

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

**Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da  
micorrização e do estabelecimento de mudas de  
eucalipto e sibipiruna em solo contaminado com  
cobre**

**TESE DE DOUTORADO**

**Ricardo Bemfica Steffen**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

**Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização e do estabelecimento de mudas de eucalipto e sibipiruna em solo contaminado com cobre**

**por**

**Ricardo Bemfica Steffen**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zaida Inês Antonioli**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

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

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

**Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da  
micorrização e do estabelecimento de mudas de  
eucalipto e sibipiruna em solo contaminado com  
cobre**

elaborada por  
**Ricardo Bemfica Steffen**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_  
**Zaida Inês Antonioli, Dr<sup>a</sup>.** (Presidente / Orientadora)

\_\_\_\_\_  
**Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Dr.** (UFSM)

\_\_\_\_\_  
**Gilberto Coelho , Dr.** (UFSM)

\_\_\_\_\_  
**Rodrigo Ferreira da Silva, Dr.** (UFSM-CESNORS)

\_\_\_\_\_  
**Gustavo Schiedeck, Dr.** (Embrapa Clima Temperado)

Santa Maria, 8 de outubro de 2010

Aos meus pais Bertilo Steffen e Nara  
Lúcia Bemfica Steffen, pelo amor,  
carinho, apoio e ensinamentos,

## **OFEREÇO**

À minha esposa Gerusa Pauli Kist  
Steffen, pelo carinho, cumplicidade,  
incentivo, compreensão, serenidade e  
alegria, pessoa a quem admiro,  
respeito e amo,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Ao povo brasileiro, que através dos seus impostos possibilitaram minha formação em instituição pública.

À minha esposa Gerusa, pelo amor, dedicação, compreensão e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Bertilo e Nara Lúcia, pelo incentivo aos estudos e compreensão nas muitas horas de ausência devido a este trabalho.

À minha irmã Carolina pelo apoio, carinho e amizade.

À minha avó Eny Bemfica pelo carinho e torcida e ao meu avô Eliseu Bemfica pelos ensinamentos e incentivo, pessoas por quem tenho profunda admiração e respeito.

À professora Zaida Inês Antonioli por nunca ter se limitado à figura de orientadora, estando sempre presente como amiga e por acreditar em minha capacidade.

Ao professor Rodrigo Jacques, pela amizade, orientação e parceria.

Aos Doutores Gustavo Schiedeck, Gilberto Coelho e Rodrigo Ferreira da Silva pelo apoio e disponibilidade em contribuir para a finalização deste trabalho.

Ao técnico de Laboratório Antônio Carlos Bassaco, pelo companheirismo e apoio.

Aos parceiros de ideais Marcelo Aloísio Sulzbacher, Fábio Pacheco Menezes, Diego Pascoal Golle, Daniel Pazzini, Eduardo Lorenzi, Marciel Redin e Alexandre Doneda, pelos conselhos e palavras amigas.

Aos colegas de Laboratório Matheus Pontelli, Manoeli Lupatini, Deisy Morales, Marcos Leandro dos Santos, Edicarla Trentin, Sabrina Dahmer, Natielo Santana, Falko König, Bruna Piaia e Raquel D'Ávila, pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Solos, Tarcísio Uberti, Heverton Heinz, Flávio Vieira da Silva, Carlos Vargas e Roseni dos Santos, pelo apoio prestado.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Departamento de Solos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pelo apoio no desenvolvimento de minha Tese de Doutorado.

À CAPES pela bolsa de estudos.

A todos os familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Se enxerguei mais longe foi por estar apoiado sobre os ombros de gigantes”**

**Isaac Newton**

**“Seja senhor das tuas vontades e escravo da tua consciência.”**

**(Aristóteles)**

## RESUMO

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

### **Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização e do estabelecimento de mudas de eucalipto e sibipiruna em solo contaminado com cobre**

Autor: Ricardo Bemfica Steffen  
Orientadora: Zaida Inês Antonioli  
Santa Maria, Outubro de 2010

Os fungos ectomicorrízicos (fECM) em associação com o sistema radicular das plantas, auxiliam na absorção de água e nutrientes, proporcionando maior crescimento vegetal, principalmente em ambientes com deficiência nutricional ou degradados. Os fECM e as plantas ao conviverem em associação mutualística, permitem que os fungos simbiotes se beneficiem, ou pelo menos tolerem, os metabólitos secundários produzidos pelas plantas hospedeiras. É possível que os óleos essenciais extraídos de essências florestais conhecidamente micossimbiontes possam estimular o crescimento de isolados ectomicorrízicos e beneficiar a simbiose fungo-planta. O trabalho teve como objetivos determinar o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden na produção de inóculo de fECM e sua influência na tolerância dos isolados aos metais pesados cobre, zinco e níquel; e determinar o efeito da utilização do óleo essencial no crescimento de mudas de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) e sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) em casa de vegetação e no estabelecimento de eucalipto em solo contaminado por cobre em condições controladas e a campo. A avaliação do efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto no estímulo ao crescimento dos fECM *Pisolithus* sp. (isolados UFSC Pt 24 e UFSC Pt 188), *Pisolithus microcarpus* (isolado UFSC Pt



116), *Chondrogaster angustiporus* (isolado UFSC Ch 163), *Scleroderma citrinum* (isolado UFSC Sc 124) e *Suillus* sp. (isolados UFSM RA 2.2 e UFSM RA 2.8) em meio de cultura líquido MNM, permite observar que a adição do óleo essencial de *E. grandis* nas concentrações de 20 a 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  promoveu incremento no crescimento miceliano *in vitro* nos isolados UFSC Pt 24, UFSC Pt 116, UFSC Ch 163, UFSC Sc 124, UFSM RA 2.2 e UFSM RA 2.8. No meio de cultura líquido contendo os metais pesados cobre, zinco e níquel, observou-se que a adição do óleo essencial na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  favoreceu o crescimento de isolados ectomicorrízicos. Avaliando-se a utilização do óleo essencial extraído de folhas de eucalipto sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de mudas de eucalipto em condições de viveiro, observou-se que a germinação foi superior quando as sementes foram pulverizadas com 25  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial. A aplicação do óleo essencial nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ , proporcionou maior desenvolvimento das raízes e da parte aérea das mudas de eucalipto em ambiente controlado. Isso pode ser uma alternativa eficiente na bioestimulação do crescimento vegetativo de mudas de eucalipto. O efeito da utilização do óleo essencial também foi positivo quando aplicado em mudas de eucalipto micorrizadas após 90 dias de inoculação, favorecendo tanto a micorrização como o crescimento das mudas. Avaliando-se o efeito do óleo essencial de eucalipto na formação de associação ectomicorrízica e no crescimento de mudas de sibipiruna após 90 dias em condições de casa de vegetação, verificou-se que a aplicação do óleo essencial favoreceu a associação ectomicorrízica, determinada através do porcentual de micorrização, do fungo *P. microcarpus* e o desenvolvimento em mudas de sibipiruna. Mudas de eucalipto formadas em substrato micorrizado, utilizando o óleo essencial na formulação do inoculante ou via aplicação posterior, resultaram em plantas com maior altura, massa fresca e seca, diâmetro do colo e capacidade de adaptação em solo contaminado por cobre. Esses resultados demonstram que a utilização do óleo essencial de eucalipto pode favorecer o estabelecimento de associação micorrízica em mudas de sibipiruna, bem como o crescimento e desenvolvimento de mudas de eucalipto em áreas contaminadas por metais pesados.

**Palavras-chave:** Ectomicorrizas; metais pesados; tolerância; bioestímulo.

## **ABSTRACT**

Doctor Science Thesis  
Graduate Program in Soil Science  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Essential oil of eucalyptus as biostimulator of mycorrhiza and the eucalyptus and sibipiruna tree establishment in soil contaminated with copper**

Author: Ricardo Bemfica Steffen  
Advisor: Zaida Inês Antonioli  
Santa Maria, October 2010

Ectomycorrhizal fungi (fECM) combined with the plant root system improve the absorption of water and nutrients, providing great plant growth, especially in environments with nutritional deficiency or degraded. Due to the fECM and plants live in mutualistic association, allows the fungal symbionts to be benefit, or at least tolerate, the secondary metabolites produced by plants. It is possible that essential oils extracted from forest species that form mycorrhizal associations by stimulating the growth of ectomycorrhizal isolates and benefit the plant-fungus symbiosis. This study aimed to evaluate the effect of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden essential oil, the inoculum production of fECM and its influence on the tolerance of the isolates to heavy metals copper, zinc and nickel. Also, determines the effect of the use of essential oil on growth of eucalyptus (*Eucalyptus grandis*) and sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) seedlings in the greenhouse and the establishment of eucalyptus soil contaminated by copper under controlled conditions and field. The evaluation of the effect of different eucalyptus essential oil concentrations to stimulate the growth of fECM *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24 and UFSC Pt 188), *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), *Chondrogaster angustiporus* (UFSC Ch 163), *Scleroderma citrinum* (UFSC Sc 124) and *Suillus* sp. (UFSM RA 2.2 and UFSM RA 2.8) in liquid culture medium MNM, allow to observe that the addition of eucalyptus

essential oil concentrations 20 and 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  promoted an increase in mycelium growth *in vitro* of the isolates UFSC Pt 24, UFSC Pt 116, Ch 163 UFSC, UFSC Sc 124, UFSM RA 2.2 and UFSM RA 2.8. In liquid culture medium containing heavy metals copper, zinc and nickel. It was observed that the addition of essential oil at concentration of 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  increased the growth of ectomycorrhizal isolates. The evaluation of use of essential oil extracted from eucalyptus leaves on germination and initial development of eucalyptus seedlings in nursery conditions, permits to observe that germination was significantly highest when the seeds were sprayed with 25  $\mu\text{L L}^{-1}$  oil essential. The application of essential oil at concentrations of 30 and 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  improve the development of roots and shoots of eucalyptus seedlings in a controlled environment. This can be an effective alternative in the biostimulation of the vegetative growth of eucalyptus seedlings. The effect of the use of essential oil was also positive when applied to eucalyptus seedlings inoculated 90 days after inoculation, improving both the mycorrhizal and seedling growth. Evaluating the effect of eucalyptus essential oil in the formation of ectomycorrhizal association and growth of sibipiruna seedlings after 90 days under greenhouse conditions. It was found that the application of essential oil enhanced the association of ectomycorrhizal fungus *P. microcarpus* and the development in seedlings of sibipiruna seedlings. The assessment of the degree of mycorrhizal association was determined by the percentage of mycorrhization. Eucalyptus seedlings grown in fertilized substrate, by using of essential oil in the formulation of inoculant or through subsequent application resulted in plants with highest height, fresh and dry weight, diameter and adaptability in soil contaminated by copper. These results may improve the establishment of mycorrhizal fungi in seedlings of sibipiruna seedlings as well as development and growth of eucalyptus seedlings in sites contaminated by heavy metals.

**Keywords:** ectomycorrhizae; heavy metal; tolerance; biostimulation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Sequência da realização do trabalho sobre a utilização de óleo essencial no crescimento de fungos ectomicorrízicos, no crescimento de mudas de eucalipto e sibipiruna e no estabelecimento de eucalipto em solo contaminado por cobre.....	26
FIGURA 2.1 - Representação da relação simbiótica existente entre o sistema radicular de essências florestais e fungos micorrízicos.....	33
FIGURA 2.2 - Representação das alterações morfológicas em raízes colonizadas por fungos ectomicorrízicos. (Extraído de SERRA et al., 2007).....	35
FIGURA 2.3 - Representação das rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos nitrogenados pelas plantas. (Adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2004).....	46
FIGURA 2.4 - Representação das rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos pelas plantas. (Adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2004).....	46
FIGURA 2.5 - Representação das rotas metabólicas envolvidas na síntese de terpenos pelas plantas. (Adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2004).....	47
FIGURA 2.6 - Fórmula estrutural dos compostos 1,8 Cineol ou eucaliptol (a) e Citronelal (b) encontrados em maiores concentrações nos óleos essenciais de espécies florestais do gênero <i>Eucalyptus</i> . (Adaptado de BARANSKA et al., 2005; SANDI; BLANCO, 2007).....	52
FIGURA 3.1 - Ilustração da montagem das unidades experimentais utilizadas na avaliação das características morfológicas das hifas fúngicas crescidas em meio de cultura líquido.....	95
FIGURA 3.2 - Crescimento miceliano <i>in vitro</i> de isolados ectomicorrízicos (UFSC Pt 116, UFSC Pt 24, UFSM RA 2.8, UFSM RA 2.2, UFSC Ch 163, UFSC Pt 188 e UFSC SC 124) em meio de cultura líquido contendo concentrações crescentes de óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> .....	98
FIGURA 3.3 - Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) relacionando as dimensões 1 e 2 referentes ao crescimento dos isolados ectomicorrízicos (UFSC Pt 116, UFSC Pt 24, UFSM RA 2.8, UFSM RA 2.2, UFSC Ch 163, UFSC Pt 188 e UFSC SC 124) em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> . (Euc_Número) representa a utilização do óleo de eucalipto nas diferentes concentrações.....	100

FIGURA 3.4 - Curva de crescimento do micélio dos fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) e <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24) em meio líquido contendo diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto.....	102
FIGURA 3.5 - Hifas do fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) no tratamento controle (a), tratamento 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial (b) e tratamento 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial (c), cinco dias após a incubação. (escala 5 $\mu\text{m}$ ).....	103
FIGURA 3.6 - Diâmetro médio das hifas dos fungos ectomicorrízicos (A) <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) nos tratamentos controle, 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ e do fungo ectomicorrízico (B) <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24) nos tratamentos controle, 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ .....	104
FIGURA 3.7 - Hifas dos fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24) nos tratamentos controle (a), 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial (b) e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial (c) e <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) nos tratamentos controle (d), 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial (e) e 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial (f). (escala 25 $\mu\text{m}$ ).....	105
FIGURA 4.1 - Comprimento e volume relativo das raízes de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 30 e 60 dias após o transplante, tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto.....	124
FIGURA 4.2 - Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) relacionando as dimensões 1 e 2 referentes ao desenvolvimento das plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> pulverizadas com diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto.....	125
FIGURA 4.3 - Mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 60 dias após o transplante nos tratamentos com aplicação de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de eucalipto (A1) e no tratamento controle (B1), raiz secundária das plantas nos tratamentos com aplicação de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de eucalipto (A2) e no tratamento controle (B2) e corte transversal da raiz secundária das plantas nos tratamentos com aplicação de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de eucalipto (A3) e no tratamento controle (B3).....	126
FIGURA 5.1 - Massa seca do micélio dos fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) e <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de cobre em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ .....	141
FIGURA 5.2 - Massa seca do micélio dos fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) e <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de zinco em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ .....	142

FIGURA 5.3 - Massa seca do micélio dos fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) e <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de níquel em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ .....	143
FIGURA 6.1 - Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> pré-germinadas em meio de cultura.....	156
FIGURA 6.2 - Mudanças de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas aos tratamentos controle (a), UFSC Pt 116 (b) e UFSC Pt 24 (c) e aos tratamentos controle (d) e aplicação de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de eucalipto (e).....	162
FIGURA 6.3 - Mudanças de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas aos tratamentos controle (a), UFSC Pt 116 (b) e UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de eucalipto (c) e aos tratamentos controle (d) UFSC Pt 24 (e) e UFSC Pt 24 + 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de eucalipto (f).....	162
FIGURA 6.4 - Porcentagem de colonização ectomicorrízica das raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 90 dias após a micorrização e o início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto.....	166
FIGURA 6.5 - Raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> colonizadas pelo fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) aos 90 dias após a inoculação.....	167
FIGURA 6.6 - Correlação entre a colonização ectomicorrízica e a altura das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 90 dias após o transplante, inoculadas com os fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) (A) e <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24) (B).....	168
FIGURA 6.7 - Correlação entre a colonização ectomicorrízica e a massa seca da parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 90 dias após o transplante, inoculadas com os fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) (A) e <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24) (B).....	168
FIGURA 7.1 - Cortes transversais de raízes de mudas de sibipiruna não inoculadas (A) e inoculadas com o fECM <i>Pisolithus microcarpus</i> e submetidas à aplicação do óleo essencial de eucalipto (B, C e D).....	185
FIGURA 7.2 - Estatura (A) e diâmetro do colo (B) de mudas de sibipiruna submetidas aos tratamentos: controle, inoculado, óleo e inoculado mais óleo.....	186
FIGURA 7.3 - Mudanças de sibipiruna submetidas ao tratamento inoculado + óleo (A) e ao tratamento controle (B), 90 dias após o transplante.....	186

FIGURA 7.4 - Massa seca da parte aérea (A) e comprimento de raízes (B) de mudas de sibipiruna submetidas aos tratamentos: controle, inoculado, óleo e inoculado + óleo.....	187
FIGURA 7.5 - Porcentagem de colonização radicular e contribuição efetiva dos tratamentos inoculado, óleo e inoculado + óleo para a altura e massa seca da parte aérea (MSPA) das mudas de sibipiruna, em relação ao tratamento controle.....	188
FIGURA 8.1 - Área de rejeito das Minas do Camaquã, onde foram realizadas as coletas do solo contaminado por cobre (A) e área circundante ao local de coleta (B).....	206
FIGURA 8.2 - Porcentagem de colonização ectomicorrízica das raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 90 dias após o transplante para substratos com diferentes formas de inoculação.....	211
FIGURA 8.3 – Incremento no crescimento vegetal (%) proporcionado pelos tratamentos em relação ao tratamento controle nas mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 90 dias após o transplante para os substratos. * Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) 9,17.....	212
FIGURA 8.4 - Comparativo das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas aos tratamentos UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ (a), UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (b) e UFSC Pt 116 (c).....	213
FIGURA 8.5 – Teor de cobre nas folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas aos diferentes tratamentos, 150 dias após o transplante para o solo contaminado.....	215
FIGURA 8.6 - Comparativo das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas aos tratamentos UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ (A), UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (B) e UFSC Pt 116 (C) aos 150 dias após o transplante para o solo contaminado por cobre em condições de casa de vegetação.....	217
FIGURA 8.7 - Comparativo das plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas aos tratamentos controle (A), controle + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ (B), UFSC Pt 116 (C), UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ (D), UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (E) e UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ (F), aos 240 dias após o transplante para o campo...	217

