRA, M.V.; et al. Crescimento de leguminosas arbóreas em resposta a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. **Ciência Florestal**, v.7, n.1, p.1-10, 1997.
- CALDEIRA, M.V.; et al. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de duas leguminosas arbóreas. **Ciência Florestal**, v.9, n.1, p.63-70, 1999.
- CARDOSO, E.J.B.N.; et al. Fungos micorrízicos arbusculares em mata nativa e reflorestamento de *Araucaria angustifolia* impactado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. 30. 2005, Recife, **Anais...** Recife: UFPE, 2005. 1 CD-ROM.
- CARNEIRO, M.A.C.; et al. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. **Revista Agropecuária brasileira**, v. 34, n.9, p.1699-1677, 1999.
- CASTELLANO, M.A.; MOLINA, R. Mycorrhizae. In: LANDIS, T.D. *et al.* **The biological components: nursery pests and mycorrhizae**. Washington: Department of Agriculture, 1989, p.101-171.
- CHU, E.Y.; MOLLER, M.R.F.; CARVALHO, J.G. Efeitos da inoculação micorrízica em mudas de gravioleira em solo fumigado e não fumigado. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.4, p.671-680, 2001.
- DIAS. H.C.T.; OLIVEIRA FILHO, A.T. Variação temporal e espacial da produção de serrapilheira em uma floresta estacional semidecídua Montana em Lavras, MG. **Revista Árvore**, v.21, n.1, p.11-26, 1997.
- DODD, J.C.; THOMSON, B.D. The screening and selection of inoculant arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.159, n.1, p.149-158, 1994.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura. **Ambiente software NTIA**, versão 4.2.2: Manual do Usuário - Ferramental Estatístico. Campinas, 1997.
- FONSECA, F.A.; et al. Fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de leguminosas arbóreas em substratos de resíduos urbanos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30. 2005, Recife, **Anais...** Recife, UFPE, 2005. 1 CD-ROM.
- FRIONI, L.; MINASIAN, H.; VOLFOVICZ, R. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. **Forest Ecology and Management**. v.115, p.41-47, 1999.
- GROVE, T.S.; LE TACAON, F. Mycorrhizal associations in plantation forestry. **Advance Plant Pathology**, v.9, p.191-227, 1993.



- HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhizal development. **Plant Physiology**, v.97, p.977-984, 1991.
- HILBERT, J.L.; MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v.110, n.3, p.339-346, 1988.
- KÖNIG, F.G.; et al. Avaliação da sazonalidade da produção de serrapilheira numa floresta estacional decidual no município de Santa Maria-RS. **Revista Árvore**, v.26, n.4, p.429-435, 2002.
- IFCRS – INVENTÁRIO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: [www.ufsm.br/ifcrs](http://www.ufsm.br/ifcrs), Acesso em: 20 fev. 2006.
- LAMBAIS, M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Germinação de esporos e crescimento do tubo germinativo de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em diferentes concentrações de alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.13, p.151-154, 1989.
- LETACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. **Symbiosis**, v.3, p.179-206, 1987.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalyptus isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **New Phytologist**, v.114, n.4, p.627-631, 1990.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. In: Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v.59, p.153-163, 1969.
- MALUF, A.M.; SILVEIRA, A.P.D.; MELLO, I.S. Influência da calagem e da micorriza vesículo-arbuscular no desenvolvimento de cultivares de leucena tolerante e intolerante ao alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.12, p.17-23, 1988.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizal fungus inoculation: a tool for improving forest practices . In: MICOLA, K. (ed.) **Tropical ectomycorrhiza research**. Oxford: Clarendon, 1980. p.13-17.
- MATTEI, V.L.; ROSENTHAL, M.D. Semeadura direta de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. no enriquecimento de capoeiras. **Revista Árvore**, v.26, n.6, 2002.
- MOREIRA, M.; et al. Identificação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAS) em raízes de *Araucaria angustifolia* através de métodos moleculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. 30. 2005, Recife, **Anais...** Recife, UFPE, 2005. 1 CD-ROM.
- NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.329-338, 2000.

- NOVAIS, C.B.; et al. Influência sazonal da época do estabelecimento das culturas de fungos micorrízicos arbusculares sobre a densidade de esporos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO. 30. 2005, Recife, **Anais...** Recife, UFPE, 2005, 1 CD-ROM.
- OLIVEIRA, I.B.; et al. Eficiência de inóculo com micorrizas nativas em *Araucaria angustifolia*. **Agropecuária Catarinense**, v.5, n.4, p.51-52, 1992.
- PASCOAL, J.O.; NAVARRO, J.M.B. Significado de los microorganismos del suelo em nutrición vegetal: Simbiosis *Rhizobium leguminos* y micorrizas VA. In: GARRIDO, M.L.; ROJAS, E.P.; SIQUEIRA, J.O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 35, n.1, p. 103-114, 2000.
- SAJIN-JUNIOR, O.J. **Micorriza arbuscular em mudas de espécies arbóreas nativas do sudeste brasileiro**. Lavras: 1997. 119p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas), Universidade Federal de Lavras, 1997.
- SCHROEDER, M. Cobertura florestal do Rio Grande do Sul: Tendências e Perspectivas. In: SEMINÁRIO SOBRE A SITUAÇÃO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL. 1º, 1991, Santa Maria. **Anais...**, Santa Maria, 1991, p.01-09.
- SCHUMACHER, M.V.; et al. Produção de serrapilheira em uma floresta de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no município de Pinhal Grande-RS. **Revista Árvore**, v.28 n.1, p.29-37, 2004.
- SILVA, R.F. **População de fungos micorrízicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii* em solo arenoso**. Santa Maria, 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, 2002.
- SILVA, R.F; ANTONIOLLI, Z.I; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v.13, n.1, p.33-42, 2003a.
- SILVA, R.F; et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. **Bioscience Journal**, v.19, n.3, p.9-17, 2003b.
- SILVEIRA, A.P.D. Ecologia de fungos micorrízicos arbusculares. In: MELO, I.S.; AZAVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998, 488p., p.61-86.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. Academic Press, 1997, 605p.

- SOUZA, M.M.; CARDOSO, J.B.N. Dependência micorrízica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. sob níveis de fósforo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26. 2001. Londrina - PR, **Anais...** Londrina, 2001. 1 CD-ROM.
- STURNER, S.L.; BELLEI, M.M. Composition and seasonal variation of spore populations of Arbuscular Mycorrhizal fungi in dune soils in island of Santa Catarina, Brazil. **Canadian Journal Botany**, v.72, p.359-365, 1994.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBEL, D.H.; SCHENK, N.C. Spore germination and tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **Mycology**, v.74, n.6, p.952-959, 1982.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II: Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, p.207-211, 1986a.
- SIQUEIRA, J.O.; MAHMUD, A.W.; HUBBEL, D.H. Comportamento diferenciado de fungos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares em relação à acidez do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.10, p.10-16, 1986b.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A., **Biotechnology do solo, fundamentos e perspectivas. Brasília: ABEAS**, 1988. 330p.
- TEDESCO, M.; et al. **Análise de solo planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1995. 1174p. (Boletim Técnico, n. 5).
- ZACHIA, R.A.; et al. Florística e síndromes de dispersão de espécies lenhosas em um fragmento de floresta ripária em Santa Maria, RS. 2002. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO FLORESTAL DO CONE-SUL. A Floresta e o Meio Ambiente. 2.2002, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria, 2002, p.121.
- ZANGARO, W.; et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Iibagi, Paraná. **Cerne**, v.8, n.1, p.077-087, 2002.