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Exemplificação de trabalhos utilizando óleos essenciais de diferentes plantas no controle ou estímulo do desenvolvimento de patógenos e plantas.....	49
TABELA 3.1 - Componentes do óleo essencial extraído de folhas frescas de <i>Eucalyptus grandis</i> .....	97
TABELA 3.2 - Massa seca do micélio fúngico dos isolados ectomicorrízicos incubados na presença óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> . Média de seis repetições (n = 6).....	101
TABELA 4.1 - Porcentagem de germinação de sementes de eucalipto após incubação a diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de cinco repetições (n = 5).....	121
TABELA 4.2 - Altura e massa fresca e seca da parte aérea de mudas de eucalipto aos 30 e 60 dias após o transplante, tratadas com concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de sete repetições (n = 7).....	122
TABELA 4.3 - Massa fresca e seca das raízes de eucalipto e razão raiz / parte aérea aos 30 e 60 dias após o transplante, tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de sete repetições (n = 7).....	123
TABELA 5.1 - Resposta dos fungos ectomicorrízicos <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) e <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de cobre, zinco e níquel em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> na concentração de 20 µL L <sup>-1</sup> .....	144
TABELA 6.1 - Altura das mudas e diâmetro do colo de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 90 dias após a micorrização e início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de oito repetições (n = 8).....	160
TABELA 6.2 - Massa fresca e seca da parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 90 dias após a micorrização e o início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de oito repetições (n = 8).....	163



TABELA 6.3 - Massa seca das raízes e volume radicular de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 90 dias após a micorrização e início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de oito repetições (n = 8).....	164
TABELA 8.1 - Altura e diâmetro do colo de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas a diferentes formas de inoculação ectomicorrízica, 90 dias após o transplante para os substratos. Média de dez repetições (n = 10)...	208
TABELA 8.2 - Massa fresca e seca da parte aérea de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas a diferentes formas de inoculação ectomicorrízica, 90 dias após o transplante para os substratos. Média de dez repetições (n = 10).....	209
TABELA 8.3 - Massa seca de raízes e volume radicular de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> submetidas a diferentes formas de inoculação ectomicorrízica , 90 dias após o transplante para os substratos. Média de dez repetições (n = 10).....	210
TABELA 8.4 - Altura das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o transplante para o solo contaminado com cobre em condições de casa de vegetação. Média de dez repetições (n = 10).....	213
TABELA 8.5 - Diâmetro do colo das mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o transplante para o solo contaminado com cobre em condições de casa de vegetação. Média de dez repetições (n = 10).....	214
TABELA 8.6 – Porcentagem de sobrevivência, altura e diâmetro do colo das plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> aos 240 dias após o transplante para o solo contaminado com cobre em condições de campo.....	217

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mg	miligrama (s)
g	grama (s)
kg	quilograma (s)
kg ha <sup>-1</sup>	quilograma (s) por hectare
kg dm <sup>-3</sup>	quilograma (s) por decímetro cúbico
mg kg <sup>-1</sup>	miligrama (s) por quilo
µL	microlitro (s)
mL	mililitro (s)
L	litro (s)
mL m <sup>-3</sup>	mililitro (s) por metro cúbico
mm	milímetro (s)
cm	centímetro (s)
m	metro (s)
m <sup>2</sup>	metro (s) quadrado (s)
cm <sup>3</sup>	centímetro (s) cúbico (s)
dm <sup>3</sup>	decímetro (s) cúbico (s)
M	molaridade
N	normalidade
°C	Grau (s) Celsius
v/v	volume por volume
p/v	peso por volume
ppm	parte por milhão
%	porcentagem
n <sup>o</sup>	número

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	23
1.1 Referências bibliográficas	27
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	29
2.1 Utilização de essências florestais nativas em programas de reflorestamento	29
2.2 Utilização do eucalipto em programas de reflorestamento	30
2.3 Associações micorrízicas	32
2.4 Ectomicorrizas	34
2.5 Ambientes degradados por metais pesados	37
2.6 Dinâmica e disponibilidade do cobre no solo	38
2.7 Biorremediação de ambientes contaminados por metais	40
2.8 Mecanismos de tolerância dos fungos ectomicorrízicos a metais pesados	41
2.9 Óleos essenciais	45
2.10 Óleo essencial de <i>Eucalyptus</i> sp.	51
2.11 Utilização do óleo essencial de <i>Eucalyptus</i> spp. na agricultura	53
2.12 Função dos metabólitos secundários na associação e estabilização ectomicorrízica	55
2.13 Referências bibliográficas	60
<b>3 Capítulo I - Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador do crescimento de fungos ectomicorrízicos <i>in vitro</i></b>	87
3.1 Resumo	87
3.2 Introdução	88
3.3 Material e métodos	91
3.3.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	91
3.3.2 Isolados de fungos ectomicorrízicos	91
3.3.3 Determinação dos compostos presentes no óleo essencial	92

3.3.4 Avaliação do óleo essencial de <i>E. grandis</i> sobre o desenvolvimento de isolados de fungos ectomicorrízicos <i>in vitro</i>	93
3.3.5 Características morfológicas das hifas	94
<b>3.4 Resultados e discussão</b>	96
<b>3.5 Conclusões</b>	106
<b>3.6 Referências bibliográficas</b>	107
<b>4 Capítulo II - Efeito do óleo essencial de eucalipto na germinação e no desenvolvimento inicial de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden</b>	114
<b>4.1 Resumo</b>	114
<b>4.2 Introdução</b>	115
<b>4.3 Material e métodos</b>	118
4.3.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	118
4.3.2 Sementes	118
4.3.3 Avaliação do efeito do óleo essencial de <i>E. grandis</i> sobre a germinação de sementes	119
4.3.4 Avaliação do efeito do óleo essencial de <i>E. grandis</i> sobre o desenvolvimento e crescimento inicial de plântulas de eucalipto	119
<b>4.4 Resultados e discussão</b>	121
<b>4.5 Conclusões</b>	128
<b>4.6 Referências bibliográficas</b>	129
<b>5 Capítulo III – Influência do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i> no crescimento de isolados de fungos ectomicorrízicos em diferentes concentrações de cobre, zinco e níquel</b>	134
<b>5.1 Resumo</b>	134
<b>5.2 Introdução</b>	135
<b>5.3 Material e métodos</b>	138
5.3.1 Isolados ectomicorrízicos	138
5.3.2 Obtenção do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	138
5.3.3 Efeito do óleo essencial de <i>E. grandis</i> no crescimento <i>in vitro</i> de isolados ectomicorrízicos	139
<b>5.4 Resultados e discussão</b>	141
<b>5.5 Conclusões</b>	146
<b>5.6 Referências bibliográficas</b>	147

<b>6 Capítulo IV - Efeito do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no crescimento de mudas de <i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden</b>	151
<b>6.1 Resumo</b>	151
<b>6.2 Introdução</b>	151
<b>6.3 Material e métodos</b>	155
6.3.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	155
6.3.2 Sementes	155
6.3.3 Isolados ectomicorrízicos	156
6.3.4 Produção do inóculo de fungo ectomicorrízico	156
6.3.5 Preparação dos tubetes	157
6.3.6 Germinação e crescimento inicial de mudas de <i>E. grandis</i> micorrizadas	157
6.3.7 Avaliações	158
<b>6.4 Resultados e discussão</b>	160
<b>6.5 Conclusões</b>	170
<b>6.6 Referências bibliográficas</b>	171
<b>7 Capítulo V – Utilização do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no crescimento de mudas de sibipiruna (<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.)</b>	179
<b>7.1 Resumo</b>	179
<b>7.2 Introdução</b>	180
<b>7.3 Material e métodos</b>	182
7.3.1 Obtenção e preparo das sementes	182
7.3.2 Obtenção do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	182
7.3.3 Preparo do inoculante vegetativo de fECM	182
7.3.4 Montagem e condução dos ensaios	183
7.3.5 Avaliações	184
<b>7.4 Resultados e discussão</b>	185
<b>7.5 Conclusões</b>	191
<b>7.6 Referências bibliográficas</b>	192

<b>8 Capítulo VI – Ação do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas e no crescimento de plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> micorrizadas em solo contaminado por cobre</b>	197
<b>8.1 Resumo</b>	197
<b>8.2 Introdução</b>	198
<b>8.3 Material e métodos</b>	201
8.3.1 Efeito da forma de utilização do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas de <i>E. grandis</i> micorrizadas	201
8.3.1.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Eucalyptus grandis</i>	201
8.3.1.2 Sementes	201
8.3.1.3 Isolado ectomicorrízico	202
8.3.1.4 Tratamentos	203
8.3.1.5 Preparo dos tubetes e produção das mudas de <i>E. grandis</i>	203
8.3.1.6 Avaliações	204
8.3.2 Avaliação da utilização do óleo essencial de eucalipto no crescimento de plantas de <i>E. grandis</i> micorrizadas em solo contaminado por cobre	205
8.3.2.1 Coleta do solo contaminado por cobre	205
8.3.2.2 Transplante das mudas para o solo contaminado por cobre em condições de casa de vegetação	206
8.3.2.3 Avaliações	206
8.3.2.4 Transplante das mudas para o solo contaminado por cobre em condições de campo	207
8.3.2.5 Avaliações	207
<b>8.4 Resultados e discussão</b>	208
<b>8.5 Conclusões</b>	221
<b>8.6 Referências bibliográficas</b>	222
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	229

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cobertura florestal no mundo é de aproximadamente 3,9 bilhões de hectares, dos quais 886 milhões estão na América Latina. Deste total, 61% encontram-se no Brasil, que ocupa a segunda maior cobertura florestal do mundo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008), onde a questão florestal é abordada de maneira quase exclusiva pelos setores de papel e celulose, gerando US\$ 2,2 bilhões em vendas externas (JUVENAL; MATTOS, 2002).

Segundo Rossi (2006), o consumo de madeira proveniente de florestas plantadas no Brasil gira em torno de 108 milhões de m<sup>3</sup> ano<sup>-1</sup>, onde os maiores consumidores correspondem à produção de papel e celulose (30%), à geração de energia (30%) e ao setor madeireiro (20%), sendo o restante utilizado como dormentes, escoras e na fabricação de subprodutos como laminados.

O grande crescimento demográfico e o conseqüente aumento no consumo de produtos florestais têm forçado a silvicultura a aumentar seus níveis de produção. O Brasil, devido às excelentes condições edafoclimáticas e ao avançado desenvolvimento na área de silvicultura, apresenta o maior programa de reflorestamento do mundo, onde utiliza, predominantemente, espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, que correspondem a 1,8 e 3 milhões de hectares plantados, respectivamente (ALVES et al., 2001; JUVENAL; MATTOS, 2002; SCARPINELLA, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008). Entretanto, devido à crescente preocupação com a questão do desmatamento, o protocolo de Quioto, firmado em 1997, instituiu, dentre as medidas a serem estabelecidas para reduzir o desmatamento e a emissão de gases de efeito estufa, que os países participantes adotassem mecanismos de desenvolvimento limpo, incentivando projetos de reflorestamento (SCARPINELLA, 2002).

Nesse contexto ambientalista, preconiza-se o uso de locais degradados por produtos químicos, submetidos à degradação física ou ao excesso de metais pesados, devido a processos de mineração e manufatura de metais, para programas de reflorestamento visando à exploração da madeira e subprodutos.

A presença de quantidades excessivas de metais no solo, além de inibir o crescimento de diversas plantas e causar alterações nas comunidades vegetais, também exerce efeitos adversos sobre os microrganismos do solo, interferindo nas funções do ecossistema, com conseqüências ao meio ambiente e à saúde pública.

Este efeito deletério ao crescimento vegetal ocorrente em ambientes com excesso de metais parece estar relacionado à indução pelos metais a distúrbios fisiológicos e nutricionais nas plantas (PAIVA et al., 2001). Outra resultante da presença de metais no solo é a perda da biodiversidade, tanto animal como vegetal, e a diminuição da fertilidade, exercendo uma pressão de seleção sobre a vegetação existente, dificultando a manutenção de povoamentos florestais, podendo ocasionar extinção da vegetação.

Dentre as alternativas para revegetação, visando à reabilitação destas áreas degradadas, encontra-se o estabelecimento de essências florestais utilizando-se predominantemente espécies da família Myrtaceae, principalmente do gênero *Eucalyptus*. Neste gênero, a formação de associações ectomicorrízicas acontece de forma natural, podendo ocorrer variações quanto à infectividade e à eficiência destes fungos dependendo das condições ambientais e das espécies envolvidas (SMITH; READ, 2008).

Os fungos ectomicorrízicos (fECM) interagem com as espécies vegetais formando associação simbiótica mutualista, que através da maior absorção de água e nutrientes e da proteção das raízes, contribuem para o desenvolvimento das plantas (PEROTTO; BONFANTE, 1997; OLIVEIRA; GIACHINI, 1999; ZEPPA et al., 2005; SOUZA et al., 2006), além de conferirem a estas maior tolerância a metais pesados, o que possibilita a utilização destes fungos na biorremediação de solos degradados (KHAN, 2001; SCHELOSKE et al., 2001; GRAZZIOTTI et al., 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006; KHAN, 2006).

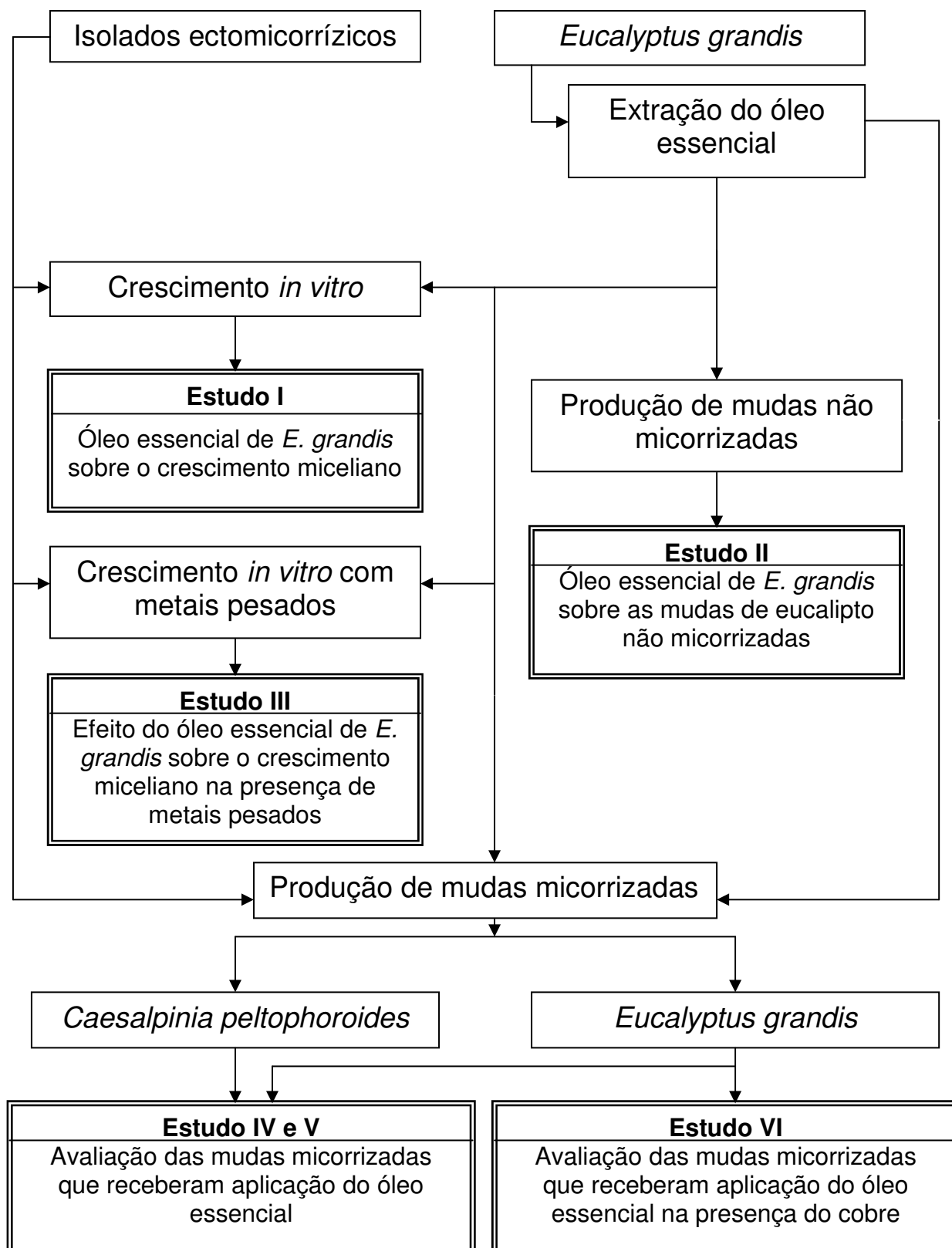
No Rio Grande do Sul, tem sido verificado um baixo índice de sobrevivência das mudas de essências florestais após o transplante para o campo (SILVA et al., 2003a). Assim, o controle da micorrização nos programas de reflorestamento, o qual tem início com a seleção do isolado ectomicorrízico a ser utilizado até a inoculação das plantas, é de fundamental importância para o sucesso no estabelecimento dos programas de reflorestamento (GARBAYE, 1990; SILVA et al., 2003b; SOUZA et al., 2004). Neste sentido, estudos visando a otimização da micorrização de espécies florestais são de fundamental importância para a eficiência deste processo.

Muitas espécies ou mesmo isolados de fECM apresentam seletividade em relação a determinadas espécies vegetais, o que sugere que o fungo seja dependente da presença de sinais bioquímicos específicos produzidos pela planta hospedeira, quando ambos encontram-se associados (MOREIRA; SIQUEIRA,



2006). Essa relação ocorre em associações compatíveis, onde o sistema radicular das plantas sintetiza e disponibiliza compostos fenólicos preferenciais do fungo.

Partindo-se do conhecimento sobre as interações entre fungos micorrizicos e o sistema radicular de plantas, e do conceito sobre a síntese e a constituição dos óleos essenciais de espécies vegetais, o presente trabalho visou avaliar o efeito do óleo essencial extraído de plantas da espécie *Eucalyptus grandis*, na produção de inóculo de fECM e sua influência na tolerância dos isolados a metais pesados, no crescimento de mudas de eucalipto e sibipiruna e no estabelecimento de eucalipto em solo contaminado por cobre. O trabalho foi realizado em seis etapas, correlacionando à utilização do óleo essencial de eucalipto no desenvolvimento de inóculo de fECM e no estabelecimento de essências florestais em solo com presença de metais pesados. Os estudos realizados corresponderam: (1) a contribuição do óleo essencial de *E. grandis* no desenvolvimento de isolados ectomicorrízicos *in vitro*; (2) ao efeito do óleo essencial no desenvolvimento inicial de plantas de *E. grandis*; (3) à influência do óleo na tolerância de fungos ectomicorrízicos a doses elevadas de metais pesados; (4) A aplicação do óleo essencial no desenvolvimento e crescimento de mudas de *Caesalpinia peltophoroides* micorrizadas; (5) ao efeito da aplicação do óleo no desenvolvimento e crescimento de mudas de *E. grandis* micorrizadas e (6) a contribuição do óleo essencial no desenvolvimento e crescimento de plantas de *E. grandis* micorrizadas e transplantadas para solos contaminados pelo excesso de cobre (Figura 1.1).



**Figura 1.1** - Sequência da realização do trabalho sobre a utilização de óleo essencial no crescimento de fungos ectomicorrízicos, no crescimento de mudas de eucalypto e sibipiruna e no estabelecimento de eucalypto em solo contaminado por cobre. Santa Maria, 2010.

## 1.1 Referências bibliográficas

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

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

GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bonn, v. 223, n. 6, p. 1115-1122, may 2006.

GRAZZIOTTI, P. H. et al. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 839-848, julho/agosto 2001.

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, setembro 2002.

KHAN, A. G. Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. **Environment International**, Witherslack, v. 26, n. 5-6, p. 417-423, may 2001.

KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 7, n. 7, p. 503-514, july 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ªEd. Editora UFLA. 2006, 729p.

OLIVEIRA, V. L.; GIACHINI, A. J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. UFLA: Lavras, 1999. 818p.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G. de; SIQUEIRA, J. O. Efeito da aplicação de cádmio sobre o teor de nutrientes em mudas de Cedro (*Cedrella fissilis* Vell.). **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 153-162, dezembro 2001.

PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 496-501, december 1997.

ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift***. 2006, 188f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SCARPINELLA, G. D`A. **Reflorestamento no Brasil e o protocolo de Quioto**. 2002, 182f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SCHELOSKE, S.; MAETZ, M.; SCHÜBLER, A. Heavy metal uptake of *Geosiphon pyriforme*. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Singapore, v. 181, n. 1-4, p. 659-663, july 2001.

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

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3<sup>a</sup> ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008. **Silviculture-se**. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

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

SOUZA, V. C. de et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612–618, julho/setembro 2006.

ZEPPA, S. et al. *Tilia platyphyllos* Scop.-*Tuber brumale* Vittad. vs. *T. platyphyllos* Scop.- *T. borchii* Vittad. ectomycorrhizal systems: a comparison of structural and functional traits. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 7, p. 709-716, july 2005.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Utilização de essências florestais nativas em programas de reflorestamento

A trajetória de colonização de imigrantes na região sul do Brasil está associada ao auto consumo de florestas nativas, tanto pela extração de madeira para construção, como sua utilização como fonte de energia, resultando em grandes áreas desmatadas ao longo do tempo (ZUCHIWSCHI et al., 2010). Andreazza et al. (2008) em revisão sobre a área florestal no Rio Grande do Sul, descreve que originalmente, o Estado possuía 42% de sua superfície territorial coberta com florestas nativas, mas já no início do século XX, essa área foi reduzida para aproximadamente 25%, chegando a apenas 4% em 1965. Atualmente, as florestas nativas estão reduzidas a fragmentos, envoltas por áreas cultivadas principalmente com grãos.

Segundo Togoro et al. (2007), a tecnologia de reflorestamento de áreas degradadas utilizando essências florestais nativas ainda é pouco conhecida, tornando-se necessário um conhecimento mais adequado desta prática.

Apesar da riqueza da flora existente no Brasil, o País possui uma carência de pesquisas que proporcionem o conhecimento das espécies florestais nativas e possam servir de referência e subsídio para os programas de recuperação e manejo de áreas naturais (LEONHARDT et al., 2007). Segundo Silva et al. (2010), as essências florestais nativas podem ser uma opção para revegetação de áreas contaminadas por metais pesados.

Além de suas características fisiológicas desejáveis, como crescimento relativamente rápido, vigor e rusticidade, as essências florestais nativas apresentam grandes vantagens comerciais quanto à madeira e aos subprodutos em relação às comercialmente mais utilizadas, como algumas espécies exóticas (SCHROEDER, 1991). Embora existam centenas de espécies florestais nativas, os viveiros florestais e as empresas fornecedoras de mudas para reflorestamento trabalham com uma variedade limitada de espécies vegetais nativas, normalmente aquelas de fácil germinação e rápido crescimento (BARBOSA et al., 2003; VIANI; RODRIGUES, 2007; ARRUDA et al., 2009).

Dentre os fatores que limitam a expansão da utilização de espécies florestais em programas de reflorestamento, Carvalho et al. (1980), Nassif e Perez (1997),

Fonseca et al. (2001) e Santarelli (2004) citam a falta de interesse dos viveiristas, as dificuldades na obtenção de sementes e o processo de dormência das sementes de algumas espécies florestais nativas.

Dentre as essências florestais nativas passíveis de serem utilizadas em programas de reflorestamento, Lorenzi (1992), Finger et al. (1996), Carvalho (1998), Scalon et al. (2002) e Ferreira et al. (2007) apresentam as espécies angico-cascudo (*Anadenanthera peregrina* var. *falcata* Benth), angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil* Griseb.), angico-branco (*Anadenanthera colubrina* var. *colubrina* Vell.), bracatinga (*Mimosa scrabella* Benth), canjerana (*Cabrela canjerana* subsp. *Canjerana* Vell), canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng.), guapuruvu (*Schizolobium parahyba* Vell.), ingá (*Inga edulis* Mart.), pau-ferro (*Astronium balansae* Engl.), pau-marfim (*Balfourodendron riedelianum* Engl.), pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* Bertol.), sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* Vell).

Para Mochiutti et al. (2008), a regeneração de espécies arbóreas nativas nas plantações florestais está condicionada a dois fatores básicos: distância e qualidade da fonte e dos agentes dispersores de propágulos, e capacidade desses em se estabelecerem e se desenvolverem nas condições do ambiente.

De forma geral, as plantações com finalidades remediadoras e industriais utilizam essências florestais com capacidade de produção de grande quantidade de material lenhoso, de qualidade homogênea, baixo custo final e adaptabilidade a ambientes passíveis de estresses bióticos, abióticos e nutricionais (KAGEYAMA; CASTRO, 1989). Devido a isso, até o presente momento, observa-se predominantemente a utilização de essências florestais exóticas em plantações comerciais, por apresentarem respostas quanto ao melhoramento genético e à utilização de altas tecnologias de produção (JUVENAL; MATTOS, 2002).

## **2.2 Utilização do eucalipto em programas de reflorestamento**

O setor florestal brasileiro ocupa área equivalente a de 544 milhões de hectares de florestas nativas, 6 milhões de hectares de florestas cultivadas, sendo estas principalmente com espécies de eucalipto (79,7%), pinus (19,9%) e outras (0,4%), e, aproximadamente, 43 milhões de hectares destinados a unidades de

conservação federal (BRACELPA, 2008; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008).

Segundo Rossi (2006), a conscientização sobre os aspectos relacionados à utilização de madeira proveniente de espécies florestais nativas ocasionou o uso massivo de espécies exóticas em programas de reflorestamento. No entanto, devido aos aumentos no consumo de matéria-prima oriunda do setor florestal, a área atualmente cultivada com essências florestais destinadas à extração de madeira não está suprimindo o volume de material requerido pelas indústrias de papel e celulose, de produção de energia e outros produtos (HOEFLICH et al., 2000; ROSSI, 2006).

Estimativas realizadas pela FAO indicam que o consumo mundial de madeira aumentará em 60% até o ano de 2030, alcançando cerca de 2,4 bilhões de m<sup>3</sup>. Segundo os autores, estes dados levantam alguns questionamentos a respeito da origem da madeira utilizada pelas diversas indústrias, de quem produzirá e de como deverá ser produzida (BAENA; GLOVACK, 2007). A fim de evitar a expansão desordenada das florestas plantadas e a pressão destas sobre as áreas compreendidas com florestas nativas, pesquisas estão sendo realizadas no intuito da maximização da produção florestal em áreas destinadas para este fim.

O Brasil, devido às excelentes condições edafoclimáticas e ao avançado desenvolvimento na área de silvicultura, apresenta o maior programa de reflorestamento do mundo (ALVES et al., 2001; JUVENAL; MATTOS, 2002), o qual utiliza-se predominantemente do plantio de árvores dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, os quais apresentam dependência de associação micorrizica para seu estabelecimento e desenvolvimento a campo (ROSSI, 2006).

Introduzido no Brasil no ano de 1868, o eucalipto, proveniente da Austrália, era utilizado apenas como planta decorativa e na formação de quebraventos. Com o desenvolvimento dos programas de reflorestamento, o eucalipto, com mais de 300 espécies, passou a ser utilizado comercialmente para a produção de madeira, sendo atualmente a essência florestal com maior área plantada no País, apresentando altos níveis de melhoramento genético, de produtividade e qualidade da madeira (BAENA, 2005; ROSSI, 2006; ROCHA; SANTOS, 2007; SOUZA et al., 2008).

Atualmente, das áreas reflorestadas no Brasil, as espécies do gênero *Eucalyptus*, devido principalmente a sua diversidade, adaptabilidade climática e ao seu potencial produtivo, correspondem a 79,7% das espécies utilizadas (EMBRAPA, 2003; BRDE, 2004; GARAY et al., 2004; BRACELPA, 2007). Dentre as espécies de

eucalipto, a espécie *E. grandis* é a mais utilizada, ocupando 55% das áreas cultivadas com eucaliptos, seguido das espécies *E. saligna*, com 17%, *E. urophylla*, com 9% e *E. viminalis*, com 2%. (AFUBRA; SINDIFUMO, 2001; ANDRADE et al., 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008).

Com o aumento dos programas de reflorestamento, as espécies do gênero *Eucalyptus* têm despertado a atenção de pesquisadores, devido a sua adaptabilidade e produtividade, necessárias para atender as demandas inerentes à produção de madeira (ANDRADE et al., 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008). O gênero *Eucalyptus* é considerado, atualmente, uma das principais essências florestais encontradas no Brasil (TREVISAN et al. 2007). Segundo estes autores, entre as espécies florestais folhosas, o eucalipto poderá representar, em curto prazo, a matéria-prima com maior demanda no mercado mundial, sendo utilizado para atender diversos segmentos industriais e comerciais.

Devido às constantes preocupações voltadas para a questão do chamado apagão florestal e para o desmatamento de áreas nativas, a silvicultura vem sendo forçada a aumentar os seus níveis de produção para satisfazer as necessidades decorrentes do crescimento demográfico. Em vista disso, alguns Países vêm desenvolvendo programas de micorrização controlada em viveiros de mudas florestais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), buscando na associação micorrízica uma base biologicamente ativa para possibilitar aumentos significativos na produção de biomassa florestal.

### **2.3 Associações micorrízicas**

Dentre as inúmeras inter-relações biológicas estabelecidas no ecossistema solo, as simbioses entre plantas e microrganismos heterotróficos, como o caso das micorrizas, destaca-se pelos benefícios proporcionados à produção vegetal.

Descritas inicialmente por Frank (1885), as micorrizas são associações mutualísticas entre fungos simbiotes do solo e uma ampla variedade de plantas, constituindo-se em um importante fator de crescimento e desenvolvimento de determinadas espécies vegetais, nas mais variadas condições de solo e clima.

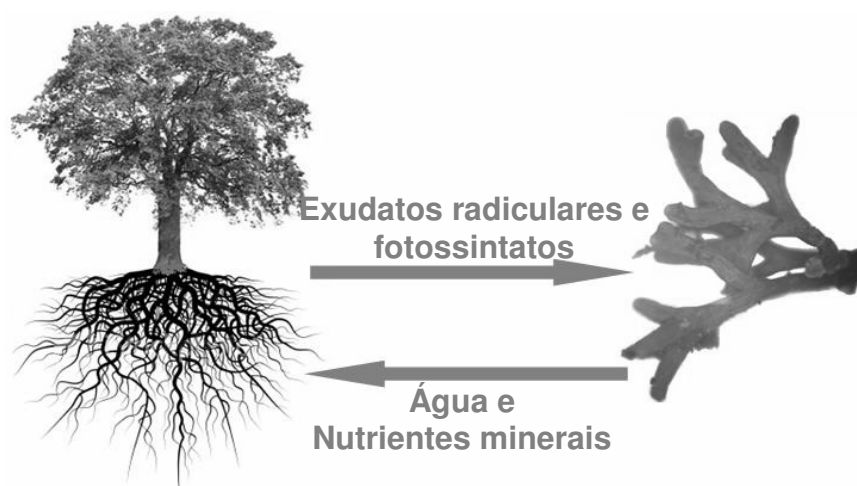
Estudos em raízes fossilizadas evidenciam que as micorrizas surgiram há cerca de 400 milhões de anos, período este que coincide com o aparecimento das plantas terrestres (OLIVEIRA; GIACHINI, 1999; SMITH; READ, 2008).



Embora a formação e estabilização da simbiose micorrízica represente um gasto energético para a planta, esta é beneficiada pelo aumento significativo na área de absorção proporcionado pelas hifas do fungo no solo, visto que uma única hifa pode se estender por mais de dois metros e formar, aproximadamente, 120 ramificações (TRAPPE; FOGEL, 1977; BRUNDREET et al., 1996; SMITH; READ, 2008).

As micorrizas são consideradas a simbiose de maior expressão ecológica e econômica entre fungos do solo e raízes de plantas superiores (BRADY; WEIL 2002). Na relação mutualística estabelecida entre as raízes da planta e o fungo, ocorre uma micotrofia, onde o fungo proporciona à planta maior área de absorção de água e nutrientes minerais, devido à extensão de suas hifas no solo, e em contrapartida, a planta libera na forma de exudatos radiculares alguns fotossintatos, compostos orgânicos e aminoácidos, beneficiando o desenvolvimento miceliano (Figura 2.1) (ANTONIOLLI; KAMINSKI, 1991; ZEPPA et al., 2005; SOUZA et al., 2006; SMITH; READ, 2008).

A exploração da simbiose micorrízica no auxílio ao estabelecimento e crescimento das essências florestais a campo representa uma alternativa de baixo impacto ambiental (OLIVEIRA; GIACHINI, 1999; SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2008).



**Figura 2.1** - Representação da relação simbiótica existente entre o sistema radicular de essências florestais e fungos micorrízicos.

A contribuição das micorrizas no sistema planta-microrganismos representa uma alternativa de baixo custo e biotecnologicamente efetiva no cultivo de plantas,

sendo de fundamental importância para a biologia e ecologia de muitas espécies de vegetais terrestres (MARTIN et al., 2001; CÁZARES; MEDRANO, 2002).

Com base nas características morfológicas, anatômicas e estruturais, as micorrizas podem ser agrupadas em endomicorrizas, ectendomicorrizas, ectomicorrizas, micorrizas arbutóides, monotróides, ericóides e orquidóides, sendo as endomicorrizas e as ectomicorrizas as de maior importância (SMITH; READ, 2008).

## **2.4 Ectomicorrizas**

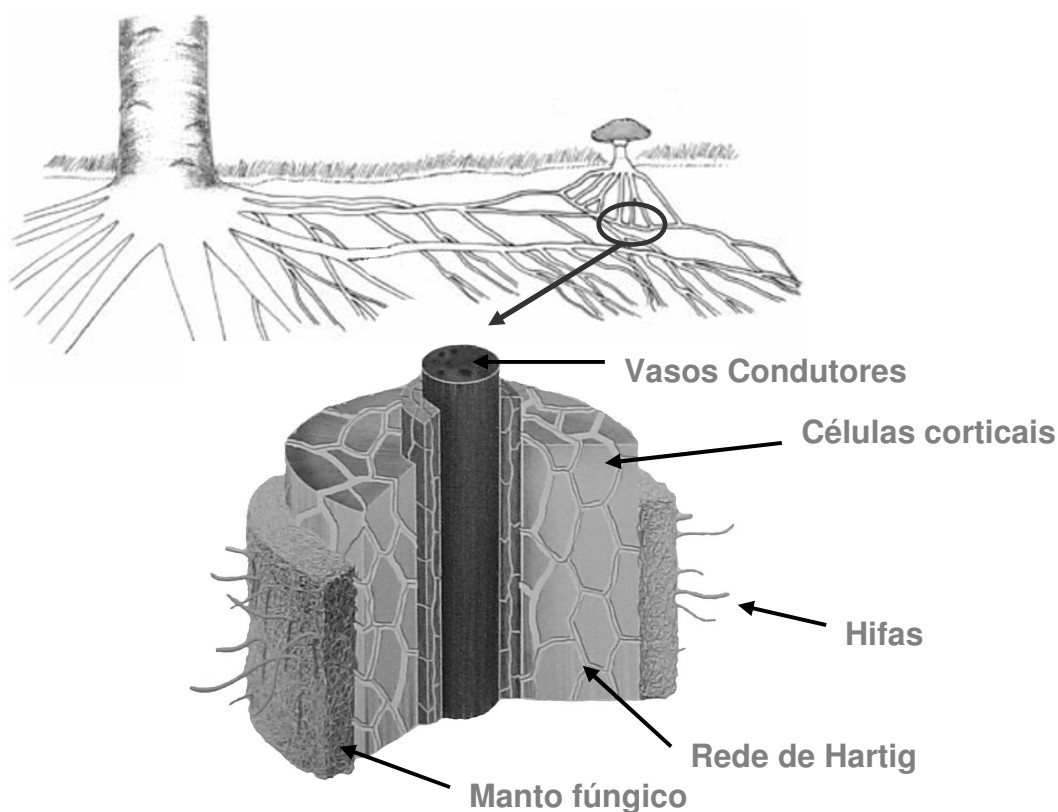
Embora ocorra, em cultivos de eucalipto, uma sucessão na micorrização das raízes, observando-se predomínio na ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares na fase inicial de desenvolvimento das plantas (ROJAS; SIQUEIRA, 2000), o crescimento e estabelecimento das plantas a campo são beneficiados pela colonização ectomicorrízica (SANTOS et al., 2001b; CARRERA-NIEVA; LÓPEZ-RÍOS, 2004; ANDREAZZA et al., 2008).

Com aproximadamente 5000 espécies envolvidas em associações simbióticas com plantas superiores, as ectomicorrizas, além de proporcionarem benefícios ao desenvolvimento vegetal, atuam na estabilização de florestas naturais e cultivadas, servindo como fonte de alimento e participando da ciclagem de nutrientes em florestas temperadas e tropicais (TAYLOR, 1991; HOBBIE, 2006).