## **CAPÍTULO II. FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS EM GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride) E CANAFÍSTULA (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) *in vitro***

### **1. RESUMO**

A associação com fungos ectomicorrízicos com essências florestais nativas pode ser uma alternativa para melhorar adaptação e desenvolvimento das áreas reflorestadas no com essências florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul. Em função disso desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de verificar a formação de ectomicorrizas em plântulas de grápia e canafístula com crescimento *in vitro*. O experimento foi desenvolvido no laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo e Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries do CCR, UFSM. Foram utilizados 4 isolados de fungos para a grápia: UFSM RA 2.8 e UFSM RA 3.6 oriundos da Fepagro – Florestas, Santa Maria-RS, classificados como *Suillus* sp. e *Scleroderma* sp. Respectivamente, e os fungos UFSC Pt 116 (*Pisolithus microcarpus*) e UFSC Pt 24 (*Pisolithus* sp.), oriundos da Universidade Federal de Florianópolis, e a testemunha sem fungo. Para a canafístula, foram utilizados 4 fungos, o fungo UFSM RA 2.8 oriundo da estação experimental da FEPAGRO Santa Maria-RS, classificado como *Suillus* sp. Os fungos UFSC Pt 116 (*Pisolithus microcarpus*), UFSC Sc 124 (*Scleroderma citrinum* Pers.) e UFSC Pt 24 (*Pisolithus* sp.). Utilizou-se sete repetições por tratamento. As avaliações foram: altura de planta, massa verde da parte aérea, massa verde radicular, massa seca da parte aérea e colonização ectomicorrízica. Observou-se formação de ectomicorrizas nas plantas com o isolado *Suillus* sp. 2.8, o qual também favoreceu o desenvolvimento das plântulas de grápia. As plântulas de canafístula apresentaram fortes indícios de formação ectomicorrízica, como formação de manto fúngico.

**Palavras Chaves:** *Apuleia leiocarpa*; fungos ectomicorrízicos; *Suillus* sp.; espécie florestal nativa.

## 2. INTRODUÇÃO

A grápia é uma planta florestal nativa nobre com variada utilidade. É uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica no território brasileiro. Contudo, devido à devastação intensa das matas e à falta de reposição através do reflorestamento, houve diminuição da população da espécie (MATTOS & GUARANHA, 1983).

A grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride) pertence à família das Leguminosae, possui vários nomes populares, dentre eles: grapiapunha, garapa, amarelinho, gema-de-ovo, ibirapina. Esta planta apresenta uma madeira de lei, sem-falhas ou cavidades, dura, pesada e muito durável (MATTOS, 2002).

Nos últimos anos tem-se alguns estudos sobre a adubação da grápia (MISSIO, 2002; JUCOSKI, 2005), envolvendo avaliação dos teores de N, P, Ca e Mg nos tecidos da planta. Os resultados mostram que dependem da presença da adubação conjunta de P e S. O ponto máximo de eficiência técnica estimada varia de 14 a 31 mg de S kg<sup>-1</sup> de solo e de 165 a 440 mg de P kg<sup>-1</sup> (MISSIO, 2002). A grápia demonstra ser uma planta muito exigente em P e medianamente exigente em K e N, na sua fase inicial de crescimento (NICOLOSO *et al.*, 2001). No que se refere a suprimento de P para esta planta a inoculação de fungos micorrízicos, já que a micorrização favorece a absorção destes nutrientes em outras espécies florestais (GALLOTTI, 2002; CHAVES *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2003a; SILVA *et al.*, 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2004).

A canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert, é uma espécie arbórea pertencente à ordem Fabales, família Leguminosae, e é uma planta ornamental. Sua madeira é moderadamente pesada, dura e de longa durabilidade. Esta planta proporciona ótima sombra quando isolada, podendo ser empregada com sucesso em projetos paisagísticos. É uma espécie heliófita, pioneira, rústica, de crescimento rápido, ótima para composição de reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992).

A canafístula é uma espécie nativa, com boa resistência ao frio. É considerada promissora por apresentar valor econômico comprovado, em função da qualidade da madeira e indicado para produção de madeira no Centro-Sul do Brasil (CARVALHO, 1998). O seu crescimento é rápido, classificando-a como espécie com aptidão à regeneração artificial (CARVALHO, 1994). A madeira pode ser utilizada na construção civil, indústria de móveis, construção naval, marcenaria e carpintaria, com regular poder calorífico (4.755 kcal/kg). É viável também para produção de papel, tendo ainda a presença de tanino na casca com teores de 6 a 8%, também usada como planta medicinal e ornamental (REITZ *et al.* 1978).

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre fungos do solo e inúmeras plantas vasculares. Através desta associação, a planta fornece ao fungo os carboidratos necessários ao seu crescimento, enquanto que o fungo por meio de suas estruturas externas (hifas), capta os nutrientes da solução do solo e os transfere para as plantas (PASCOAL & NAVARRO, 1985).

Dentre as micorrizas, as ectomicorrizas, apresentam componente fúngico localizado nos espaços intercelulares do córtex radicular, sem que ocorra penetração intracelular e as endomicorrizas podem apresentar penetrações intracelulares, podendo haver formação de estruturas como arbúsculos e vesículas. Os fungos ectomicorrízicos embora ocorram em um grupo restrito de plantas (aproximadamente 5%), no entanto, são muito importantes para o setor florestal (BELLEI & CARVALHO, 1992).

A associação micorrízica proporciona um efeito benéfico quando associada a essências florestais (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003a; SILVA *et al.*, 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2003; ANDREAZZA *et al.*, 2004). O benefício da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares foi também encontrado no crescimento de mudas de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex. Benth., com promoção da altura de mudas independente da dose de fósforo aplicada (CHAVES *et al.*, 1995).

O crescimento e o estabelecimento de plantas são alterados com a colonização com fungos ectomicorrízicos, isto pelos fortes efeitos morfogenéticos proporcionado ao sistema radicular, como deformação das raízes e redução da dominância apical (ALEXANDER, 1981). O estabelecimento da simbiose micorrízica é um processo complexo e com muitas etapas, estas requerem complexação morfogenética, bioquímica, fisiológica e mudanças moleculares (HILBERT & MARTIN, 1988; HILBERT *et al.*, 1991). Sendo que dois isolados de *Pisolithus tinctorius*, com o início do contato no mesmo período com as raízes do hospedeiro (*Eucalyptus urophylla* S.T. Blake), tiveram tempos de colonização diferentes (MALAJCZUK *et al.*, 1990). Assim isolados de mesmo gênero podem ter rotas, estágios e tempos de colonização diferentes, como pode ocorrer com espécies de hospedeiros diferentes.

Este benefício foi encontrado em várias espécies florestais como *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden aumentando a produção de massa seca da parte aérea, altura de plantas (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003a; 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2004), e *Pinus elliottii* Englem. em algumas variáveis como altura e massa seca (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003c;), e em *Pinus* sp. em desenvolvimento e porcentagem de mudas sobreviventes no campo (KUEK, 1994), melhoria na estabilidade de mudas de *Eucalyptus grandis* no campo em condições de solo em processo de arenização (ANDREAZZA *et al.*, 2003).

A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares favorecem o crescimento de mudas de jacarandá-da-bahia, no qual, as mudas inoculadas obtiveram maior crescimento em altura independente da dose de fósforo aplicada (CHAVES *et al.*, 1995). Além disto, a inoculação com fungos ectomicorrízicos pode ser economicamente viável, aumentando o potencial produtivo florestal como em plantas de Pinus (KUEK, 1994). Em outros levantamentos florestais com fungos micorrízicos arbusculares, não foi encontrado associações micorrízicas com a canafistula (*Peltophorum dubium*) na bacia do Rio Tabagi no Paraná (ZANGARO *et al.*, 2002).