Os fungos ectomicorrízicos (fECM), embora se associem com um grupo restrito de plantas (aproximadamente 5% das espécies conhecidas), são encontrados formando simbiose com 90% das espécies arbóreas de clima temperado, principalmente com as pertencentes às famílias Pinaceae (95%), Fagaceae (94%), Betulaceae (70%) e Salicaceae (83%) (OLIVEIRA; GIACHINI, 1999; MOLINA et al., 2005).

As ectomicorrizas apresentam núcleo tipicamente haplóide, micélio geralmente segmentado e dicariótico e grampos de conexão (FINLAY, 2006), pertencendo a um tipo especial de micorrizas, em que o componente fúngico localiza-se nos espaços intercelulares da raiz, não havendo penetração nas células (BELLEI; CARVALHO, 1992). Raízes colonizadas por ectomicorrizas são caracterizadas por apresentarem manto fúngico recobrimo a superfície apical das raízes e hifas intercelulares (rede de Hartig) localizadas internamente nas raízes,

penetrando o córtex intercelular, formando uma malha fúngica em substituição ou coexistindo com a lamela média (Figura 2.2) (BRUNDRETT et al., 1996), propiciando ao fungo um ambiente intra-radicular protegido (BELLEI; CARVALHO, 1992).



**Figura 2.2** - Representação das alterações morfológicas em raízes colonizadas por fungos ectomicorrízicos. (Extraído de SERRA et al., 2007).

Segundo Allen et al. (1995), Oliveira e Giachini (1999) e Graziotti et al. (2001a), a maioria dos fECM identificados no mundo são ocorrentes em florestas temperadas com predominância de coníferas. As ectomicorrizas são fungos superiores, pertencentes aos filos Basidiomycotina, Ascomycotina e Zigomicotina (BRUNDRETT et al., 1996), além dos fungos imperfeitos ou Deuteromycotina (ALEXOPOULOS et al., 1996), apresentando diversidade ecológica e fisiológica, e uma grande variação ecotípica entre isolados de uma mesma espécie (TRAPPE; FOGEL, 1977).

No Brasil, os Basidiomicetos colonizam e frutificam com frequência espécies de pinus e eucaliptos, sendo as espécies fúngicas dos gêneros *Pisolithus* Alb. & Schwein., *Scleroderma* Pers., *Rhizopogon* Fr., *Amanita* Pers. e *Lactarius* Pers. as mais encontradas (OLIVEIRA; GIACHINI, 1999).

As ectomicorrizas, embora possuam um estágio saprofítico, regulam seu crescimento quando em simbiose com as raízes das plantas (BUSCOT et al., 2000).

Apesar da especificidade hospedeiro-fungo de ocorrência natural, em muitas áreas podem ser encontradas até 35 espécies por 0,1 hectare, dependendo da adaptação destes organismos ao ambiente (BRUNS, 1995).

A associação ectomicorrízica apresenta importância econômica significativa para o setor florestal (BELLEI; CARVALHO, 1992), favorecendo o estabelecimento e o desenvolvimento destas plantas em áreas ambientalmente alteradas, devido ao aumento na capacidade de absorção de água e nutrientes, contribuindo na longevidade de raízes, além de proteção contra fitopatógenos (JEFFRIES; RHODES, 1987; FOUNOUNE et al., 2002; WHIPPS, 2004), tolerância à salinidade do solo (FENG et al., 2002) e a metais pesados (GRAZZIOTTI et al., 2001).

Nos programas de reflorestamento, o controle da micorrização, desde a seleção do isolado ectomicorrízico a ser utilizado até a inoculação destes nas espécies florestais ainda no viveiro, é de fundamental importância para o sucesso no estabelecimento e desenvolvimento das plantas após o transplante e para a manutenção da estabilidade de comunidades florestais (ANDREAZZA et al., 2004; SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2006).

As ectomicorrizas são consideradas importantes agentes estruturadores de comunidades florestais, influenciando a sucessão e a resiliência das plantas nas florestas durante os processos de mudanças climáticas (PERRY et al., 1990), exercendo grande influência nestas, amenizando os impactos provocados por estresses bióticos e abióticos (SILVA, 2002; SILVA et al., 2003; SMITH; READ, 2008). Devido a modificações estruturais das raízes colonizadas e à presença de um manto fúngico sobre as raízes, a micorriza altera a interface solo-planta, formando uma barreira físico-química, protegendo as plantas da presença de metais pesados e outros poluentes tóxicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Há indícios de que estes microrganismos contribuíram para a extensão de florestas para áreas ambientalmente degradadas. Segundo Brunner (2001), o estabelecimento de mudas florestais em solos deficientes em nutrientes ou contaminados pela deposição de certos poluentes se torna possível devido à simbiose destas plantas com fECM.

Em solos que apresentam limitações quanto a sua fertilidade, a inoculação de fECM promove aumento na sobrevivência das plantas após o transplante (SILVA et

al., 2003a; MELLO et al., 2006). Já em solos com excesso de metais pesados, as ectomicorrizas em simbiose com as plantas, podem aumentar a absorção de nutrientes pelas raízes e imobilizar os metais, reduzindo a translocação destes para a parte aérea, conferindo maior tolerância das plantas a estes elementos (GRAZZIOTTI et al., 2001).

## **2.5 Ambientes degradados por metais pesados**

A ocorrência de áreas contaminadas, bem como de problemas oriundos destes locais, vem crescendo cada vez mais no Brasil. Essas áreas podem ser representadas por locais de descarte inadequado de resíduos de indústrias de produtos químicos, utilização e/ou descarte de agrotóxicos e de resíduos orgânicos contaminados, como dejetos de animais, resíduos sólidos de indústrias desativadas, áreas de aterros sanitários e de descarte de resíduos hospitalares, áreas contaminadas por metais pesados e próximas a postos de combustíveis, entre outros. Além destas formas de deposição de metais nos solos, processos de mineração e manufatura de metais nobres frequentemente provocam a contaminação do ambiente por uma mistura de metais potencialmente tóxicos (RIBEIRO FILHO et al., 1999), dificultando a exploração econômica ou ecológica destes ambientes.

Atualmente, dentre as diversas fontes de contaminação, os metais pesados, devido à ocorrência de focos de contaminação, refletiram no crescimento do interesse dos órgãos de pesquisa no estudo de áreas contaminadas (RAMALHO et al., 2000).

Os metais pesados ocorrem de forma natural nos solos (FADIGAS et al., 2002), mas devido à presença desses elementos em diversos materiais utilizados em práticas agrícolas, a contaminação por estes metais está sendo um tema bastante discutido (ZABOWSKI; ZASOSKI, 1987; ABREU et al., 1995). Segundo Ramalho et al. (2000), embora alguns metais pesados sejam considerados elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas, quando presentes no solo em determinadas concentrações, podem atingir níveis de toxicidade, interferindo negativamente no estabelecimento e desenvolvimento vegetal, resultando em declínio produtivo em determinados casos.

Dentre os metais tóxicos encontrados nos solos encontram-se o cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni), cromo (Cr), cádmio (Cd) e chumbo (Pb), dos quais os elementos Cd e Pb fazem parte da lista dos 20 maiores poluentes nocivos ao ambiente (GRAVILESCU, 2004). A maioria das plantas apresenta um efeito deletério em seu crescimento quando cultivadas em ambiente com excesso de metais. Esse efeito parece estar relacionado à indução pelos metais a distúrbios fisiológicos e nutricionais nas plantas (PAIVA et al., 2001). Segundo Carneiro et al. (2001), quando em excesso no solo, além dos metais pesados inibirem o crescimento de diversas plantas causando alterações nas comunidades vegetais, também exercem efeitos adversos sobre os microrganismos do solo, interferindo nas funções do ecossistema, com consequências ao ambiente e à saúde pública. Como resultado da contaminação dos sistemas biológicos, pode-se constatar a oxidação do DNA, lesões pré-mutagênicas, erros de pareamento e de replicação, produzindo mutagênese, carcinogênese, teratogenicidade e morte celular de uma vasta gama de organismos (MALIK, 2004; GRISOLIA, 2005).

## **2.6 Dinâmica e disponibilidade do cobre no solo**

Apesar do cobre ser um micronutriente essencial às plantas e a alguns organismos e ocorrer de forma natural nos solos, sendo constituinte de algumas enzimas e participante de processos essenciais (como a fotossíntese), quando em excesso, este elemento pode causar danos às plantas e aos organismos, por se enquadrar entre os elementos que apresentam densidade superior a  $6 \text{ Kg dm}^{-3}$ , sendo considerado um metal pesado.

Os metais pesados ocorrem de forma natural nos solos e, conhecidamente, são depositados sobre estes por processos de mineração e manufatura de metais nobres, os quais, frequentemente provocam a contaminação do ambiente por uma mistura de metais potencialmente tóxicos, dificultando a exploração econômica ou ecológica destes ambientes.

De forma geral, o aumento da concentração de um nutriente na solução do solo, devido à deposição deste ao meio, resulta em aumentos na sua absorção pelas plantas, o que pode levar o elemento, no caso o cobre, de uma condição de essencial a fitotóxico (PAIVA et al., 2001).

A concentração natural de cobre no solo varia de 10 a 80 mg kg<sup>-1</sup>, com uma média de 30 mg kg<sup>-1</sup>, dependendo do material de origem e de atividades antrópicas realizadas no local, sendo grande parte da quantidade de cobre complexada na matéria orgânica do solo e uma pequena fração distribuída entre as formas Cu<sup>2+</sup>, CuOH<sup>+</sup> e CuSO<sub>4</sub><sup>0</sup>. De uma forma geral, considera-se os teores de 20 a 100 mg kg<sup>-1</sup> com potencial de causar fitotoxicidade, dependendo da espécie vegetal, do estágio de desenvolvimento e de características edafoambientais (SOARES et al., 2000).

Elementos como o cobre apresentam uma dinâmica complexa no solo, sendo afetados diretamente pela composição química do solo (material de origem e processos de intemperismo), capacidade de troca de cátions, pH do solo, teor de matéria orgânica, argila e óxidos. Além disso, independentemente do tipo de solo, a presença excessiva dos íons alumínio, ferro e manganês pode provocar redução na disponibilidade do cobre para as plantas.

No solo, o cobre pode ser encontrado nas formas livre Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, íon divalente Cu<sup>2+</sup> (forma mais tóxica do elemento), complexos inorgânicos simples sintéticos Cu-EDTA, complexo hidróxi-metal CuOH<sub>2</sub><sup>0</sup>, complexos inorgânicos simples CuCO<sub>3</sub><sup>0</sup>, complexos orgânicos poliméricos Cu-ácidos fúlvicos ou húmicos e na forma de complexos solúveis, com ânions inorgânicos ou ligantes orgânicos, estando facilmente disponíveis para serem absorvidos pelas plantas e/ou lixiviados no solo (TWISS et al., 2001).

A matéria orgânica, apesar de representar menos de 5% da fração sólida do solo, apresenta alta capacidade de interagir com outros componentes, alterando propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, as quais afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Devido à sua alta reatividade, a matéria orgânica regula a disponibilidade de vários micronutrientes essenciais, bem como a atividade e biodisponibilidade de metais pesados e elementos fitotóxicos.

As substâncias húmicas apresentam um alto grau de seletividade, formando complexos de esfera interna na sequência Cu > Fe > Mn > Zn. O micronutriente metálico (no caso o cobre) pode sofrer reações de sorção com o material orgânico, resultando em uma estreita associação em nível molecular, entre o metal e um ou mais grupos funcionais do material húmico ou ligante, passando de uma ligação eletrostática a fortemente covalente (MANTOVANI, 2009).

Em solos tropicais, os óxidos exercem papel importante na biodisponibilidade dos metais pesados. Solos com elevado teor de óxidos apresentam grande

capacidade de retenção de cobre, devido ao estabelecimento de ligações químicas fortes entre o óxido e o metal, tendendo à irreversibilidade, por meio da formação de ligações covalentes (onde ocorre compartilhamento de elétrons) com OH e/ou O na superfície desses colóides. Os óxidos de ferro apresentam o ponto de carga zero (PCZ) superior a 7,0. Sendo assim, em solos ácidos a adsorção dos metais é baixa devido à predominância de cargas positivas na superfície destes óxidos. Os óxidos de ferro goethita e hematita adsorvem especificamente os metais pesados na seguinte ordem de preferência:  $Cu > Pb > Cd > Co > Ni > Mn$  (BISSANI; BOHNEN, 2004).

À medida que o pH do solo aumenta, cresce o número de cargas negativas na superfície dos colóides orgânicos e inorgânicos, o que, provavelmente, aumenta a atração do cobre (cátion metálico) à superfície destes colóides. Aliado a isso, a redução da acidez do solo também contribui para a redução da biodisponibilidade do cobre por favorecer a formação de espécies precipitadas na forma de óxidos.

## **2.7 Biorremediação de ambientes contaminados por metais**

O ambiente contaminado pode ser remediado por diferentes processos. Os mais comumente utilizados baseiam-se em processos químicos e físico-químicos, os quais, na maioria das vezes, são ineficientes, inespecíficos, de custo elevado, restritos por questões de volume ou área e, em alguns casos, produzem resíduos que necessitam de sistema de tratamento adicional (ECCLES, 1999; MULIGAN et al., 2001). Recentemente, estudos estão sendo direcionados para a utilização de microrganismos na biorremediação de solos contaminados por metais (GADD, 2004).

Como alternativa para reabilitação e revegetação de áreas degradadas, encontra-se a utilização de essências florestais aliadas a microrganismos capazes de proporcionar condições de estabelecimento das plantas em ambientes adversos. Dentre os microrganismos que podem apresentar tolerância a ambientes contaminados por metais pesados, os fungos, desde que adaptados ao ambiente contaminado, podem contribuir para o estabelecimento da vegetação nestes locais (AMEZCUA-ALLIERI et al., 2005).

Nos últimos anos, tem-se intensificado o uso de fungos micorrízicos na promoção do crescimento de plantas em ambientes degradados (GRAZZIOTTI et al.,



2001, 2003; KHAN, 2006; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006). No Brasil, a ocorrência da simbiose entre ectomicorrizas e espécies florestais nativas é pouco conhecida, podendo ser considerada rara em detrimento da diversidade de espécies existentes (MENDONÇA; OLIVEIRA, 1996; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A associação ectomicorrízica é predominantemente constatada em plantas exóticas como as da família Pinaceae, em plantas do gênero *Pinus*, e na família Myrtaceae, em plantas do gênero *Eucalyptus*, sendo, devido a este motivo, as espécies exóticas mais recomendadas para utilização em reflorestamentos de ambientes degradados.

## **2.8 Mecanismos de tolerância dos fungos ectomicorrízicos a metais pesados**

Em solos com excesso de metais pesados, os fECM em simbiose com as plantas, podem aumentar a absorção de nutrientes pelas raízes e imobilizar os metais pesados, reduzindo a translocação destes para a parte aérea, conferindo maior tolerância das plantas a estes elementos (GRAZZIOTTI et al., 2001a; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006). Nesse sentido, os fECM representam uma valiosa alternativa, devido ao fato de fornecerem benefícios ao crescimento da planta hospedeira, principalmente em situações em que fatores edáficos são limitantes (SMITH; READ, 2008). Este efeito tem sido atribuído à habilidade dessas associações em reter os metais no micélio fúngico, evitando a translocação destes elementos para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (AGGANGAN et al., 1998; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Segundo Hartley et al. (1997), as ectomicorrizas respondem de maneira diferenciada à contaminação do solo, de acordo com sua espécie e o tipo de metal envolvido. De acordo com Doelman (1986), alguns fECM podem acumular mais de 30 vezes a concentração de Cd presente no solo de sua ocorrência. Em contrapartida, os metais pesados, quando em níveis muito elevados, podem também afetar negativamente o desenvolvimento dos fECM.

Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que a contaminação por metais pode inibir o desenvolvimento de alguns isolados fúngicos (GRAZZIOTTI et al., 2001b, 2003) e a colonização ectomicorrízica (BELL et al., 1988). Rühling e Söderstrom (1990) observaram redução no número de frutificações em espécies de Basidiomicetos com o aumento do nível de contaminação por arsênio, cádmio, cobre, chumbo e zinco. Contudo, são poucos os trabalhos que visam selecionar

fungos ectomicorrízicos tolerantes a metais pesados. Desse modo, alternativas para a maximização da simbiose entre fECM e essências florestais, visando o estabelecimento destas espécies vegetais em ambientes contaminados, tornam-se necessárias para a remediação e produção economicamente viável dessas áreas.

Neste sentido, a associação de espécies florestais com organismos que auxiliem o seu estabelecimento em solo contaminado, passa a ser uma alternativa para o estabelecimento vegetal em áreas onde naturalmente as plantas teriam dificuldades ou até mesmo não se estabeleceriam devido ao potencial contaminante do solo.

Segundo Smith e Read (2008), a utilização da associação ectomicorrízica como alternativa biotecnológica para a implantação de espécies vegetais em áreas contaminadas com metais pesados está fundamentada na formação do manto de hifas sobre as raízes, o qual representa uma barreira físico-química à absorção destes elementos potencialmente tóxicos.

O manto fúngico (emaranhado de hifas) é formado após a fase de pré-contato entre o fungo e a planta, estabelecido pelo quimiotropismo espécie-específico, e decorridas as fases de reconhecimento simbiótico e colonização das raízes pelo fungo, onde este assume as características de auxílio na absorção de nutrientes do solo e proteção à planta hospedeira. Esta proteção é caracterizada pela maior tolerância a estresses bióticos, como barreira física ao estabelecimento de patógenos, e a estresses abióticos, tais como déficit hídrico, acidez do solo e tolerância a metais pesados.

No caso dos metais pesados, o fungo proporciona à planta hospedeira uma maior tolerância, devido à mobilização no sistema de absorção no plasmalema, destoxificação intracelular nos tecidos fúngicos, alterações no pH, além da redução da exposição aos metais pela excreção de substâncias quelantes, as quais indisponibilizam a absorção destes metais pelas plantas, permitindo que estas sobrevivam em solos, mesmo com altas concentrações de metais pesados (BELLION et al., 2006).

Segundo Khan et al. (2000), algumas espécies vegetais da família Pinaceae, quando em associação simbiótica com fECM dos gêneros *Amanita*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* e *Suillus* não são influenciadas negativamente pela presença de cobre no solo, dentro de certos limites.