A inoculação com fungos ectomicorrízicos pode afetar diretamente o crescimento pós-transplante, das espécies florestais. No açoita cavalo, verificou-se resposta linear do crescimento à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. Este comportamento foi observado também, para cássia – verrugosa, sesbânia e tamboril, que mostraram diferença no crescimento já aos 30 dias após o transplante e para colvílea que mostrou diferença aos 60 e 90 dias (ROJAS & SIQUEIRA, 2000). Estes mesmos autores verificaram ainda que a inoculação no transplante de mudas pode ser uma alternativa para garantir o desenvolvimento de mudas sem inoculação ou com baixa formação de micorrizas durante a formação da muda. Este efeito benéfico da inoculação micorrízica foi também encontrado no crescimento de mudas de jacarandá-da-bahia, no qual, as mudas inoculadas obtiveram maior crescimento em altura independente da dose de fósforo aplicada (CHAVES *et al.*, 1995). Além disto, a inoculação com fungos ectomicorrízicos pode ser economicamente viável, aumentando o potencial produtivo florestal como acontece em plantas de pinus (KUEK, 1994).

Em virtude disso, alguns países vêm desenvolvendo com êxito programas de micorrização controlada, propiciando aumentos significativos na produção de biomassa florestal, além de poder contribuir para que as plantas desenvolvam-se em locais onde isoladamente, não teriam produção viável do ponto de vista econômico. O controle da micorrização permitiria, assim, um aumento das áreas utilizáveis para silvicultura, pela incorporação de áreas marginais, cujos solos impossibilitariam o crescimento das plantas sem ajuda das micorrizas (BELLEI & CARVALHO, 1992).

As essências florestais possuem a característica de formarem associações simbióticas com fungos micorrízicos. Por exemplo, o eucalipto pode associar-se tanto a fungos ectomicorrízicos quanto aos micorrízicos arbusculares (COELHO *et al.*, 1997). Geralmente, constata-se, que a idade da planta tem influência sobre o tipo de associação micorrízica predominante, pois inicialmente há uma alta colonização por fungos micorrízicos

arbusculares, que decresce com a idade da planta, sendo substituída progressivamente por associações ectomicorrízicas (BELLEI, 1987).

Contudo, pode haver uma certa especificidade entre isolados e hospedeiros, pois alguns fungos ectomicorrízicos não conseguem ou tem dificuldades de formar associações simbióticas com seus hospedeiros, como *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh95) que não colonizou plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden, mostrando alta especificidade ao *Pinus* sp. (VOIGT, 1996; VOIGT *et al.*, 2000). Por isso faz-se necessário estudos avaliando a associação micorrízica com diferentes isolados para cada hospedeiro.

Tendo em vista que pouco se conhece a respeito da associação micorrízica em grápia e canafístula, o objetivo deste estudo foi caracterizar e identificar associações ectomicorrízicas em plântulas destas espécies em condições de laboratório, visando à produção de mudas colonizadas com fungos desta espécie florestal para usá-las em reflorestamento.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo e do Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### **3.1. Esterilização das sementes**

As sementes foram obtidas junto a Fepagro - Florestas – Boca do Monte, Santa Maria/RS. As sementes de grápia foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10% por 30 min. e lavadas em água esterilizada, por três vezes consecutivas. Posteriormente, as sementes foram novamente esterilizadas, mas em álcool 70% por mais 30 min.

Já as sementes de canafístula foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10% por 20 min. e lavadas em água esterilizada, por três vezes consecutivas. Posteriormente, as sementes foram novamente desinfestadas, mas em álcool 70% por mais 20 min.

Após a esterilização, estas foram lavadas novamente por três vezes em água esterilizada. Para a lavagem das sementes foi utilizado um infusor de chá metálico de Marca Tee-la-Spoon 1 (Tee Gschwendner). Após a esterilização as sementes foram colocadas para a germinação.

#### **3.2. Germinação das sementes**

Para a germinação das sementes, três das sementes previamente esterilizadas foram colocadas em cada placa de Petri em meio de germinação (Anexo 3). Em seguida, as sementes foram incubadas a 25°C por 7 dias. Quando as sementes germinaram e atingiram a fase de plântula, foram transferidas para os erlenmeyers com capacidade de 250 mL, com meio.

As sementes de grápia apresentaram um índice de germinação de 44% e as sementes de canafístula foram obtidas através de estudo metodológico (Anexo 4).

#### **3.3. Preparação dos erlenmeyers**

Os erlenmeyers foram lavados e secado em estufa. Posteriormente, foi colocado 60 mL de meio MNM sólido (Merlin Norkrans Modificado (MARX, 1969)) (Anexo 2). Após a solidificação do meio, foi colocado papel celofane transparente na superfície do meio (Adaptado de CHILVERS *et al.*, 1986). O papel celofane foi fervido durante oito horas para retirar o excesso de celulose. Após esta preparação o frasco foi fechado com papel alumínio e plástico parafilme de PVC transparente, para esterilização em autoclave a 1 atm., durante

20min. Após a autoclavagem, os erlenmeyers estavam prontos para realizar a inoculação das plântulas de grápia com fungos ectomicorrízicos.

### **3.4. Multiplicação dos isolados com meio MNM**

Os fungos com as identificações UFSM RA 2.8 e UFSM RA 3.6 foram coletados na estação experimental da FEPAGRO Santa Maria-RS na área de ipê-amarelo, como pode ser visto no Capítulo I. Estes fungos foram classificados como *Suillus* sp. e *Scleroderma* sp., respectivamente. Os fungos ectomicorrízicos UFSC Pt 116, UFSC Pt 24 e UFSC Sc 124 utilizados no experimento foram oriundos da Universidade Federal de Florianópolis com a Prof. Dr. Vetúria L. de Oliveira. O isolamento e multiplicação destes fungos seguiram metodologias de BRUNDRETT *et al.* (1996). Os fungos foram isolados a partir de uma desinfecção com álcool na superfície externa da frutificação. Abrindo a frutificação ao meio, retirou-se da parte interna, pequenos pedaços. Estes pedaços da frutificação foram colocados em placas de Petri contendo o meio Hagen (Anexo 1). Depois de quatro dias, foram transferidos os pedaços dos micélios, que cresceram, não contaminaram e obtiveram crescimento micelial, para o meio de cultivo MNM. Após, repicou-se pequenas porções deste para outra placa de Petri contendo meio de cultivo MNM. Esse processo foi repetido várias vezes, com a finalidade de isolar o fungo micorrízico de contaminantes e favorecer a multiplicação. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado. Após, incubou-se à 28°C durante 20 dias.

### **3.5. Inoculação das plântulas**

As plântulas de grápia estéreis e sem contaminantes foram transferidas aos erlenmeyers devidamente preparados e esterilizados. Colocou-se três discos de inóculo com diâmetro de 10 mm de cada isolado (BRUNDRETT *et al.*, 1996). Os fungos utilizados foram o *Pisolithus* sp. Alb. & Schewein (PT 24) e o *Pisolithus microcarpum* (Cooke & Masee) Cunn. (Pt 116), *Suillus* sp. (UFSM RA 2.8), *Scleroderma* sp. (UFSM RA 3.6) e a testemunha sem fungo. Posteriormente as plântulas sem contaminação foram transferidas aos erlenmeyers. Já para canafistula, foi substituído o isolado UFSM RA 3.6, pelo *Scleroderma citrinum* Pers.(UFSC Sc 124). Os tratamentos especificados anteriormente foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições.

### 3.6. Condução do experimento

O experimento com grábia teve duração de 33 dias e 39 dias com a canafístula, e foi conduzido em câmara de fotoperíodo de 12h com temperatura constante a 24°C. Após 19 dias da implantação do experimento foi realizada uma reinoculação dos fungos ectomicorrízicos. Novamente foram colocados três discos de 10 mm de diâmetro de cada isolado. Esta etapa foi realizada para tentar aumentar a quantidade de inóculo e aproximar o fungo ectomicorrízico das raízes.