Alguns estudos demonstram que a presença do manto fúngico sobre as raízes da planta hospedeira não altera o deslocamento dos metais presentes na solução do solo até a superfície das raízes, mas impede sua translocação para o interior das plantas (SMITH; READ, 2008). A capacidade dos fECM reterem metais, indisponibilizando-os para as plantas, pode ser demonstrada pela alta concentração de metais em corpos de frutificação de fungos associados com plantas em solos contaminados, sendo esta concentração muitas vezes superior à encontrada nos tecidos da planta hospedeira (GRAZZIOTTI et al., 2003; BELLION et al., 2006). Este resultado pode ser facilmente demonstrado quando comparamos o desenvolvimento de plantas inoculadas ou não inoculadas com fungos ectomicorrízicos, seja a campo ou em condições controladas, em solos com elevadas concentrações de metais pesados.

A associação micorrízica beneficia o crescimento e desenvolvimento de plantas em solos contaminados por metais pesados, reduzindo a translocação destes elementos para a parte aérea, conferindo maior tolerância das plantas a estes elementos (SMITH; READ, 2008). Esta habilidade ocorre devido a mecanismos que incluem processos externos às hifas, ligação a polímeros da parede celular e processos internos nas células dos fungos, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006).

Dentre os diversos mecanismos de tolerância dos fECM a metais pesados, pode-se citar: quelação extracelular e na parede celular, complexação intracelular por peptídeos, mecanismos de transporte envolvendo a tolerância de metais, mecanismos antioxidativos, compartimentalização, ligação por grânulos de polifosfato e ligações por metalotioneínas (BELLION et al., 2006). Esses mecanismos baseiam-se em ações como sorção no micélio externo, retenção de elementos no manto fúngico, redução da mobilidade apoplástica, exsudação de substâncias complexantes e quelantes e/ou fenômenos de hidrofobicidade fúngica. Além destes, no interior das células, podem ocorrer os mecanismos de quelação e compartimentalização do metal.

A quelação extracelular está relacionada com a adsorção de elementos tóxicos (metais pesados) externamente à planta hospedeira, na parede celular do manto fúngico. Este processo ocorre devido à excreção pelo fungo de moléculas orgânicas, principalmente ácidos di e tri-carboxílicos, os quais formam quelatos com

os íons metálicos (BELLION et al., 2006; NEHLS et al., 2010). No entanto, este mecanismo não é o único responsável pela formação de uma barreira à entrada de metais nos tecidos das plantas hospedeiras. Outro mecanismo que apresenta relação direta com a quelação extracelular é a ligação de metais pesados por melaninas fúngicas, fenômeno este que explica o fato de fungos pigmentados apresentarem maior tolerância a metais pesados.

O mecanismo de complexação intracelular por peptídeos é influenciado pela presença de metalotioneínas, que são uma classe de proteínas de baixo peso molecular, envolvidas na homeostase de elementos essenciais e na retenção natural de metais tóxicos (BELLION et al., 2006).

Outra grande contribuição dos fungos micorrízicos ao estabelecimento de plantas em solos contendo grandes concentrações de metais pesados são os mecanismos de transporte, os quais facilitam a difusão catiônica do cobre, evitando sua entrada nos tecidos radiculares das plantas. Quando o cobre é absorvido pelas raízes, provoca alterações no tecido radicular, interferindo na expansão do sistema radicular e na absorção dos nutrientes pelas plantas (BELLION et al., 2006). Conseqüentemente, plantas com baixo volume radicular apresentam menor capacidade de exploração do solo para absorver os elementos essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, gerando plantas com menor porte. Neste sentido, a presença de associações micorrízicas nas raízes de plantas presentes em áreas com elevadas concentrações de metais pesados, favorece o desenvolvimento do sistema radicular das plantas, permitindo que estas desenvolvam-se de forma satisfatória e com mínimos danos à sua estrutura.

A compartimentalização de metais pesados, devido à ligação por grânulos de polifosfatos, embora seja um mecanismo não aceito por alguns pesquisadores, envolve o acúmulo de metais pesados no vacúolo dos fECM associados às plantas. Este acúmulo se dá pelas ligações metálicas ocorridas entre polifosfatos e os metais absorvidos pelo manto fúngico, os quais formam grânulos indisponíveis às plantas (BELLION et al., 2006).

Além dos benefícios que os fECM proporcionam às plantas, os quais já foram descritos anteriormente, quando em simbiose com o vegetal, os fungos produzem fitormônios (ácido indol acético – AIA, e alguns compostos derivados de auxinas) em resposta à produção de compostos fenólicos liberados pelas raízes da planta no momento da infecção. Estes fitormônios são excretados na micorrizosfera, ficando

biodisponíveis para as plantas e apresentam efeito indireto importante para o crescimento vegetal (SMITH; READ, 2008).

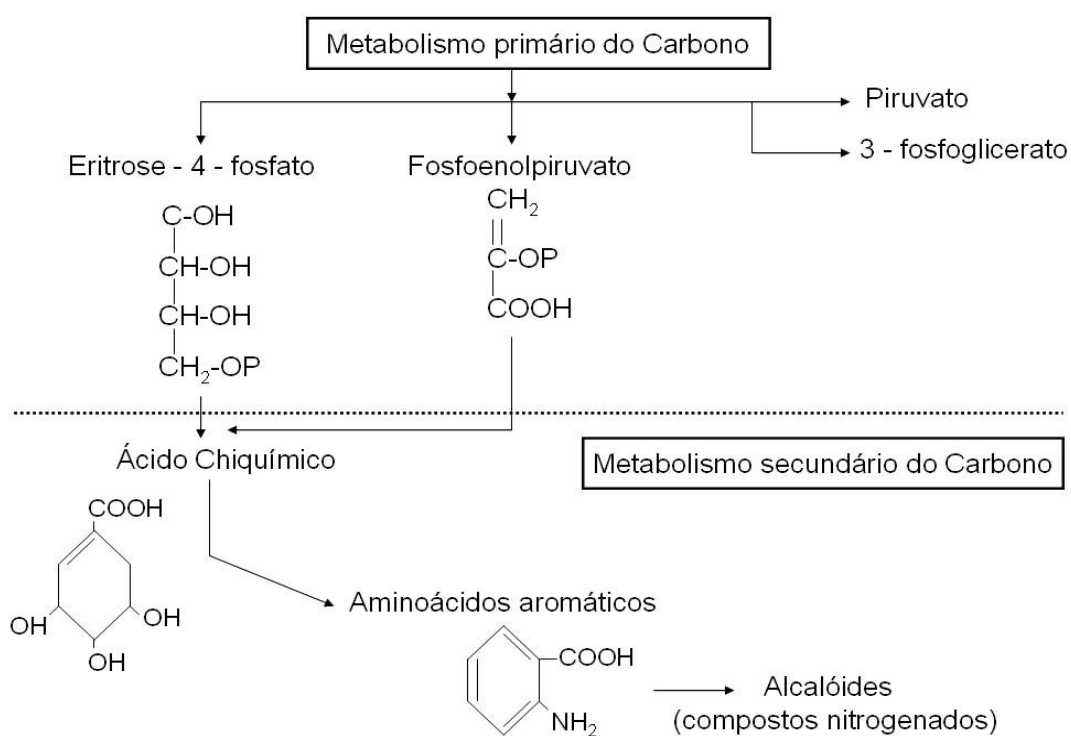
Outro fator fisiológico resultante da simbiose micorrízica está relacionado à diminuição ou ausência de proteínas extracelulares específicas produzidas pelo sistema radicular em resposta à presença de metais pesados. Em plantas não micorrizadas, estas proteínas desencadeiam estresses oxidativos prejudiciais à elongação radicular e ao crescimento vegetal (KHAN, 2006).

A tolerância dos fECM à presença de metais pesados é limitada a uma faixa de concentração que pode variar entre os diferentes gêneros, espécies e isolados ectomicorrízicos. Por este motivo, torna-se necessário realizar uma seleção de isolados fúngicos a serem utilizados em cada situação a ser estudada, visando a otimização dos benefícios proporcionados pelo estabelecimento da associação micorrízica.

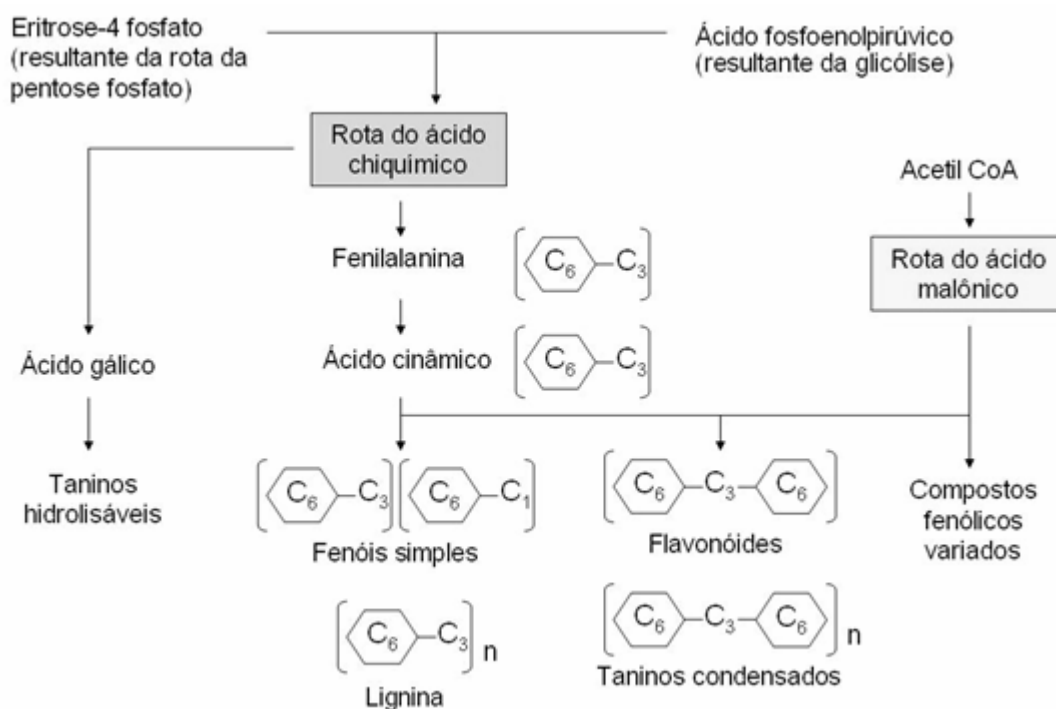
## **2.9 Óleos essenciais**

O conhecimento sobre a possibilidade de concentração dos componentes responsáveis pelo aroma das plantas é antigo. No ano de 1592, já eram conhecidos cerca de sessenta óleos essenciais diferentes (ALLINGER et al., 1978). Atualmente, no Brasil, aproximadamente 500 mil hectares estão sendo cultivados permanentemente com plantas que apresentam compostos de interesse comercial para extração de óleos essenciais (SIMIONATTO, 2004).

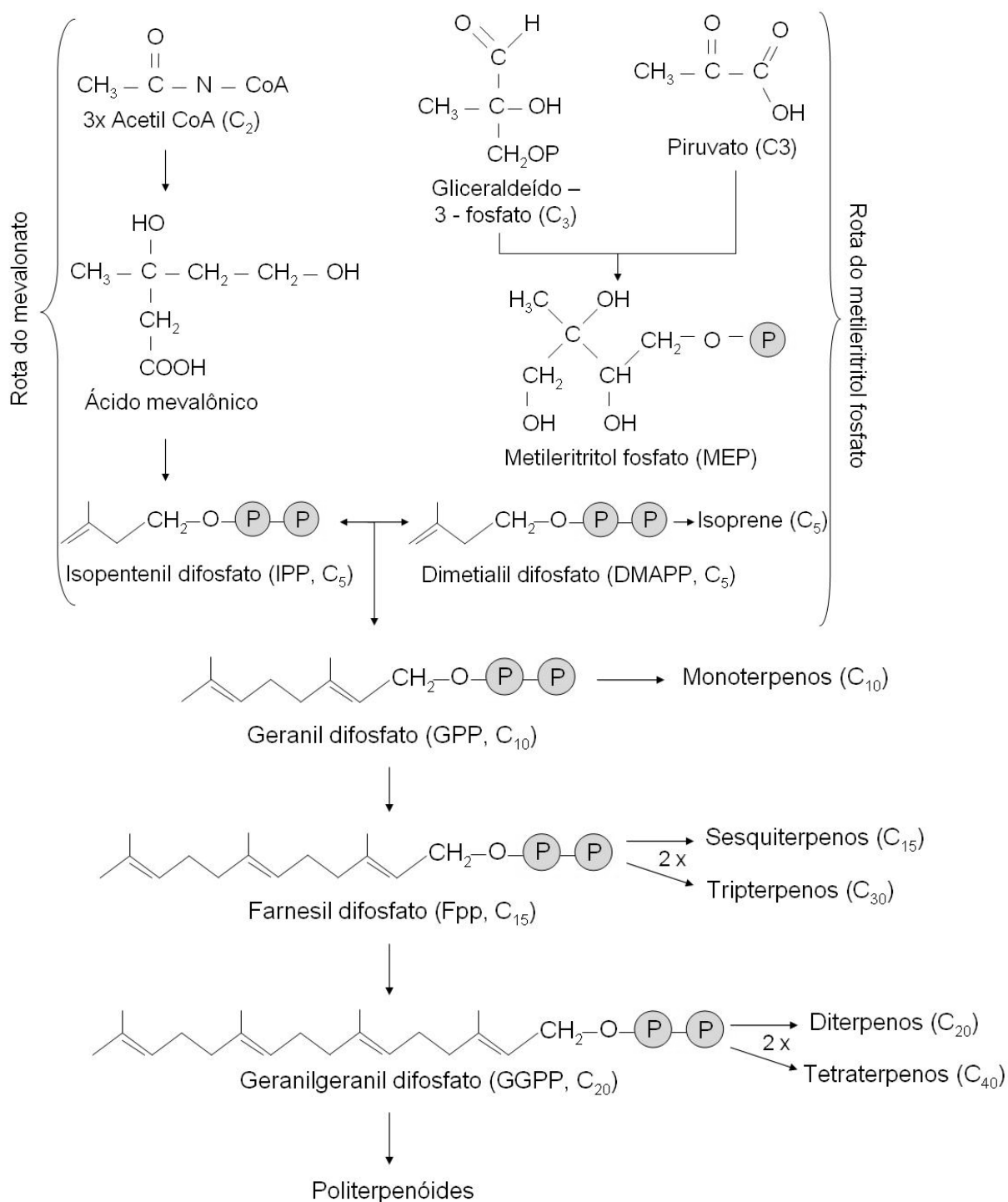
Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais não apresentam função direta em processos como a fotossíntese, respiração, translocação e transporte de solutos ou a síntese de proteínas e carboidratos (ZIEGLER; FACCHINI, 2008). Diferentemente dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e acil-lipídeos), os quais estão distribuídos no reino vegetal, os metabólitos secundários são específicos, ou seja, cada espécie vegetal pode apresentar composição diferenciada. Estes metabólitos podem ser divididos em três grupos: compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos (Figuras 2.3, 2.4 e 2.5).



**Figura 2.3** - Representação das rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos nitrogenados pelas plantas. (Adaptado de TAIZ; ZEIGER, 2004).



**Figura 2.4** - Representação das rotas metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos pelas plantas. (Adaptado de TAIZ; ZEIGER, 2004).



**Figura 2.5** - Representação das rotas metabólicas envolvidas na síntese de terpenos pelas plantas. (Adaptado de TAIZ; ZEIGER, 2004).

Estes compostos apresentam como principais funções a adaptabilidade dos vegetais às condições do meio, defesa contra insetos oportunistas e fitopatógenos, ao frio e ao déficit hídrico (SILVA, 2000; VITTI; BRITO, 2003; SANTOS, 2004), além de atuarem na atração de insetos polinizadores (FABROWSKI, 2002; THOLL, 2006).

Os óleos essenciais apresentam na sua estrutura química básica, elementos como carbono, oxigênio e hidrogênio, de difícil classificação química devido à interação de moléculas orgânicas como hidrocarbonetos. A grande maioria dos óleos essenciais deriva de unidades de isopreno, formando a chamada “Regra Biogenética do Isopreno” (SIMIONATTO, 2004).

Os terpenóides, com ênfase aos monoterpenos (fórmula geral  $C_{10}H_{16}$ ) e os sesquiterpenos (fórmula geral  $C_{15}H_{24}$ ) derivados das formas oxigenadas dos grupos como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis entre outras (SERAFINI et al., 2001; MOYNA et al., 2002), são constituintes dos óleos essenciais, atuando em diversas funções no metabolismo vegetal, sendo encontrados em hormônios, pigmentos fotossintéticos, componentes estruturais de membrana e carreadores de elétrons (HARBORNE, 1991), estando envolvidos nas interações entre plantas e microrganismos (SIMIONATTO, 2004) e apresentando função de interação e adaptabilidade da planta ao ambiente em que se encontram (MATOS, 2004).

Os metabólitos secundários, óleos essenciais, compostos etanólicos ou essências vegetais, são compostos de origem natural, conceituados como compostos de origem biológica que podem ser específicos de um único organismo ou comum a um grupo de organismos (SALGADO; CAMPOS, 2003). Estes óleos podem ser definidos como sendo os elementos voláteis contidos em vários órgãos da planta (SERAFINI et al., 2001), insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, contendo um número elevado de componentes individuais pertencentes a diferentes classes de grupos funcionais sintetizados no metabolismo secundário das plantas (SILVA, 2000; MOYNA et al., 2002).

Devido ao crescente número de trabalhos voltados à utilização de insumos biologicamente ativos na agricultura, aliado ao desenvolvimento e uso de técnicas de extração, purificação e identificação de compostos presentes em extratos vegetais, novas linhas de pesquisa estão demonstrando o efeito benéfico da utilização de metabólitos secundários de plantas bioativas nas mais variadas áreas do conhecimento. Na tabela 2.1, são listados alguns trabalhos que demonstram o



efeito de diferentes óleos essenciais na inibição ou no estímulo de microrganismos e vegetais.

**Tabela 2.1** - Exemplificação de trabalhos utilizando óleos essenciais de diferentes plantas no controle ou no estímulo do desenvolvimento de patógenos e plantas.