Durante o experimento foi realizado um rodízio dos erlenmeyers, duas vezes por semana, atendendo as exigências do delineamento experimental. Este visou eliminar possíveis diferenças quanto à incidência de luz, temperatura e sombreamento.

### 3.7. Parâmetros analisados

#### 3.7.1. Altura de planta

A altura de planta foi medida utilizando-se uma régua graduada de 20 cm de comprimento. Esta variável foi obtida com a distância do colo da planta até a extremidade das últimas axilas foliares.

#### 3.7.2. Massa verde da parte aérea e do sistema radicular e massa seca da parte aérea

As plantas foram cortadas no colo da planta e em seguida, pesadas a parte aérea, caracterizando o peso da massa verde da parte aérea. Após, a parte aérea das plantas foram colocadas em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa a 65°C, onde permaneceram até atingirem peso constante. Após pesou-se novamente, obtendo-se a massa seca da parte aérea.

As raízes foram separadas do resto da planta, limpas de restos de meio e fungos ectomicorrízicos, e então determinado o peso da massa verde radicular. Após as raízes foram armazenadas em álcool 50% para a realização da análise de colonização ectomicorrízica.

#### 3.7.3. Colonização ectomicorrízica

As avaliações da colonização ectomicorrízica foram efetuadas em duas etapas. A primeira etapa foi através de uma identificação visual da raiz, sendo observado a morfologia radicular para a observação de alterações morfológicas, que possivelmente teriam sido provocadas por fungos ectomicorrízicos, conforme BRUNDRETT *et al.* (1996).

Na segunda etapa, foram realizados cortes histológicos transversais nas raízes com lâmina de corte de marca GILLETE em lupa, para visualização em microscópio. Observou-se as

estruturas como manto fúngico e rede de Hartig do fungo ectomicorrízico (BRUNDRETT *et al.*, 1996).

### **3.8. Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com sete repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando da significância dos mesmos, foram submetidos ao teste de comparação de médias (Teste de Tukey), tomando como base os níveis de significância maiores que 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SOC, desenvolvido pelo Núcleo Tecnológico para Informática NTIA/EMBRAPA, (EMBRAPA, 1997).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo teste de formação de ectomicorrizas em grápia e canafístula, foi observado que somente o isolado UFSM RA 2.8 conseguiu formar ectomicorrizas com a grápia e a canafístula dentre todos os outros inóculos utilizados (Tabela 1).

Tabela 1. Presença (+) ou ausência (-) de associações ectomicorrízicas em plântulas de grápia e canafístula após serem inoculadas com fungos ectomicorrízicos *in vitro*, Santa Maria, RS, 2006.

INÓCULO	GRÁPIA	CANAFÍSTULA
Testemunha sem fungo	-	-
UFSM RA 2.8	+	+
UFSC Pt 116	-	-
UFSM RA 3.6	-	*
UFSC Pt 24	-	-
UFSC Sc 124	*	-

\* Fungos não inoculados com a espécie florestal.

Na formação de ectomicorrizas nas raízes de grápia inoculadas com UFSM RA 2.8, com presença de manto fúngico (Figura 1 D) e rede de Hartig (Figura 1 E). A literatura não apresenta relatos de ocorrência de ectomicorrizas em grápia em ambiente natural (FRIONI *et al.*, 1999, ZANGARO *et al.*, 2002), o que pode estar associado por alguns fatores ambientais, como fatores de solo, pouco inóculo no ambiente, temperatura e microrganismos, entre outros. Outros pesquisadores como VOIGT, (1996); VOIGT *et al.* (2000) defendem a idéia que há uma especificidade entre os fungos ectomicorrízicos e seus hospedeiros.

O isolado UFSM RA 2.8 (Figura 1 A) é um fungo de crescimento rápido, levando 15 dias para alcançar o ponto de repicagem, o que favoreceu a condução do experimento, pois quando as plântulas foram inoculadas com os fungos ectomicorrízicos (Figura 1 B), os isolados com crescimento mais rápido teriam melhores probabilidades de se associarem com as plântulas, como pode ser visto na Figura 1 C.

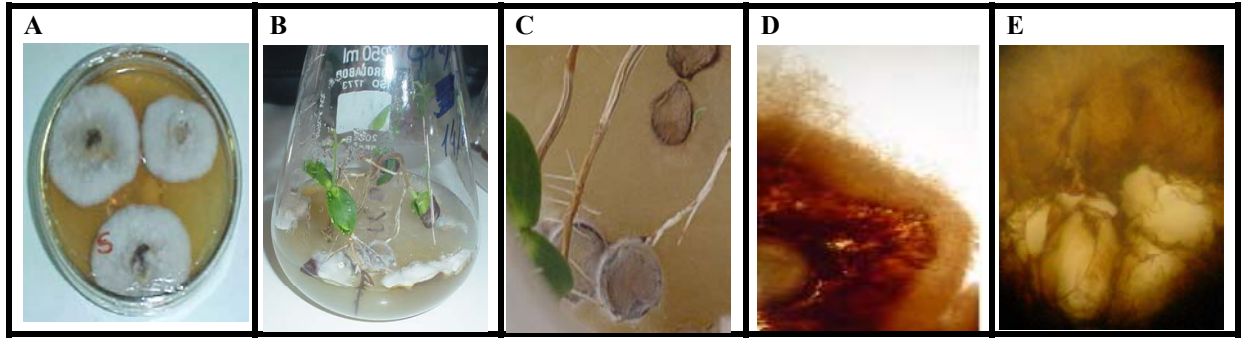


Figura 1. Fungo ectomicorrízico *Suilus* sp. UFSM RA 2.8 (A); associação ectomicorrízica do isolado UFSM RA 2.8 e plântulas de grápia: cultivo “*in vitro*” fungo + plântulas (B); fungo associado com as raízes (C); manto fúngico ectomicorrízico (D); rede de Hartig (E); Santa Maria, 2006.

Não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis analisadas, quanto à altura de plantas, massa verde radicular e da parte aérea, e massa seca da parte aérea (Tabela 3). Embora, tenha sido encontrada evidência de colonização ectomicorrízica em plântulas de canafístula (Figura, 2 D e E).

As observações evidenciam associações ectomicorrízicas entre a canafístula e o isolado UFSM RA 2.8, pela formação do manto fúngico (Figura 2 D) e a rede de Hartig (Figura 2 E). Estas estruturas caracterizam os fungos ectomicorrízicos quando colonizam os seus hospedeiros (BELLEI & CARVALHO, 1992). Também foi encontrada, esta associação com este mesmo fungo em plântulas de grápia.

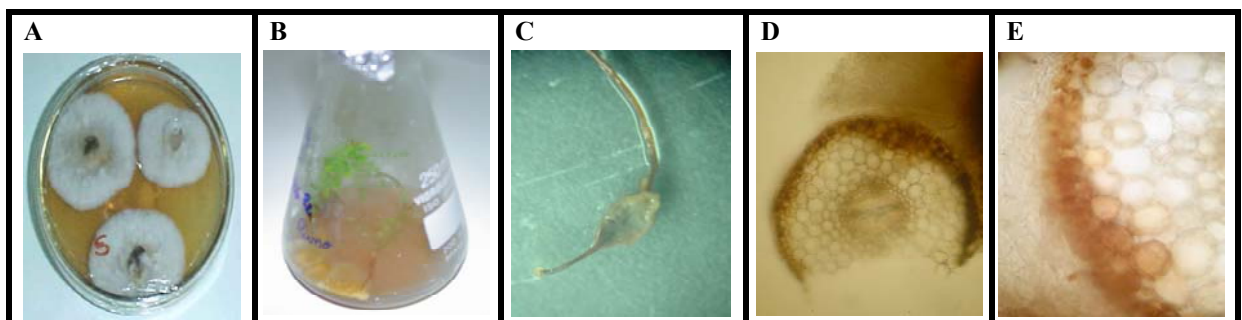


Figura 2. Fungo ectomicorrízico *Suilus* sp. UFSM RA 2.8 (A); associação ectomicorrízica do isolado UFSM RA 2.8 e plântulas de canafístula: cultivo “*in vitro*” fungo + plântulas (B); fungo associado com as raízes (C); manto fúngico ectomicorrízico (D); rede de Hartig (E); Santa Maria, 2006.