<b>Objetivo</b>	<b>Óleo essencial extraído de</b>	<b>Referência</b>	
Controle de fungos	<i>Achyrocline satureoides</i>	Rozwalka et al. (2008)	
	<i>Articum lappa</i>	Rozwalka et al. (2008)	
	<i>Calendula officinalis</i>	Rozwalka et al. (2008)	
	<i>Corymbia citriodora</i>	Medice et al. (2007)	
	<i>Cymbopogon nardus</i>	Medice et al. (2007)	
	<i>Cryptomeria japonica</i>	Cheng et al. (2005)	
	<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Wang et al. (2005)	
	<i>Eucalyptus</i> spp.	Martan et al. (2009)	
		García et al. (2009)	
		Salgado et al. (2003)	
		<i>Eucalyptus globulus</i>	Miyamoto et al. (2009)
		<i>Hibiscus cannabinus</i>	Kobainy et al. (2001)
		<i>Laurelia sempervirens</i>	Bittner et al. (2009)
		<i>Laureliopsis philippiana</i>	Bittner et al. (2009)
		<i>Mentha piperita</i>	Martan et al. (2009)
		<i>Moringa oleifera</i>	Chuang et al. (2007)
		<i>Ocimum basilicum</i>	Lopez-Reyes et al. (2010)
		<i>Origanum majorana</i>	Lopez-Reyes et al. (2010)
		<i>Origanum vulgare</i>	Lopez-Reyes et al. (2010)
		<i>Pantago australis</i>	Rozwalka et al. (2008)
		<i>Peumus boldus</i>	Bittner et al. (2009)
		<i>Piper aduncum</i>	Bastos e Albuquerque (2004)
		<i>Piper dilatatum</i>	Silva e Bastos (2007)
			Bastos e Albuquerque (2004)
		<i>Piper encke</i>	Silva e Bastos (2007)
		<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rozwalka et al. (2008)
		<i>Salvia officinalis</i>	Bouaziz et al. (2009)
		Lopez-Reyes et al. (2010)	
	<i>Thymus vulgaris</i>	Kumar et al. (2008)	
Controle de insetos praga	<i>Achillea millefolium</i>	Castro et al. (2006)	
	<i>Allium sativum</i>	Park e Shin (2005)	
	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Tavares e Vendramim (2005)	
	<i>Eucalyptus</i> spp.	Chagas et al. (2002)	
	<i>Origanum majorana</i>	Isman (2000)	
	<i>Piper aduncum</i>	Estrela et al. (2006)	
		Fazolin et al. (2007)	
	<i>Piper hispidinervum</i>	Estrela et al. (2006)	
		Fazolin et al. (2007)	
	<i>Psidium guajava</i>	Lima et al. (2009)	

Tabela 2.1 - Continuação...

Objetivo	Óleo essencial extraído de	Referência	
Controle de insetos praga (continuação)	<i>Tagetes minuta</i>	Cestari et al. (2004)	
	<i>Tagetes patula</i>	Restello et al. (2009)	
	<i>Tanaecium nocturnum</i>	Fazolín et al. (2007)	
	<i>Thymus vulgaris</i>	Castro et al. (2006)	
Controle de vírus	<i>Eucalyptus globulus</i>	Astani et al. (2010)	
Controle de bactérias	<i>Corymbia citriodora</i>	Araújo et al. (2004)	
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	López et al. (2007)	
	<i>Cymbopogon citratus</i>	Pereira et al. (2004)	
		Pereira et al. (2008)	
		Araújo et al. (2004)	
		Wannissorn et al. (2005)	
		<i>Melampodium aricatum</i>	Pelissari et al. (2010)
		<i>Ocimum basilicum</i>	Wannissorn et al. (2005)
		<i>Origanum minutiflorum</i>	Baydar et al. (2004)
		<i>Origanum vulgare</i>	Burt e Reinders (2003)
			Lambert et al. (2001)
			López et al. (2007)
			Rojas-Graü et al. (2007)
			Friedman et al. (2002)
Bioherbicida	<i>Piper nigrum</i>	Dorman e Deans (2000)	
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Celiktas et al. (2007)	
	<i>Ruta graveolens</i>	Araújo et al. (2004)	
	<i>Salvia officinalis</i>	Bouaziz et al. (2009)	
	<i>Syzygium aromaticum</i>	Pereira et al. (2008)	
	<i>Thymus vulgaris</i>	Marzouk et al. (2009)	
	<i>Ageratum conyzoides</i>	Singh et al. (2002)	
	<i>Aristolochia esperanzae</i>	Gatti et al. (2004)	
	<i>Artemisia scoparia</i>	Singh et al. (2009)	
	<i>Cymbopogon citratus</i>	Dudai et al. (1999)	
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Batish et al. (2004)		
<i>Lavandula angustifolia</i>	Zanellato et al. (2009)		
<i>Mikania laevigata</i>	Baratto et al. (2008)		
<i>Ruta graveolens</i>	De Feo (2002)		
Produção de fitoalexinas	<i>Cymbopogon nardus</i>	Franzener et al. (2007)	
		Moreira et al. (2008)	
	<i>Eucalyptus citriodora</i>	Bonaldo et al. (2004)	
	Bonaldo et al. (2007)		
	<i>Helietta apiculata</i>	Franzener et al. (2007)	
	<i>Ocimum gratissimum</i>	Colpas et al. (2009)	
Controle de fitonematóides	<i>Cymbopogon citratus</i>	Steffen et al. (2008)	
		Oka et al. (2000)	

Tabela 2.1 - Continuação...

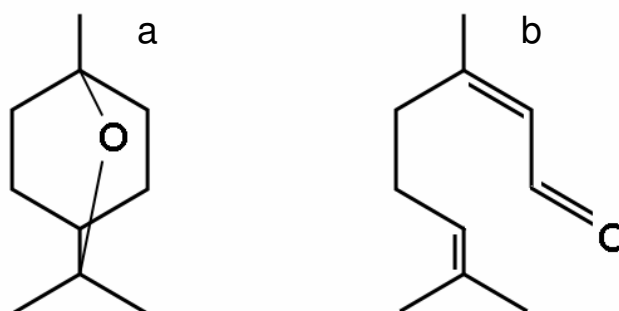
Objetivo	Óleo essencial extraído de	Referência
Controle de fitonematóides (continuação)	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Salgado et al. (2003)
	<i>Eucalyptus saligna</i>	Salgado (2001) Salgado et al. (2003)
	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Salgado et al. (2003)
	<i>Foeniculum vulgare</i>	Steffen et al. (2008) Oka et al. (2000)
	<i>Lavandula angustifolia</i>	Steffen et al. (2008)
	<i>Mentha piperita</i>	Oka et al. (2000) Bosenbecker (2006) Steffen et al. (2008)
	<i>Origanum vulgare</i>	Steffen et al. (2008)
	<i>Ocimum basilicum</i>	Lopes et al. (2005) Steffen et al. (2008)
	<i>Piper nigrum</i>	Dorman e Deans (2000)
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Steffen et al. (2008)
Atração de insetos	<i>Haploppapus berterii</i>	Urzúa et al. (2007)
	<i>Lavandula angustifolia</i>	Cook et al. (2007) Biswas et al. (2009)
	<i>Leptospermum scoparium</i>	Hanula e Sullivan (2008)
	<i>Phoebe porosa</i>	Hanula e Sullivan (2008)
	<i>Rhododendron hybrids</i>	Robacker (2007)
Bioestímulo vegetal	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Katerinopoulos et al. (2005)
	<i>Eucalyptus dives</i>	Delasquis et al. (2002)
	<i>Pilocarpus microphyllus</i>	Alves et al. (2004)
Bioestímulo microbiano	<i>Artemisia annua</i>	Wang et al. (2006)
	<i>Cichorium intybus</i>	Bais et al. (2000)
	<i>Lotus japonicus</i>	Akiyama et al. (2005)
	<i>Mentha piperita</i>	Mucciarelli et al. (2005)

## 2.10 Óleo essencial de *Eucalyptus* spp.

Atualmente, das áreas reflorestadas no Brasil, cerca de 75% destinam-se à produção de madeira para consumo industrial, dentre as quais as espécies do gênero *Eucalyptus* correspondem a 62% das essências florestais utilizadas (BRDE, 2004; GARAY et al., 2004). Além da produção de madeira, celulose e carvão, algumas áreas florestadas com espécies do gênero *Eucalyptus* estão sendo

destinadas à extração e comercialização do óleo essencial (SILVA et al., 2006), sendo este o óleo de maior volume de extração no Brasil (GREEN, 2002), colocando o País em posição de destaque quanto ao volume e à qualidade do óleo produzido (MAFFEIS et al., 2000).

Dentre os componentes presentes nos óleos essenciais das plantas do gênero *Eucalyptus*, encontram-se o 1,8-Cineol ou eucaliptol e o citronelal (Figura 2.6) como os de concentrações majoritárias (CHALCHAT et al., 1997).



**Figura 2.6** - Fórmula estrutural dos compostos 1,8 Cineol ou eucaliptol (a) e Citronelal (b) encontrados em maiores concentrações nos óleos essenciais de espécies florestais do gênero *Eucalyptus*. (Adaptado de BARANSKA et al., 2005; SANDI; BLANCO, 2007).

Além destes compostos, encontram-se também compostos como o citral, timol, felandreno, piperitona,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, limoneno, cetonas, compostos flavônicos e dos ácidos butírico, isobutírico, cumínico, quínico, hidrociânico, isovalérico e gálico (PHARMACOPÉE EUROPÉE, 1997; BALACS, 1997; ESTANISLAU et al., 2001; FABROWSKI, 2002; BARANSKA et al., 2005; SANDI; BLANCO, 2007; LUCIA et al., 2007).

Embora existam trabalhos mostrando as possíveis variações quanto ao rendimento da extração dos óleos essenciais das plantas de *Eucalyptus* spp. em relação a condições climáticas, fertilidade do solo e estresses bióticos (SILVA et al., 2006), Maffeis et al. (2000) e Costa et al. (2008) demonstraram que estes fatores não afetam significativamente a porcentagem dos constituintes presentes nos óleos essenciais.

Apesar da utilização do extrato ou do óleo essencial de plantas de eucalipto poder causar efeito antagonista a determinadas espécies de microrganismos (BATISH et al., 2008) e resultar em alelopatia a determinadas espécies vegetais (CRUZ et al., 2000; FERREIRA; AQUILA, 2000; GOETZE; THOMÉ, 2004), dependendo da concentração de determinados compostos podem ocorrer relações

de sinergismo, proporcionando a indução do crescimento de microrganismos ou plantas (BLUM, 1999; MAIRESSE, 2005).

Alguns compostos vegetais, devido à sua alta concentração, quando utilizados em concentrações extremamente reduzidas, podem apresentar efeito Hormese (MAIRESSE, 2005). Segundo Forbes (2000), este efeito se caracteriza pela indução de determinadas características provocada pela utilização de baixas concentrações de compostos considerados tóxicos. Baseados nesta característica, alguns trabalhos demonstram atividade destes óleos na bioestimulação do desenvolvimento microbiano (TSAI et al., 1991; MARTINS et al., 2000) e de algumas espécies vegetais (ALVES et al., 2004; BONALDO et al., 2007). Entretanto, não há relatos na literatura mostrando o efeito da aplicação do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. na bioestimulação do crescimento de fECM e de essências florestais.

### **2.11 Utilização do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. na agricultura**

Com a crescente preocupação voltada à toxicidade inerente à utilização massiva de insumos agrícolas sintéticos, estudos estão sendo concentrados na utilização de extratos vegetais como agentes biologicamente ativos na proteção de plantas (SANDI; BLANCO, 2007), visando a prática de uma agricultura mais limpa através do uso de bioestimuladores do crescimento vegetal (FREITAS et al., 2004) e de insumos naturais biologicamente ativos contra fitopatógenos (COSTA et al., 2000; CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; LOPES et al., 2005).

Dentre os vegetais estudados, plantas do gênero *Eucalyptus* se destacam devido à comprovada eficácia de seus compostos. Neste contexto, estudos demonstraram que alguns compostos secundários presentes nos óleos essenciais podem apresentar funções importantes nas interações entre patógenos e plantas, sendo potencialmente úteis no manejo de plantas cultivadas (ISMAN, 2000; SIMIONATTO, 2004; MATOS, 2004), devido à ação antimicrobiana direta destes óleos em concentrações elevadas ou pela ativação de mecanismos de defesa latentes nas plantas (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997; SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; BONALDO et al., 2004).

A utilização de óleos essenciais, compostos etanólicos ou essências vegetais, tem sido frequentemente relatada na literatura como uma alternativa no controle de fitonematóides, principalmente do gênero *Meloidogyne* (LORIMER et al., 1996; OKA

et al., 2000; LOPES et al., 2005; BOSENBECKER, 2006; STEFFEN, 2007), no controle de fungos fitopatogênicos das espécies do gênero *Fusarium* Link ex Fr. (SANTOS et al., 2001a; SALGADO, 2001), *Rhizoctonia solani* Kuhn., *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. e *Phytophthora capsici* Leonian. (MÜLLER-RIEBAU et al., 1995), *Colletotrichum musae* Berk. (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004), *Aspergillus parasiticus* Thom et Church (BULLERMAN et al., 1977), *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. (MEDICE et al., 2007) e *Crinipellis pernicioso* Stahel (SILVA; BASTOS, 2007), de algumas bactérias de interesse agrícola (NEWSHAM et al., 1995), apresentando também propriedades úteis no controle de alguns insetos praga (RYAN; BYRNE, 1988; ISMAN, 2000; ANSARI et al., 2000).

Em estudos sobre as atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas do *Eucalyptus citriodora* em plantas de soja e sorgo, Bonaldo et al. (2007) observaram um alto potencial do *E. citriodora* na proteção de plantas, tanto pelo controle direto de fitopatógenos, agindo no crescimento micelial e na germinação dos esporos, como pelo controle indireto através da ativação de mecanismos de defesa nas plantas estudadas.

O efeito dos óleos essenciais sobre a eclosão e o desenvolvimento de fitonematóides do gênero *Meloidogyne* tem sido comprovado na literatura especializada (ISMAN, 2000; OKA et al., 2000), sendo a eficiência de utilização dos óleos dependente tanto da espécie de *Eucalyptus* utilizada como da espécie de nematóide estudada. Steffen et al. (2008), em estudo quanto ao efeito nematicida do óleo essencial de *E. globulus* sobre *M. graminicola*, observaram mortalidade de 84,83%. Já Salgado et al. (2003) utilizando os óleos essenciais de *E. saligna*, *E. camaldulensis* e *E. urophylla*, encontraram mortalidade de 100; 91,7 e 89,4%, respectivamente, sobre o fitonematóide *M. exigua*.

No combate a mosquitos vetores de doenças ao homem, Cheng et al. (2008) observaram que o óleo essencial de *E. camaldulensis* mostrou-se potencialmente eficaz no combate às larvas de *Aedes aegypti* e *A. albopictus*. Nathan (2007) estudando o efeito do óleo essencial de *E. tereticornis* como agente larvicida sobre o mosquito *Anopheles stephensi*, causador da malária, verificou que na concentração de 160  $\mu\text{L L}^{-1}$ , o óleo essencial provocou 100% de mortalidade das larvas.

Liu et al. (2008) estudando os efeitos alelopáticos dos óleos essenciais de *E. grandis* e *E. urophylla* sobre insetos praga e fungos fitopatogênicos, verificaram que a utilização de emulsões dos referidos óleos inibiram o desenvolvimento dos insetos

*Spodopteralitura fabricius* e *Helicoverpa armigera* e controlaram a proliferação dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Pyricularie grisea*, *Glorosprium musa* e *Phytophthora capsici*.

Em estudos quanto ao efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp., Chagas et al. (2002) observaram que o óleo essencial de *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* proporcionaram mortalidade de 100% sobre a espécie *Boophilus microplus* a uma concentração de 17,5%, 15% e 12,5% respectivamente. Os autores atribuíram este efeito à ação dos compostos 1,8-Cineol e ao citronelal presentes nos referidos óleos.

No acondicionamento e armazenamento de grãos, Prates et al. (1997) verificaram que o óleo essencial de *E. globulus* foi eficaz no controle de 76% das pragas causadoras de danos.

## **2.12 Função dos metabólitos secundários na associação e estabilização ectomicorrízica**

A rizosfera é uma zona de grande diversidade de microrganismos devido à liberação de exudatos radiculares, os quais beneficiam o desenvolvimento microbiano (SULLIVAN, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Segundo Mulder et al. (2005), a interação entre microrganismos e plantas é estabelecida a partir do reconhecimento, por parte dos microrganismos, de compostos excretados pelas raízes, os quais funcionam como sinais específicos ocorrentes em determinadas condições ambientais. Estes sinais podem ocorrer através de compostos e substratos simples de baixo peso molecular como açúcares, compostos fenólicos, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos metabólicos como proteínas e mucilagens (SULLIVAN, 2004; AKIYAMA et al., 2005).

Segundo Moreira e Siqueira (2006) e Duponnois et al. (2008), na micorrizosfera, termo utilizado para descrever a região onde ocorrem as associações entre os fungos e o sistema radicular das plantas, ocorre vários processos que influenciam não somente a interação fungo-planta, mas o balanço nutricional e a estabilização dos ecossistemas microbianos.

De acordo com Souza et al. (2006) e Smith e Read (2008), o processo de formação das ectomicorrizas é determinado por fenômenos de reconhecimento e compatibilidade entre a planta e o inóculo micorrízico. Segundo os autores, antes da

formação da simbiose, o fungo micorrízico deve resistir aos mecanismos de defesa da planta para poder iniciar o processo de transferência de compostos orgânicos e de nutrientes. Caso determinado fungo não apresente a capacidade de suportar a presença de determinados compostos provenientes do metabolismo secundário da planta hospedeira, este não formará associação com o sistema radicular da planta (FEUGEY et al., 1999).

O estabelecimento da simbiose entre fungos do solo e as raízes das plantas envolve modificações bioquímicas e estruturais tanto do fungo como do sistema radicular da planta (SMITH; READ, 2008). Bioquimicamente, o contato fungo-raiz provoca alterações quantitativas na produção e no acúmulo de polipeptídeos pela planta, regulação de atividades enzimáticas e biossíntese de proteínas estruturais (GARBAYE, 1990; LAMBAIS, 1996; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SMITH; READ, 2008).

As alterações estruturais do fungo envolvem desde a formação de propágulos no solo, estabelecimento do contato na superfície da raiz pelas hifas do fungo, formação do manto sobre as raízes e da rede de Hartig no córtex radicular e desenvolvimento de um denso emaranhado de hifas no solo, aumentando significativamente a capacidade de absorção das raízes, tanto de água como de nutrientes. Segundo Siqueira e Franco (1988) e Souza et al. (2006), dependendo das condições fisiológicas da planta e de fatores ambientais, o processo de micorrização poderá acompanhar o crescimento e desenvolvimento das raízes, colonizando os segmentos radiculares novos.