Em estudo realizado no Capítulo I deste trabalho, em levantamento em condições naturais, não foram encontradas associações com ectomicorrizas em canafistula. Mesmo que a literatura não tenha tido evidências da ocorrência destas associações em ambiente natural em canafistula (FRIONI *et al.*, 1999; ZANGARO *et al.*, 2002). Isto pode ocorrer por inúmeros fatores ambientais, fatores de solo, pouco inóculo, temperatura, e não ter ocorrido a presença de inóculo compatível ou viável junto às raízes das plantas e em quantidade suficientes para ocorrer associações ectomicorrízicas (GIACHINI *et al.*, 2000). Outros pesquisadores (VOIGT, 1996; VOIGT *et al.*, 2000) defendem a idéia que há uma especificidade entre os fungos ectomicorrízicos e seus hospedeiros, e que alguns isolados não podem formar associações não colonizando algumas plantas. Contudo estas associações são de grande importância para essências florestas quando presentes.

Sabe-se que a inoculação com fungos ectomicorrízicos pode ser uma alternativa para melhorar a produção vegetal, tanto quantitativamente como massa verde ou seca da parte aérea, altura, entre outras (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003a; 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2004), como qualitativamente como porcentagem de sobrevivência de mudas no campo como *Eucalyptus grandis* (ANDREAZZA *et al.*, 2003) e *Pinus* sp. (GALLOTTI, 2002).

O isolado UFSM RA 2.8 (Figura 2 A) é um fungo de crescimento rápido, que em torno de 15 dias está no ponto de repicagem, favorecendo a condução do experimento. Quando as plântulas foram inoculadas com os fungos ectomicorrízicos (Figura 2 B), os isolados com crescimento mais rápido tiveram melhores chances de se associarem com as plântulas, como pode ser visto na Figura 2 C, onde o micélio do fungo está intimamente ligado à raiz da planta.

Hoje se sabe que a inoculação com fungos ectomicorrízicos pode ser uma alternativa para melhorar a produção vegetal, tanto quantitativamente como massa verde ou seca da parte aérea, altura, entre outras (SILVA, 2002; SILVA *et al.*, 2003a; SILVA *et al.*, 2003b; ANDREAZZA *et al.*, 2004), como qualitativamente como porcentagem do índice de pega no campo (ANDREAZZA *et al.*, 2003; GALLOTTI, 2002). Como pode ser visto (Tabela 2) a inoculação de fungos ectomicorrízicos pode ter aumentado algumas variáveis analisadas como altura, massa verde da parte aérea e massa seca da parte aérea. Contudo, evidenciando a associação ectomicorrízica da planta de grápia e o fungo, as melhores médias de todos os parâmetros foram encontradas em todos os parâmetros avaliados no tratamento com fungo UFSM RA 2.8.

Estatisticamente não houve diferença significativa entre o fungo UFSM RA 2.8 e os demais isolados na variável altura. Para a massa verde radicular não houve diferença

significativa nem com a testemunha. Já, na massa verde da parte aérea, o isolado UFSM RA 2.8 não se diferenciou dos isolado UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24. Como a variável massa seca da parte aérea os isolados UFSM RA 3.6, UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 não se diferenciaram da testemunha que não havia fungo ectomicorrízico (Tabela 2).

Embora alguns autores comprovaram que a colonização das plantas pode levar algumas horas e estar atuando simbioticamente por alguns dias (MALAJCZUK *et al.*, 1990; HORAN *et al.*, 1988), os efeitos na produção e desenvolvimento das plantas de grápia podem ainda não está tão explícito, pelo experimento ser conduzido em um tempo relativamente curto (33 dias), por isso a não diferenciação significativa entre a maioria das variáveis analisadas em comparação com o tratamento com o fungo UFSM RA 2.8 (Tabela 2).

Tabela 2. Altura de plântulas, Massa Verde Radicular (MVR), Massa Verde da Parte Aérea (MVPA) e Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), de plântulas de grápia inoculadas com fungos ectomicorrízicos, Santa Maria, RS, 2006.

<b>Fungos</b>	<b>Altura</b> ----- cm -----	<b>MVR</b> ----- g -----	<b>MVPA</b>	<b>MSPA</b>
<b>Testemunha</b>	4,53 b*	0,1194 a	0,4642 b	0,1128 b
<b>UFSM RA 2.8</b>	6,48 a	0,1653 a	0,5998 a	0,1435 a
<b>UFSC Pt 116</b>	6,20 ab	0,1286 a	0,4898 ab	0,1208 ab
<b>UFSM RA 3.6</b>	5,94 ab	0,1298 a	0,4609 b	0,1057 b
<b>UFSC Pt 24</b>	5,88 ab	0,1617 a	0,5067 ab	0,1102 b
<b>CV%</b>	16,26	27,33	12,52	11,69

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Embora alguns autores comprovaram que a colonização das plantas pode levar algumas horas e estar atuando simbioticamente por alguns dias (MALAJCZUK *et al.*, 1990; HORAN *et al.*, 1988), os efeitos na produção e desenvolvimento das plantas de canafístula podem ainda não estar expressos, isto porque o experimento foi conduzido durante um curto período de tempo (39 dias). Por isso, não ocorreu diferenciação significativa entre as variáveis analisadas em comparação com os diferentes fungos ectomicorrízicos (Tabela 3).

As plântulas de canafístula já aos 35 dias começaram a mostrar deficiência nutricional, talvez por dificuldades na absorção de água e conseqüentemente nutrientes. Pelas observações feitas, o papel celofane pode ter sido o maior impedimento para o desenvolvimento das plantas, e devido ao tempo de execução deste experimento, a repetição do mesmo tornou-se



impossibilitado, mas na continuidade dos estudos pelo grupo de pesquisa do setor de Biologia do Solo da UFSM, isto será realizado.

Tabela 3. Altura de plântulas, Massa Verde Radicular (MVR), Massa Verde da Parte Aérea (MVPA) e Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), em cultivo “in vitro” com quatro fungos ectomicorrízicos e plântulas de canafístula, Santa Maria, RS, 2006.

<b>Fungos</b>	<b>Altura</b> ----- cm -----	<b>MVR</b> ----- g -----	<b>MVPA</b> ----- g -----	<b>MSPA</b> ----- g -----
<b>Testemunha</b>	3,22 a*	0,0173 a	0,1813 a	0,0401 a
<b>UFSM RA 2.8</b>	3,50 a	0,0288 a	0,1922 a	0,0488 a
<b>UFSC Pt 24</b>	3,92 a	0,0417 a	0,2026 a	0,0634 a
<b>UFSC Pt 116</b>	4,25 a	0,0389 a	0,2194 a	0,0580 a
<b>UFSC Sc 124</b>	3,04 a	0,0431 a	0,1697 a	0,0422 a
<b>CV%</b>	22,88	37,89	39,92	48,49

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Assim, uma alternativa para visualizar melhor estas associações em plântulas de canafístula, pode ser a retirada do papel celofane, e diminuição da quantidade do meio nas unidades experimentais, podendo aumentar o tempo de condução do experimento e, se houver colonização, fungo terá um maior tempo para expressar o seu potencial, sendo mais visível seu benefício com respeito as variáveis estudadas. Pois na gráphia pode ser observada a formação de ectomicorrizas com o período estudado.

## 5. CONCLUSÕES

O isolado de fungo ectomicorrízico caracterizado como *Suillus* sp. UFSM RA 2.8, formou associações mutualísticas com a grápia e mostrou fortes indícios de formação de ectomicorizas com plântulas de canafistula em cultivo “*in vitro*”.

A inoculação com o isolado UFSM RA 2.8, promoveu o crescimento das plantas de grápia.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, I.J. The *Picea sitchensis* + *Lactarius rufus* mycorrhizal association and its effects on seedling growth and development. **British Mycological Society**, p.417-423, 1981.
- ANDREAZZA, R.; et al. Avaliação de mudas de Eucalipto inoculadas com fungos ectomicorrízicos em solo arenoso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29. 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, UESP, 2003. 1 CD-ROM.
- ANDREAZZA, R.; et al. Espécies de *Pisolithus* sp. na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v.14, n.2, p.51-60, 2004.
- BELLEI, M. **Micorrizas de *Eucalyptus* spp. em viveiros e florestas de Santa Catarina. Florianópolis:** UFSC. 1987, 54 p.
- BELLEI, M.; CARVALHO, M.S. Ectomicorrizas. 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.297-318.
- BRUNDRETT, M., et al. **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400 p.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: EMBRAPA– SPI, 1994. 640 p.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies nativas para fins produtivos. In: CARVALHO, P.E.R. **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: EMBRAPA CNPF, 1998. p.103-125.
- CHAVES, L.F.C., et al. Crescimento de mudas de Jacaranda-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell) Fr. Allem.) em resposta a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares em diferentes níveis de fósforo no solo. **Revista Árvore**, v.19, n.1. p. 32-49, 1995.
- CHILVERS, G.A.; DOUGLASS, P.A.; LAPEYRIE, F.F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v.103, p.397-402, 1986.
- COELHO, F.C., et al. Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamento de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., nos municípios de Paraopeba, Bocaiúva e João Pinheiro, MG. **Revista Árvore**, v.21, n.3, p.393-404, 1997.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura. **Ambiente software NTIA**, versão 4.2.2: manual do usuário - ferramental estatístico. Campinas, 1997.

- FRIONI, L.; MINASIAN, H.; VOLFOVICZ, R. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. **Forest Ecology and Management**, v.115, p.41-47, 1999.
- GALLOTTI, G.J.M. Importância da micorrização em viveiros de *Pinus* spp. **Revista Agropecuária Catarinense**, Santa Catarina. Ed. Novembro, v.15, n.3, nov., 2002.
- GIACHINI, A.J.; et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycological Society of America**, Lawrence, v.92, n.6, p.1166-1177, 2000.
- HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhizal development. **Plant Physiology**. v.97, p.977-984, 1991.
- HILBRET, J.L.; MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizal. **New Phytologist**, v.110, n.3, p.339-346, 1988.
- HORAN, D.P.; CHILVERS, C.A.; LAPEYRIE, F.F. Time sequence of the infection process in *eucalyptus*. **New Phytologist**, v.109, n.4, p.451-458, 1988.
- JUCOSKI, G.O. **Deficiência de ferro em grápia: efeito da adubação fosfatada e potássica**. Santa Maria, 2005. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.
- KUEK, C. Issues concerning the production and use of inóculo of ectomycorrhizal fungi in increasing the economic productivity of plantations. **Plant and Soil**, v.159, n.1, p.221-230, 1994.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **New Phytologist**, v.114, n.4, p.627-631, 1990.
- 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, p.153-163, 1969.
- MATTOS, N.F.; GUARANHA, J. **Contribuição ao estudo da grápia - *Apeluia iuiocwpa* (Vog.) Macbride**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis "AP", 1983. 25p. (Boletim Técnico. 12).
- MATTOS, R.B. **Características qualitativas e possibilidade de ganho de fuste em espécies euilóforas nativas da região central do Rio Grande do Sul**. Santa Maria, 2002. 91f.

- Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, 2002.
- MISSIO, E.L. **Nutrição mineral da grápia (*Apadeia iuiocwpa* Vog. Macbride) com fósforo, enxofre e ferro num Argissolo Vermelho distrófico arênica.** Santa Maria, 2002. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2002.
- NICOLOSO, F.T.; et al. Nutrição mineral de mudas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em Argissolo Vermelho distrófico arênico: efeito da adubação NPK no crescimento. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.991-998, 2001.
- PASCOAL, J.O.; NAVARRO, J.M.B. Significado de los microorganismos del suelo em nutrición vegetal: Simbiosis *Rhizobium leguminos* y micorrizas VA. In: GARRIDO, M.L. E OROSTICA, C.G., eds. Nutrición Vegetal: algunos aspectos químicos y biológicos. **Consejo superior de investigaciones científicas**, Granada, p.151-196, 1985.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Projeto madeira de Santa Catarina. **Sellowwia**, n.34/35, p. 525, 1978.
- ROJAS, E.P.; SIQUEIRA, J.O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Revista Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.103-114, 2000.
- SILVA, R.F. **População de fungos micorrízicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii* em solo arenoso.** Santa Maria, 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.
- SILVA, R.F; ANTONIOLLI, Z.I; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v.13, n.1, p.33-42, 2003a.
- SILVA, R.F; et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. **Bioscience Journal**, v.19, n.3, p.9-17, 2003b.
- SILVA, R.F; et al. Produção de mudas de *Pinus elliottii* Engelm. micorrizadas em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v.13, n.2, p.57-65, 2003c.
- VOIGT, E.L. **Compatibilidade de isolados fúngicos ectomicorrízicos provenientes de *Eucalyptus* e de *Pinus* em relação a *Eucalyptus dunnii* Maiden *in vitro*.** Florianópolis, 1996. 33p. Monografia (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
- VOIGT, E.L.; OLIVEIRA, V.L.; RANDI, A.M. Mycorrhizal colonization and compounds accumulation on roots of *Eucalyptus dunnii* Maiden inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1905-1910, 2000.

ZANGARO, W.; et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Iibagi, Paraná. **Cerne**, v.8, n.1, p.077-087, 2002.

### 3. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento das associações micorrízicas em essências florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul é de grande importância para o setor florestal, pois pode ser uma alternativa viável para a manutenção e instalação de plantações florestais nativas, pelos inúmeros fatores benéficos que estas associações podem potencializar em seus hospedeiros.

O estudo destas associações tanto em ambiente natural, quanto em ambientes controlados, abre uma visão de pesquisa para a exploração mais biológica dessas espécies.

Apesar de não ter sido encontradas associações ectomicorrízicas no ambiente natural estudado, em laboratório houve associação em duas espécies, a grápia e a canafístula, com um isolado natural da área em estudo, coletado em condições naturais.

Além disso, podem ser sugeridos os seguintes tópicos para estudos futuros:

- isolamento e multiplicação de fungos ectomicorrízicos nativos que possam realizar associações micorrízicas com estas essências estudadas.
- avaliação da eficiência de colonização ectomicorrízica em grápia e canafístula.
- inoculação com outros tipos de fungos ectomicorrízicos nas espécies estudadas *Araucaria angustifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Peltophorum dubium*, *Tabebuia chrysotricha*, *Tabebuia impetiginosa*, *Apuleia leiocarpa*.
- ocorrência de espécies de fungos ectomicorrízicos em outros tipos de solo e clima das mesmas espécies estudadas.
- produção de inóculo do fungo *Suillus* sp. Para testar em casa de vegetação e a campo em grápia e canafístula.

#### 4. ANEXOS

##### Anexo 1. Composição do meio Hagen modificado com antibióticos para isolamento de fungos ectomicorrízicos a partir de carpóforos.