Embora os óleos essenciais estejam relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000; OLUMA; GARBA, 2004), alguns trabalhos descrevem que os efeitos aleloquímicos dos compostos fenólicos podem assumir duas formas de ação, inibindo determinado organismo (SCHAWN-ESTRADA et al., 2003; MEDICE et al., 2007) ou estimulando seu desenvolvimento, dependendo da concentração de uso e da interação entre os compostos (SIQUEIRA et al., 1991; TSAI et al., 1991; MARTINS et al., 2000).

Os exudatos radiculares podem tanto estimular como inibir populações microbianas e sua atividade (BRIMECOMBE et al., 2001). Segundo Souza et al. (2006), a formação da simbiose fungo-planta depende de forma direta das condições biológicas dos exudatos radiculares e das condições físico-químicas da rizosfera.



A formação de ectomicorrizas requer, além de energia, de alguns componentes precursores para germinação dos esporos, crescimento inicial das hifas e estabilização da associação (CAMPOS et al., 2008). Muito embora alguns compostos fenólicos estejam associados a mecanismos de defesa da planta contra o ataque de patógenos, funcionando como indutores de resistência (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997) e atuando na inibição direta ao crescimento micelial, fixação de apressórios e na germinação dos esporos fúngicos (STANGARLIN et al., 1999; FIORI et al., 2000), algumas plantas hospedeiras e formadoras de simbiose com fECM estimulam a produção destes compostos como sinais bioquímicos favoráveis ao quimiotropismo para determinados fungos (MARTIN; TAGU, 1995; BAPTISTA et al., 1999; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Devido à seletividade dos isolados ectomicorrízicos em formar associação com determinadas espécies vegetais, pressupõe-se que um determinado fungo apresente dependência à presença de compostos específicos e se desenvolva de forma ideal apenas no sistema radicular de plantas que sintetizem e disponibilizem estes compostos preferenciais ao fungo.

Um exemplo da função dos compostos fenólicos na simbiose micorrízica é o observado na relação existente entre a disponibilidade de fósforo no solo e a formação e estabilização da simbiose micorrízica (OLIVEIRA; GIACHINI, 1999; SILVA et al., 2003b; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SATTER et al., 2007; SMITH; READ, 2008) sendo que, quanto maior for a deficiência de fósforo na planta, maior é a probabilidade do fungo se associar às raízes.

Esta relação entre associação micorrízica e o teor de fósforo na planta está fundamentada na exudação de compostos fenólicos pelas raízes, os quais atuam como sinalizadores bioquímicos e estabilizadores da simbiose ectomicorrízica (MARTIN et al., 1997; BARKER et al., 1998; AARLE; PLASSARD, 2010). De acordo com Neumann e Römheld (2001), a composição dos exudatos radiculares pode ser alterada de acordo com o estado nutricional e fisiológico da planta. Segundo os autores, a deficiência de fósforo no tecido vegetal estimula a liberação de compostos fenólicos pelas células do sistema radicular, estabelecendo-se assim a relação inversa entre condição nutricional fosfatada e simbiose micorrízica.

Em estudos quanto à ação antimicrobiana dos óleos essenciais, Janssen (1989) descreveu reações variáveis, ora observando antagonismo, ora sinergismo. Delasquis et al. (2002) em estudos quanto à atividade antimicrobiana do óleo

essencial de *Eucalyptus dives*, encontraram resultados semelhantes, observando que tanto utilizando-se o óleo essencial, na sua forma total, como fracionado, a sua atividade antimicrobiana era variável. Segundo Janssen (1989), estes efeitos podem ser resultantes da interação entre componentes dos óleos essenciais e o organismo por ele afetado.

Na literatura especializada, poucos são os trabalhos que relacionam fungos micorrízicos com compostos fenólicos, sendo que os existentes utilizaram a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares visando aumentos na produção e qualidade de óleo essencial em determinadas plantas (SIQUEIRA et al., 1991; TSAI et al., 1991; MARTINS et al., 2000; FREITAS et al., 2004; KAPOOR et al., 2004; COPETTA et al., 2006; KHAOSSAD et al., 2006; FORTUNATO; AVATO, 2008). Desta forma, partindo-se do conhecimento sobre as interações estabelecidas na simbiose entre fungos micorrízicos e o sistema radicular de determinadas plantas e do conceito sobre a síntese e constituição das essências vegetais, fazem-se inferências sobre a dependência da assimilação destes compostos pelo fungo a fim da manutenção da mutualidade do sistema, bem como da possibilidade de determinados isolados ectomicorrízicos maximizarem seu desenvolvimento quando houver a presença de compostos específicos produzidos naturalmente pelas plantas.

Atualmente no Brasil, os trabalhos referentes à associação ectomicorrízica são realizados por poucos grupos de pesquisa, os quais focam seus estudos na diversidade, no isolamento e na seleção de fECM (GIACHINI et al., 2000, 2004; MEIJER, 2001, 2006; MELLO et al., 2006; SOUZA et al., 2008), identificação morfológica e molecular de isolados ectomicorrízicos (MALVAREZ; OLIVEIRA, 2003; LUPATINI et al., 2008), simbiose entre isolados ectomicorrízicos e espécies florestais (SILVA et al., 2003a, 2003b; ANDREAZZA et al., 2004; SOUZA et al., 2004; ANDREAZZA et al., 2008), tolerância de isolados ectomicorrízicos a ambientes contaminados (GRAZZIOTTI et al., 2001a; 2001b, 2003; SOARES; SIQUEIRA, 2008) e produção de inoculantes ectomicorrízicos (ALVES et al., 2001; ROSSI et al., 2002, 2007), não apresentando atualmente trabalhos quanto à utilização de compostos orgânicos e/ou essências vegetais no desenvolvimento micelial de isolados ectomicorrízicos.

Pela revisão realizada, observa-se que estudos sobre alternativas biologicamente ativas no estímulo ao desenvolvimento miceliano *in vitro* e na

maximização da colonização ectomicorrízica em mudas de eucalipto são relevantes para a ampliação e o aperfeiçoamento de programas de micorrização, visando aumentar a sobrevivência das mudas florestais após o transplante no campo e, conseqüentemente, a produção final de madeira e subprodutos.

## 2.13 Referências bibliográficas

AARLE, I. M. V.; PLASSARD, C. Spatial distribution of phosphatase activity associated with ectomycorrhizal plants is related to soil type. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 42, n. 2, p. 324-330, february 2010.

ABREU, C. A. de et al. Comparação de métodos de análise para avaliar a disponibilidade de metais pesados em solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 19, n. 3, p. 463-468, 1995.

AFUBRA; SINDIFUMO. **Preservar o meio ambiente é compromisso de todos: Manual de reflorestamento**. Santa Cruz do Sul: Ed. Afubra e Sindifumo. 2001. 20 p. (Boletim Técnico, 20).

AGGANGAN, N. S.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Geoderma**, Tucson, v. 84, n. 1-3, p. 15-27, june 1998.

AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, p. 824–827, june 2005.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. John Wiley & Sons: New York, 1996, 869p.

ALLEN, E. B. et al. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, n. 1, p. 47-62, march 1995.

ALLINGER, N. L. et al. **Química Orgânica**. 2 ed. Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1978.

ALVES, M. da C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p.1083-1086, novembro 2004.

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

AMEZCUA-ALLIERI, M. A.; LEAD, J. R.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Impact of microbial activity on copper, lead and nickel mobilization during the bioremediation of soil PAHs. **Chemosphere**, Atlanta, v. 61, n. 4, p. 484–491, october 2005.

ANDRADE, W. F. de; ALMEIDA, M. de; GONÇALVES, A. N. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, dezembro 2006.

ANDREAZZA, R. et al. Avaliação de mudas de Eucalipto inoculadas com fungos ectomicorrízicos em solo arenoso. In: XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. **Anais...** CD, 2003.

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. 51-59, dezembro 2004.

ANDREAZZA, R. et al. Ocorrência de associação micorrízica em seis essências florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 339-346, julho/setembro 2008.

ANSARI, M. A. et al. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, Arkansas, v. 71, n. 1, p. 267-271, february 2000.

ANTONIOLLI, Z. I.; KAMINSKI, J. Micorrizas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 2, n. 3, p. 441-455, 1991.

ARAÚJO, J. C. L. V. de et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 33, n. 1, p. 55-64, janeiro/junho 2004.

ARRUDA, R. et al. Composição e fenologia de espécies herbáceas nativas em reflorestamento heterogêneo. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 3, p. 525-533, julho/setembro 2009.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZER, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 24, n. 5, p. 673-679, may 2010.

BAENA, E. de S. A sustentabilidade econômica da cultura do eucalipto e sua contribuição ao agronegócio brasileiro. **Conhecimento Interativo**, São José dos Pinhais, v. 1, n. 1, p. 3-9, 2005.

BAENA, E. de S.; GLOVACK, C. H. M. A contribuição do setor econômico florestal na redução do aquecimento global. **1º Congresso de Iniciação Científica Unicespi**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2007.

BAIS, H. P.; GOVINDASWAMY, S.; RAVISHANKAR, G. A. Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, n. 6, p. 648-653, september 2000.

BALACS, T. Cineole-rich eucalyptus. **International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 15-21, june 1997.

BAPTISTA, M. J. et al. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, outubro 1999.

BARANSKA, M. et al. Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of *Eucalyptus* essential oils. **Biopolymers**, Hoboken, v. 78, n. 5, p. 237-248, april 2005.

BARATTO, L. et al. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 577-582, outubro/dezembro 2008.

BARBOSA, L. M. et al. Recuperação florestal com espécies nativas no Estado de São Paulo: pesquisas apontam mudanças necessárias. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 6, n. 14, p. 28-34, janeiro 2003.

BARKER, S. J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, Illinois, v.116, n. 4, p. 1201-1207, april 1998.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 555-557, september/october 2004.

BATISH, D. R. et al. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, Washington, v. 23, n. 12, p. 1209-1214, december 2004.

BATISH, D. R. et al. *Eucalyptus* essential oil as nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, Melbourne, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, december 2008.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Reading, v. 15, n. 3, p. 169-172, april 2004.

BELL, R.; EVANS, C. S.; ROBERTS, E. R. Decreased incidence of micorrhizal root tips associated with soil heavy-metal enrichment. **Plant and Soil**, Dordrecht, n. 106, n. 1, p. 143-145, february 1988.

BELLEI, M.; CARVALHO, M. S. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1992.

BELLION, M. et al. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 254, n. 2, p. 173-181, january 2006.

BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. Micronutrientes. In: BISSANI, C. A.; GIANELLO, C.; TEDESCO, M. J.; CAMARGO, F. A. O. (eds.). **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004, 328p.

BISWAS, K. K. et al. Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 31, n. 1, p. 13-19, january 2009.

BITTNER, M. et al. Fungistatic activity of essential oil extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz e Pav.) Tul. (Chilean Monimiaceae). **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 69, n. 1, p. 30-37, january/march 2009.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 123-134, march/april 2004.

BONALDO, S. M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopatológica**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.

BOSENBECKER, V. K. **Efeitos de óleos essenciais de plantas bioativas no controle de *Phytophthora infestans* e *Meloidogyne javanica* em batata (*Solanum tuberosum* L.)**. 2006, 65f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

BOUAZIZ, M. et al. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**, Richmond, v. 47, n. 11, p. 2755-2760, november 2009.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris – soil bioassays: some reflections. Pp.17-23. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology: Allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, 589p.

BRACELPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Relatório estatístico 2007/2008**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/estatisticas>>. Acesso em: 12 mar. 2009.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soils**. 13 ed. Upper Saddle River, New Jersey, 2002, 960p.

BRDE, Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. **Gerência de planejamento Programa de suprimento florestal para a cadeia produtiva da madeira**. 2004. 35p.

BRIMECOMBE, M. J.; LEIJ, F. A. de; LYNCH, J. M. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. Ed. Marcel Dekker, New York, 2001. 424p.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Canberra, ACIAR, 1996. 374p.

BRUNNER, I. Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zürich, v. 4, n. 1, p. 13-27, june 2001.



BRUNS, T. D. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, n. 1, p. 63-73, march 1995.

BULLERMAN, L. B.; LIEU, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, Lincoln, v. 42, n. 4, p. 1107-1109, july 1977.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Cardiff, v. 36, n. 3, p. 162-167, march 2003.

BUSCOT, F. et al. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, Lausanne, v. 24, n. 5, p. 601-614, december 2000.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.

CAMPOS, A. N. da R. et al. Total lipid and fatty acid accumulation during basidiospore formation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp.. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 1531-1540, julho/agosto 2008.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1443-1452, dezembro 2001.

CARRERA-NIEVA, A.; LÓPEZ-RÍOS, G. F. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. **Revista Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, Chapingo, v. 10, n. 2, p. 93-98, agosto 2004.

CARVALHO, N. M. et al. Maturação fisiológica de sementes de amendoim-do-campo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 23-28, 1980.

CARVALHO, P. E. R. Espécies alternativas para o reflorestamento e o seu futuro industrial nos estados do Sul do Brasil. **Anais...** In: SIMPÓSIO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 5.; SIMADER – RS, 1., Santa Maria, 1998. p. 21-28.

CASTRO, D. P. et al. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CÁZARES, B. X.; MEDRANO, R. R. Impacto de la biotecnología agrícola em cultivos: el caso de las micorrizas. **Avance y Perspectiva**, México, v. 21, p. 263-266, septiembre/octubre 2002.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, Reading, v. 100, n. 2, p. 553-559, january 2007.

CESTARI, I. M. et al. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 805-807, novembro/dezembro 2004.

CHAGAS, A. C. de S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, september/october 2002.

CHALCAT, J. C. et al. Aromatic plants of Rwanda. II. Chemical composition of essential oils of ten *Eucalyptus* species growing in Ruhande Arboretum, Butare, Rwanda. **Journal of Essential Oil Research**, Messina, v. 9, n. 2, p. 159-165, march/april 1997.

CHENG, S. S. et al. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 100, n. 1, p. 452-456, january 2009.

CHENG, S. S.; LIN, H. Y.; CHANG, S. T. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from different tissues of japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Minnesota, v. 53, n. 3, p. 614-619, february 2005.

COLPAS, F. T. et al. Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopatológica**, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 191-195, july/september 2009.

COOK, S. M. et al. Responses of *Phradis parasitoids* to volatiles of lavender, *Lavendula angustifolia* – a possible repellent for their host, *Meligethes aeneus*. **BioControl**, Dordrecht, v. 52, n. 5, p. 591-598, october 2007.

COPETTA, A.; LINGUA, G.; BERTA, G. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilium* L. var. Genovese. **Mycorrhiza**, Dijon Cedex, v. 16, n. 7, p. 485-494, october 2006.

COSTA, L. C. do B. et al. Tipos e doses de adubação orgânica no crescimento, no rendimento e na composição química do óleo essencial de elixir paregórico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2173-2180, novembro 2008.

CRUZ, M. E. da S.; NOZAKI, M. de H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 15, p. 28-34, julho/agosto 2000.

CHUANG, P. H. et al. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 98, n. 1, p. 232-236, january 2007.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, Egham, v. 61, n. 5, p. 573-578, november 2002.

DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Food Microbiology**, Summit-Argo, v. 74, n. 1-2, p. 101-109, march 2002.

DOELMAM, P. Resistance of soil microbial to heavy metals. In: JENSEN, U. KJOLLER, A.; SORENSEN, L. H. (Ed.) **Microbial communities in soil**. New York, E. A. S., p. 369-385, 1986.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 88, n. 2, p. 308-316, february 2000.

DUDAI, N. et al. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 25, n. 5, p. 1573-1561, may 1999.

DUPONNOIS, R.; GALIANA, A.; PRIN, Y. The mycorrhizosphere effect: a multitrophic interaction complex improves mycorrhizal symbioses and plant growth. In: SIDDIQUI, Z. A.; MOHD, S. A.; KAZUYOSHI, F. (ed.) **Mycorrhizal: sustainable agriculture and forestry**. Springer Science + Business Media, Aligarh, 2008. 359p.

ECCLES, H. Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 17, n. 12, p. 462-465, december 1999.

EMBRAPA. Embrapa Florestas. **Dedicação à pesquisa florestal**. Colombo, 2003, 54p.

ESTANISLAU, A. A. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 95-100, julho/dezembro 2001.

ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 217-222, fevereiro 2006.

FABROWSKI, F. J. ***Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 2002, 225f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FADIGAS, F. de S. et al. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos Brasileiros. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 151-159, maio/agosto 2002.

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, janeiro/fevereiro 2007.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, n. 12 (Edição Especial), p. 175-204, 2000.

FERREIRA, R. A. et al. Espécies arbóreas para recuperação de ecossistemas florestais. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 271-279, julho/setembro 2007.

FENG, G. et al. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 12, n. 4, p. 185–190, august 2002.

FEUGEY, L. et al. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. **New Phytologist**, Lancaster, v. 144, n. 3, p. 541-547, march 1999.

FINGER, C. A. G. et al. Crescimento diamétrico do pau-ferro (*Astronium balansae*) em reflorestamento no município de São Sepé, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 6, n. 1, p.101-108, novembro 1996.

FINLAY, R. D. The fungi in soil. In: ELSAS, J. D. V.; JANSSON, J.; TREVORS, J. T. **Modern soil microbiology**. CRC Press, 2. ed. 2006. 646p.

FIORI, A. C. G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 148, n. 7-8, p. 483-487, august 2000.

FONSECA, C. E. L da et al. Recuperação da vegetação de matas de galeria: estudos de caso no Distrito Federal e entorno. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L. da; SOUZA-SILVA, J. C. (Eds.). **Caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2001. p.815-870.

FORBES, V. E. Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology**, Amherst, v. 14, n. 1, p. 12-24, february 2000.

FORTUNATO, I. M.; AVATO, P. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) letsvaart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 93, n. 2, p. 139-149, may 2008.

FOUNOUNE, H.; DUPONNOIS, R.; BÂ, A. M. Ectomycorrhization of *Acacia mangium*, Willd. and *Acacia holosericea*, A. Cunn ex G. Don in Senegal. Impact on plant growth, populations of indigenous symbiotic microorganisms and plant parasitic nematodes. **Journal of Arid Environments**, Chubut, v. 50, n. 2, p. 325–332, february 2002.

FRANK, B. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. **Berichte der Deutschen Botanischer Gesellschaft**, Berlin, v. 3, p. 128-145, 1985.

FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, janeiro/março 2007.

FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; VIEIRA, I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 887-894, setembro 2004.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, Tennessee, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, october 2002.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, Tucson, v. 112, n. 2-4, p. 109-119, october 2004.