Ingredientes	Quantidade
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Glicose	5,0 g
Tiamina	50 $\mu$ g
FeCl <sub>3</sub>	0,5 mL
Agar	10 g
Água destilada	1000 mL

- Autoclavar a 120°C durante 20 minutos. O pH após autoclavagem deverá estar entre 4,5 e 4,8.
- Logo que o meio se resfriar, mas antes que solidifique, colocar em banho-maria a 55°C enquanto se prepara as seguintes soluções de antibióticos.

Cloranfenicol – 100 mg/1mL de etanol – esta dose de 100 ml pode ser aumentada para se fazer a diluição.

Rifampicina – 100 mg/1mL de metanol.

OBS. O preparo das soluções de antibiótico deve ser feito no momento de colocar no meio de cultura, caso contrário poderá ocorrer precipitação.



**Anexo 2. Composição do meio de cultura Melin-Norkrans Modificado (MNM) (MARX, 1969).**

Solução estoque: para facilitar a preparação do meio fazer antecipadamente as seguintes soluções e conservar na geladeira:

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
CaCl <sub>2</sub>	50 mg
NaCl	25 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15 mg
FeCl <sub>3</sub>	1,2 mg
Tiamina-HCl	100 <i>ug</i>
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

- usar 10 mL de cada solução acima por litro de meio de cultura, exceto de FeCl<sub>3</sub> que deverá ser 1,2 mL por litro de meio.
- Solução de micronutrientes: 2mL por litro de meio
- Acrescentar : 10 g de Glicose; 15 g de Agar e 3,0 de Extrato de Malte.
- pH = 5,8 antes de autopclavar.

**Soplução de micronutrientes estoque**

<b>QUANTIDADE</b>	<b>INGREDIENTE</b>	<b>OBS</b>
0,200 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de Sódio
0,1414 g ou 0,235 g	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O ou MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Manganês
0,280 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico
0,008 g	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de Cobre
0,024 g	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Zinco
200 mL	Água destilada	

OBS. Estas quantias são para fazer 200 mL de solução nutritiva. Se fizer 1 L faça as devidas correções.

**Anexo 3. Composição do meio de germinação.**

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  —→ 500  $\mu\text{M}$  de

$\text{H}_3\text{BO}_3$  —→ 3  $\mu\text{M}$

Ágar —→ 7,5g

Glicose —→ 2g/L

Completar com água da torneira até 1L.

Ajustar a pH 5,7.

Esterilizar em autoclave.

## **Anexo 4. Estudos metodológicos para germinação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) *in vitro***

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de germinação e contaminação das sementes de canafístula “*in vitro*”. O experimento foi desenvolvido no laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo e Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries da UFSM. As sementes foram oriundas da Fepagro – Florestas, Santa Maria. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito 10% e álcool 70% por 20 min. Após a desinfestação foram colocadas para germinação em meio de germinação. Os tratamentos foram quanto ao número de sementes por placa de Petri: T1) uma semente; T2) duas sementes; T3) três sementes; T4) quatro sementes; T5) cinco sementes, todos com 15 repetições. As sementes foram avaliadas quanto à germinação, contaminação, e número de sementes por placas de Petri. Os fungos ectomicorrízicos foram inoculados após a obtenção das plântulas do teste de germinação. No tratamento com quatro sementes por placa de Petri, foi encontrado um maior número de sementes germinadas e não contaminadas, tendo um melhor aproveitamento no número final de plântulas.

**Palavras Chaves:** fungos ectomicorrízicos; *Suillus* sp.; espécie florestal nativa.

### **INTRODUÇÃO**

A canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert, é uma espécie arbórea pertencente à ordem Fabales, família Leguminosae, e é uma planta ornamental. Sua madeira é moderadamente pesada, dura e de longa durabilidade. Esta planta proporciona ótima sombra quando isolada, podendo ser empregada com sucesso em projetos paisagísticos. É uma espécie heliófita, pioneira, rústica, de crescimento rápido, ótima para composição de reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992).

A canafístula é uma espécie nativa, com boa resistência ao frio. É considerada promissora por apresentar valor econômico comprovado, em função da qualidade da madeira e indicado para produção de madeira no Centro-Sul do Brasil (CARVALHO, 1998). O seu crescimento é rápido, classificando-a como espécie com aptidão à regeneração artificial (CARVALHO, 1994). A madeira pode ser utilizada na construção civil, indústria de móveis, construção

naval, marcenaria e carpintaria, com regular poder calorífico (4.755 kcal/kg). É viável também para produção de papel, tendo ainda a presença de tanino na casca com teores de 6 a 8%, também usada como planta medicinal e ornamental (REITZ *et al.* 1978).

A germinação das sementes de canafístula ocorre numa seqüência de eventos fisiológicos influenciados por fatores ambientais, como a luz, temperatura, disponibilidade de água e de oxigênio e a presença de inibidores e promotores da germinação nas sementes, que podem atuar por si ou em interação com os demais. Cerca de um terço das espécies germinam imediatamente em condições favoráveis, mas as demais apresentam algum grau de dormência (FLORIANO, 2004). A dormência das sementes é um processo, que distribui a germinação no tempo como resultado da estratégia evolutiva das espécies para garantir que algumas encontrem condições ambientais favoráveis para desenvolver plantas adultas, bloqueando a germinação sob condições favoráveis imediatas em diferentes graus dentro de uma população, protegendo as sementes da deterioração e sendo superada ao longo do tempo e sob condições naturais de clima ou de alterações climáticas (FLORIANO, 2004).

As sementes de canafístula apresentam capacidades adaptativas que lhes permitem a sobrevivência, pelo menos em número suficiente para assegurar a perpetuação das espécies, diante dos fatores temporais e ambientais. Em função das várias interações entre as sementes, seus progenitores e o ambiente constituem material excepcional para o estudo dos mecanismos de adaptação das populações de plantas nos mais diversos ambientes (LEITE, 1993).

Em estudos com influência da luz na germinação de sementes de canafístula submetidas ao estresse hídrico estas foram resistentes ao estresse simulado com PEG (polietileno glicol) e manitol, pois o limite máximo de tolerância variou de -1,4 MPa a -1,6 MPa, tanto na luz quanto no escuro. A porcentagem de germinação foi nula quando as sementes de canafístula foram submetidas a um potencial osmótico de -1,8 e -2,0 MPa. Na presença de luz contínua, houve redução significativa da germinação com o uso de manitol (PEREZ *et al.*, 2001). Assim, é importante se estudar a germinação de sementes desta espécie.

Em estudo com a germinação de canafístula (PEREZ *et al.*, 1999), com 45 dias de armazenamento, os valores obtidos não diferiram estatisticamente, nas sementes recém-colhidas, armazenadas em vidro e em embalagem de papel a 10°C, também, em embalagem de Vidro e papel a ambiente natural. Após 90 dias, os valores de porcentagem foram estatisticamente semelhantes entre si, com exceção das sementes mantidas em embalagem de papel, sob temperatura de ambiente de laboratório. Após 150 dias de armazenamento,

verificou-se redução da porcentagem de germinação, das sementes mantidas sob temperatura ambiente, em relação ao grupo com sementes recém-colhidas.

Devido a grande diversidade de dificuldades de reprodução de essências florestais nativas como a canafístula, deste o processo de colheita, armazenamento e germinação de sementes, até a produção de mudas viáveis, é necessário procurar alternativas de produção. Uma das alternativas de produção pode ser a inoculação das mudas com fungos micorrízico.

Tendo em vista o pouco conhecimento sobre a germinação de sementes de canafístula, o objetivo deste estudo foi avaliar a germinação de sementes de canafístula em laboratório *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Esterilização das sementes**

As sementes de canafístula foram obtidas junto a Fepagro - Florestas – Boca do Monte, Santa Maria/RS.

As mesmas foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10% por 20 min. e lavadas em água esterilizada, por três vezes consecutivas. Posteriormente, as sementes foram novamente esterilizadas, mas em álcool 70% por mais 20 min. Após a esterilização, as sementes foram lavadas novamente por três vezes em água esterilizada. Para a lavagem das sementes foi utilizado um infusor de chá metálico de Marca Tee-la-Spoon 1 (Tee Gschwendner). Após a esterilização as sementes foram colocadas para a germinação.

### **Germinação das sementes**

Para a germinação das sementes, foi realizado um teste de germinação, sendo que a unidade experimental foram placas de Petri e colocadas em meio de germinação (Anexo 3). Os tratamentos variaram com o número de sementes, T1) uma semente; T2) duas sementes; T3) três sementes; T4) quatro sementes; T5) cinco sementes, com 15 repetições.

### **Condução e análise do experimento**

Posteriormente, as sementes foram incubadas a 25°C por 7 dias em incubadora. Após este período, foram avaliadas quanto ao número de sementes germinadas (SG), sementes não germinadas (SNG), sementes contaminadas (SC), sementes não contaminadas (SNC), unidades experimentais contaminadas (UEC), unidades experimentais não contaminadas (UENC), unidades experimentais germinadas (UEG) e unidades experimentais não

germinadas (UENG). A partir destes dados foi realizado teste de regressão e teste de correlações. Quando as sementes germinaram e atingiram a fase de plântula, foram transferidas para os erlenmeyers com capacidade de 250 mL, com meio MNM (Anexo 2) para realizar a inoculação com fungos ectomicorrízicos.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 15 repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à transformação arco cosseno, e a análise de regressão e correlação, tomando como base os níveis de significância maiores que 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SOC, desenvolvido pelo Núcleo Tecnológico para Informática NTIA/EMBRAPA (EMBRAPA, 1997).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os resultados mostraram que o maior número de sementes germinadas, foram os tratamentos com quatro e cinco sementes por unidade experimental. Contudo, os menores níveis de contaminação foram encontrados no tratamento com três sementes por unidade experimental, cerca de 4,4% (Tabela 1). Os números baixos de germinação, podem ter ocorrido devido o método de desinfestação das sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2003), destacam a possibilidade de morte de sementes por exposição a produtos tóxicos por até mesmo um curto período de tempo.

Pode-se observar que, em geral, baixa porcentagem de germinação, variando de 14 a 43%. Contudo, a porcentagem de contaminação das sementes foi relativamente baixa, variando de 4,4 a 26,7% (Tabela 1), indicando que o processo de desinfestação das sementes com hipoclorito foi eficiente, embora as sementes podem ter sido expostas excessivamente ao hipoclorito, aumentando a morte das sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O uso de quatro sementes por unidade experimental se sobressaiu aos demais pela combinação dos tratamentos, pois obteve a melhor porcentagem de germinação, uma baixa contaminação das sementes, um alto aproveitamento das placas, pois estas 80% não contaminaram, a mais alta porcentagem de placas germinadas e um número de sementes por placa de petri alto, pois o segundo maior número de sementes por placa (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de sementes germinadas (SG), sementes não germinadas (SNG), sementes contaminadas (SC), sementes não contaminadas (SNC), unidades experimentais contaminadas (UEC), unidades experimentais não contaminadas (UENC), unidades experimentais germinadas (UEG) e unidades experimentais não germinadas (UENG) de *Canafistula* em placas de petri após o método de esterilização, Santa Maria, RS, 2006.

Tratamentos	SG	SNG	SC	SNC	UEC	UENC	UEG	UENG
	----- % -----							
<b>T1) Uma Semente</b>	28,6	71,4	7,1	92,9	7,1	92,9	28,6	71,4
<b>T2) Duas Sementes</b>	14,3	85,7	17,9	82,1	28,6	71,4	28,6	71,4
<b>T3) Três Sementes</b>	38,6	61,4	4,4	95,6	13,3	86,7	80,0	20,0
<b>T4) Quatro Sementes</b>	43,3	56,7	8,3	91,7	20,0	80,0	93,3	6,7
<b>T5) Cinco Sementes</b>	30,7	69,3	26,7	73,3	66,7	33,3	86,7	13,3

A análise de correlações mostra que há uma correlação de 77% entre o número de sementes contaminadas e o número de placas contaminadas, sendo que é aumentada a probabilidade de contaminação da unidade experimental quando há um maior número de sementes por unidade experimental. Observou-se também uma correlação de 74% entre o número de sementes germinadas com o número de placas germinadas (Tabela 2).

As sementes germinadas estão a um nível de 55% correlacionadas com o número de sementes contaminadas (Tabela 2), ou seja, aumenta a probabilidade de contaminação das sementes quando estas sementes germinam.

Há uma probabilidade maior, cerca de 55%, do número de placas germinadas estarem correlacionadas com o número de sementes não contaminadas, ou seja, é necessário aumentar o número de placas para diminuir a contaminação das sementes, pois neste trabalho quando uma semente contaminava em uma unidade experimental, esta unidade não era aproveitada para o passo subsequente, avaliações de associações ectomicorrízicas.

Tabela 2. Análise de correlações entre número de sementes germinadas (SG), sementes não germinadas (SNG), sementes contaminadas (SC), sementes não contaminadas (SNC), unidades experimentais contaminadas (UEC), unidades experimentais não contaminadas (UENC), unidades experimentais germinadas (UEG) e unidades experimentais não germinadas (UENG) em Canafístula, Santa Maria, RS, 2006.

	SG	SNG	SC	SNC	UEC	UENC	UEG	UENG
SG	1							
SNG	- 0,20	1						
SC	0,01	0,44	1					
SC	0,55	0,44	- 0,30	1				
UEC	- 0,01	0,43	0,77	- 0,16	1			
UENC	0,01	- 0,43	- 0,77	0,16	- 1	1		
UEG	0,74	- 0,03	- 0,04	0,55	-0,06	0,06	1	
UENG	- 0,74	0,03	0,04	- 0,55	0,06	- 0,06	- 1	1

Foi observado neste teste de germinação, diferentes tipos de contaminação das sementes, pois sementes que germinaram, a contaminação foi maior por fungos, e quando não ocorreu germinação a contaminação foi maior por bactérias. Assim, o número de sementes de canafístula por placa de petri mais indicado para estas condições de multiplicação “*in vitro*” e com este método de desinfestação de sementes, é de quatro por unidade experimental.

## CONCLUSÕES

A germinação de sementes de canafístula foi favorecida na unidade experimental com quatro sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: EMBRAPA– SPI, 1994. 640 p.



- CARVALHO, P.E.R. Espécies nativas para fins produtivos. In: CARVALHO, P.E.R. **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: Embrapa CNPF, 1998, 103-125p.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura. **Ambiente software NTIA**, versão 4.2.2: manual do usuário - ferramental estatístico. Campinas, 1997.
- FLORIANO, E.P. **Germinação e dormência de sementes florestais**. Santa Rosa: ANORGS, 2004, 19p. (Caderno Didático n.2).
- LEITE, I.T.A. **Estudo da germinação de sementes de *Mutinga calabura* L. Rio Claro**, 1993. 93p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, 1993.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- OLIVEIRA, L.M.; DAVIDE, A.C.; CARVALHO, M.M.C. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, v.27, n.5, p.597-603, 2003.
- PEREZ, S.C.J.G.A.; FANTI, S.C.; CASALI, C.A. Influência da luz na germinação de sementes de canafístula submetidas ao estresse hídrico. **Bragantia**, v.60, n.3, p.155-166, 2001.
- PEREZ, S.C.J.G.A.; FANTI, S.C.; CASALI, C.A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, v.58, n.1, p.57-68, 1999.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Projeto madeira de Santa Catarina. **Sellowia**, n.34/35, p. 525, 1978.