GARAY, I. et al. Evaluation of soil conditions in fast-growing plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in Brazil: a contribution to the study of sustainable land use. **Applied Soil Ecology**, Belfield, v. 27, n. 2, p. 177-187, october 2004.

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

GARCÍA, C. et al. Bioxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, Delft, v. 59, n. 1-3, p. 171-176, july 2009.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. de A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 459-472, julho/setembro 2004.

GIACHINI, A. J. et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**, Corvallis, v. 92, n. 6, p. 1166-1177, novembro/dezembro 2000.

GIACHINI, A. J.; SOUZA, L. A. B.; OLIVEIRA, V. L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 14, n. 6, p. 375-381, december 2004.

GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 43-50, janeiro/março 2004.

GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bonn, v. 223, n. 6, p. 1115-1122, may 2006.

GRAVILESCU, M. Removal of heavy metal from the environment by biosorption. **Engineering in Life Sciences**, Dresden, v. 4, n. 3, p. 219-232, june 2004.

GRAZZIOTTI, P. H. et al. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 839-848, julho/agosto 2001a.

GRAZZIOTTI, P. H. et al. Efeito de Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 831-837, julho/agosto 2001b.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso de metais pesados. In: CURTI, N. et al. (Eds.) **Tópicos em Ciência do Solo**. v. I, Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. 430p.

GREEN, C. L. **Export development of essential oils and spices by Cambodia**. C. L. Green Consultancy Services, Kent, UK, 2002. 27p.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, Brasília, 2005. 388p.

HAMMERSCHMIDT, R.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC-Lewis Publishers, 1997. p.177-199.

HANULA, J. L.; SULLIVAN, B. Manuka oil and phoebe oil are attractive baits for *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Scolytinae), the vector of Laurel wilt. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 37, n. 6, p. 1403-1409, december 2008.

HARALAMBOS, E.; KATERINOPOULOS, G. P.; ATHANASIOS, A.; STRATIGAKIS, N.; RODITAKIS, N. Composition and insect attracting activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 31, n. 1, p. 111-122, january 2005.

HARBORNE, J. B. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In: **Ecological Chemistry and Biochemistry of plant Terpenoids**. Ed. Oxford: Clarendon Press. 1991. p.399-426.

HOEFLICH, V. A.; SCHAITZA, E. G.; MATTOS, P. P. **Pesquisa florestal no Brasil: uma visão preliminar**. Instituto de Pesquisas Florestais, 2000. <http://www.ipef.com.br>. Acesso em jan. 2008.

HOBBIE, E. A. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. **Ecology**, Davis, v. 87, n. 3, p. 563-569, march 2006.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Washington, v. 19, n. 8-10, p. 603-608, september 2000.

JANSSEN, A. M. **Antimicrobial activities of essential oils – a pharmacognostical study**. 1989, 181f. Ph. D. Thesis, State University of Leiden, The Netherlands, 1989.

JEFFRIES, P.; RHODES, L. H. Use of mycorrhizae in agriculture. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 5, n. 4, p. 319-357, 1987.

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, setembro 2002.

KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. de A. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. **IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais)**, Piracicaba, n. 41-42, p. 83-93, janeiro/dezembro 1989.

KAPOOR, R.; GIRI, B.; MUKERJI, K. G. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 93, n. 3, p. 307-311, july 2004.



KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 7, n. 7, p. 503-514, July 2006.

KHAOSSAD, T. et al. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oil in Oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). **Mycorrhiza**, Dijon Cedex, v. 16, n. 6, p. 443-446, September 2006.

KOBAISY, M. et al. Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3768-3771, August 2001.

KUMAR, A. et al. Select a website below to get this article. **Innovative Food Science & Emerging Technology**, Berlin, v. 9, n. 4, p. 575-580, October 2008.

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

LAMBERT, R. J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 91, n. 3, p. 453-462, September 2001.

LEONHARDT, C. et al. Morfologia e desenvolvimento de plântulas de 29 espécies arbóreas nativas da área da Bacia Hidrográfica do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 5-14, Janeiro/Junho 2008.

LIMA, R. K. et al. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1777 -1781, 2009.

LIU, X. et al. Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. **Frontiers of Forestry in China**, Beijing, v. 3, n. 2, p. 232-236, June 2008.

LOPEZ-REYES, J. G. et al. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. **Flavour and Fragrance Journal**, Savigliano, v. 25, n. 3, p. 171 – 177, March 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368p.

LORIMER, S. D. et al. A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. **Journal of Agricultural of the Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2842-2845, september 1996.

LOPES, E. A. et al. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 67-74, june 2005.

LÓPEZ, P. et al. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 11, p. 4348-4356, may 2007.

LUCIA, A. et al. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Mount Laurel, v. 23, n. 3, p. 299-303, september 2007.

LUPATINI, M. et al. Mycorrhizal morphotyping and molecular characterization of *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira, an ectomycorrhizal fungus from *Eucalyptus*. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 18, n. 8, p. 437-442, october 2008.

MAFIA, R. G. et al. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843-851, novembro/dezembro 2005.

MAFFEIS, A. R.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; BRITO, J. O. Reflexos das deficiências de macronutrientes e boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 87-98, junho 2000.

MAIRESSE, L. A. da S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005, 340f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, Witherslack, v. 30, n. 2, p. 261-278, april 2004.

MALVÁREZ, G.; OLIVEIRA, V. L. A PCR-RFLP technique to characterize fungal species in *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden ectomycorrhizas. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 13, n. 2, p. 101-105, april 2003.

MARTIN, F.; TAGU, D. Ectomycorrhiza development: a molecular perspective. In: HOCK, B.; VARMA, A. K. (Eds.). **Mycorrhiza: Function, molecular biology and biotechnology**. Berlin: Sprenger-Verlag. 1995. 638p.

MANTOVANI, A. **Composição química de solos contaminados por cobre: sorção e efeito no desenvolvimento de espécies vegetais**. 2009, 178f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MARTIN, F.; LAPEYRIE, F.; TAGU, D. Altered gene expression during ectomycorrhizal development. In: LEMKE, P.; CAROLL, G. (Eds.) **Plant Relationships**. Springer-Verlag, Berlin, 1997.

MARTIN, F.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Mycorrhizal fungi: a fungal community at the interface between soil and roots. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at soil-plant interface**. Ed. Marcel Dekker, New York, 2001. 424p.

MARTINS, M. A.; GONÇALVES, G. F. de; SOARES, A. C. F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1465-1471, july 2000.

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

MARZOUK, B. et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of a new chemotype of tunisian *Thymus vulgaris* oils growing in Sayad. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 7, n. 2, p. 263-267, 2009.

MATAN, N. et al. Durability of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) treated with peppermint oil, eucalyptus oil, and their main components. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v. 63, n. 5, p. 621-625, July 2009.

MATOS, O. C. de. Substâncias naturais de origem vegetal com actividade biocida: seu uso na protecção das culturas. **IIR Portugal Lisboa**, 2004. 14p.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, janeiro/fevereiro 2007.

MEIJER, A. A. R. de. Mycological work in the Brazilian State of Paraná. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 72, n. 1-2, p.105-159, February 2001.

MEIJER, A. A. R. de. Preliminary list of the Macromycetes from the Brazilian State of Paraná. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, Curitiba, v. 68, p. 01-58, 2006.

MELLO, A. H. de et al. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 293-301, julho/setembro 2006.

MENDONÇA, M. M.; OLIVEIRA, V. L. Micorrizas no Brasil: estado atual das pesquisas e prioridades. In: ALVAREZ, V.; FONTES, L. E. F.; FONTES, M. P. F. (Eds.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, 1996. p. 525-549.

MIYAMOTO, C. T. et al. Genotoxic activity of *Eucalyptus globulus* essential oil in *Aspergillus nidulans* diploid cells. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 54, n. 6, p. 493-498, November 2009.

MOCHIUTTI, S.; HIGA, A. R.; SIMON, A. A. Fitossociologia dos estratos arbóreo e de regeneração natural em um povoamento de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de wild.) na região da floresta estacional semidecidual do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 207-222, abril/junho 2008.

MOLINA, M. L.; LEDESMA, L. M.; MEDINA, M. S. Importância del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias**, Medellín, v. 18, n. 2, p. 162-175, junio 2005.

MOREIRA, C. G. A. et al. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 332-337, outubro/dezembro 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ªEd. Editora UFLA. 2006, 729p.

MOYNA, P.; DELLACASA, E.; MENÉNDEZ, P. Técnicas analíticas aplicadas aos óleos essenciais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002, 433p.

MUCCIARELLI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, Lancaster, v. 158, n. 3, p. 579–591, june 2003.

MULDER, L. et al. Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 123, n. 2, p. 207-218, 2005.

MÜLLER-RIEBAU, F.; BERGER, B.; YEGEN, O. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 43, n. 8, p. 2262-2266, august 1995.

NASSIF, S. M. L.; PEREZ, S. C. J. G. de A. Germinação de sementes de amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* Tul. – Fabaceae – Caesalpinoideae) submetidas a diferentes condições de estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 19, n. 2, p. 142–149, dezembro 1997.

NATHAN, S. S. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 98, n. 9, p. 1856-1860, july 2007.

NEHLS, U. et al. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. **Plant Biology**, Freiburg, v. 12, n. 2, p. 292-301, march 2010.

NEUMANN, G.; ROMHELD, V. The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The rhizosphere**: Biochemistry and organic substances at soil-plant interface. Ed. Marcel Dekker, New York, 2001. 424p.

NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 407-411, october 1995.

OLIVEIRA, V. L.; GIACHINI, A. J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. UFLA: Lavras, 1999. 818p.

OLUMA, H. O. A.; GARBA, I. U. Screening of *Eucalyptus globulus* and *Ocimum gratissimum* against *Pythium aphanidermatum*. **Nigerian Journal of Plant Protection**, v. 21, p. 109-114, 2004.

OKA, Y. et al. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Nematology**, Antibes, v. 90, n. 7, p. 710-715, july 2000.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G. de; SIQUEIRA, J. O. Efeito da aplicação de Cádmiu sobre o teor de nutrientes em mudas de Cedro (*Cedrella fissilis* Vell.). **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 153-162, dezembro 2001.

PARK, I. K.; SHIN, S. C. Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the papnese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 53, n. 11, p. 4388-4392, abril 2005.

PEREIRA, R. S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 326-328, abril 2004.

PEREIRA, A. de A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/junho 2008.

PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 496-501, december 1997.

PELLISSARI, G. P.; PIETRO, R. C. L. R.; MOREIRA, R. R. D. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 70-74, janeiro/março 2010.

PERRY, D. A. et al. Species migrations and ecosystem stability during climate change: the belowground connection. **Conservation Biology**, Santa Barbara, v. 4, n. 3, p. 266-274, september 1990.

PHARMACOPÉE **Européene**. 3.ed. Strasbourg: Conseil de l'Europe, 1997.

PRATES, H. T. et al. Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre as pragas *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 16, 1997, Salvador, BA. Resumo... p. 303.

RAMALHO, J. F. G.; SOBRINHO, N. M. B. do A.; VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1289-1303, julho 2000.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 304-307, junho 2009.

RIBEIRO FILHO, M. R. et al. Metais pesados em solos de área de rejeito de indústria de processamento de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 453-464, 1999.

ROBACKER, D. C. Attractiveness to *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) of plant essential oil and a synthetic food-odour lure. **Journal of Applied Entomology**, Goettingen, v. 131, n. 3, p. 202-208, april 2007.

ROCHA, M. E. do N.; SANTOS, C. L. dos. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill – Myrtaceae. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 23-34, julho/dezembro 2007.

ROJAS, E. P.; SIQUEIRA, J. O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 103-114, janeiro 2000.

ROJAS-GRAÜ, M. A. et al. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate – apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 81, n. 3, p. 634-641, august 2007.

ROSSI, M. J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V. L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 59, n. 2-3, p. 175-181, July 2002.

ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift***. 2006, 188f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ROSSI, M. J.; FURIGO JUNIOR, A.; OLIVEIRA, V. L. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 45, n. 3, p. 277-286, September 2007.

ROZWALKA, L. C. et al. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p. 301-307, 2008.

RÜHLING, A.; SÖDERSTRÖM, B. Changes in fruitbody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. **Water, Air, & Soil Pollution**, Guelph, v. 49, n. 3-4, p. 375-387, February 1990.

RYAN, M. F.; BYRNE, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 14, n. 10, p. 1965-1975, October 1988.

SALGADO, A. P. S. **Estudo dos constituintes químicos e da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus***. 2001, 52f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobiotecnologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SALGADO, S. M. L. et al. Ecloração e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua* em óleos essenciais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, n. 1, p. 17-22, junho 2003.

SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, V. P. Extratos naturais na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro e de *Meloidogyne incognita* raça 3 em feijoeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, n. 1, p. 41-48, junho 2003.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris*



*sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, março/abril 2003.

SANDI, J. T.; BLANCO, R. F. Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, (Coleoptera: Curculionidae), **Revista de Biologia e Saúde da UNISEP**, Dois Vizinhos, v. 1, n. 1-2, p. 93-100, 2007.

SANTARELLI, E. G. Produção de mudas de espécies nativas. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. (Eds.). **Matas ciliares**: conservação e recuperação. 3.ed. São Paulo: Edusp/Fapesp, 2004. p. 313-318.

SANTOS, M. P. et al. Eficiência "in vitro" de óleos essenciais no controle de *Fusarium subglutinans* f. Sp. ananas agente etiológico do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 335, 2001a.

SANTOS, V. L. dos et al. Vesicular-arbuscular / ecto-mycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 81-86, abril/june 2001b.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacologia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 1102p.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; VERALDO, F. Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 1-5, janeiro/fevereiro 2002.

SCHAWN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: SBF, 2003. p. 54-56.

SCHROEDER, M. Cobertura florestal do Rio Grande do Sul: Tendências e Perspectivas. In: SEMINÁRIO SOBRE A SITUAÇÃO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 1., 1991, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1991, p.1-9.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463p.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.

SERRA, M. M. et al. **Manual de truficultura andaluza**. Ed. Fundación Gypaetus, 2007. 176p.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, março/abril 2007.

SILVA, R. A. **Avaliação de extratos vegetais na inibição “in vitro” de fungos fitopatogênicos**. 2000, 44f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agroindústria) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SILVA, R. F. **População de fungos micorrizicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliotti* em solo arenoso**. 2002, 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

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

SILVA, R. F. da et al. Fungos ectomicorrizicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 9-17, setembro/dezembro, 2003b.

SILVA, P. H. M. da; BRITO, J. O.; SILVA JUNIOR, F. G. da. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, n.1, p. 85-89, janeiro/fevereiro 2006.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, março/abril 2007.

SILVA, R. F. da et al. Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) inoculada com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 147-156, janeiro/março 2010.

SIMIONATTO, E. **Estudo dos constituintes químicos de óleos voláteis de plantas medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação e modificação estrutural e atividade biológica**. 2004, 193f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3ª ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787p.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Allelopathic effect of two volatile monoterpenes against bill goat weed (*Ageratum conyzoides* L.). **Crop Protection**, Washington, v. 21, n. 4, p. 347-350, may 2002.

SINGH, H. P. et al. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 35, n. 2, p. 154-162, february 2009.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE, 1988. 236p.

SIQUEIRA, J. O. et al. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.

SIQUI, A. C. et al. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 16, p. 38-43, setembro/outubro 2000.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3ª ed., San Diego, Academic Press, 2008. 787p.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v. 44, n. 6, p. 833-841, july 2008.

SOARES, C. R. F. S. et al. Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 213-225, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008. **Silviculture-se**. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

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

SOUZA, V. C. de et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612–618, julho/setembro 2006.

SOUZA, L. A. B. de et al. Novos isolados de fungos ectomicorrízicos e o crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 235-241, fevereiro 2008.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 11, p. 16- 21, novembro/dezembro 1999.

STEFFEN, R. B. **Caracterização, controle alternativo e reprodução de *Meloidogyne graminicola* em cultivares de arroz irrigado submetidos a diferentes regimes de umidade**. 2007, 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

STEFFEN, R. B. et al. Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 2, p. 127-135, junho 2008.

SULLIVAN, T. **Interactions between soil microbial communities and plant roots: A minireview**. Soil and Crop Sciences, Colorado State University (USA), 2004. 16p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719p.

TAVARES, M. A. G. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 34, n. 2, p. 319-323, march/april 2005.

TAYLOR, R. J. Plants, fungi and beetles: A fire-dependent co-evolutionary relationship. **Austral Ecology**, Adelaide, v. 16, n. 3, p. 409-411, september 1991.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, Corvallis, v. 9, n. 3, p. 297-304, june 2006.

TOGORO, A. H. et al. **Reflorestamento ciliar com espécies nativas ao reservatório de Furnas**. Anais I Seminário de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Paraíba do Sul: o Eucalipto e o Ciclo Hidrológico, Taubaté, Brasil, 07-09 novembro 2007, IPABHi, p. 191-197.

TRAPPE, J. M.; FOGEL, R. D. Ecosystematic functions of mycorrhizae. In: MARSHALL, J. K. (Ed.). *The belowground ecosystem: A synthesis of plant-associated processes*. **Rang Science** Department Science Series, v. 26, Colorado State University (USA), 1977. 351p.

TREVISAN, R. et al. Efeito da intensidade de desbaste nas características dendrométricas e tecnológicas da madeira de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 377-387, outubro/dezembro 2007.

TSAI, S. M.; PHILLIPS, D. A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores "in vitro". **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1485-1488, may 1991.

TWISS, M. R. et al. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. **Chemical Speciation and Bioavailability**, Chicago, v. 13, n. 1, p. 9-24, february 2001.

URZÚA, A. et al. Secondary metabolites in the flower heads of *Haplopappus berterii* (Asteraceae) and its relation with insect-attracting mechanisms. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, v. 52, n. 2, p. 1142-1144, june 2007.

VIANI, R. A. G.; RODRIGUES, R. R. Sobrevivência em viveiro de mudas de espécies nativas retiradas da regeneração natural de remanescente florestal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1067-1075, agosto 2007.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

WANG, S. Y.; CHEN, P. F.; CHANG, S. T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves

against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 96, n. 7, p. 813-818, may 2005.

WANG, J. W.; ZHENG, L. P.; TAN, R. X; The preparation of an elicitor from a fungal endophyte to enhance artemisinin production in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Chinese Journal of Biotechnology**, Beijing, v. 22, n. 5, p. 829–834, september 2006.

WANNISSORN, B. et al. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, Novara, v. 76, n. 2, p. 233-236, march 2005.

WHIPPS, J. M. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 82, n. 8, p. 1198–1227, august 2004.

ZABOWSKI, D.; ZASOSKI, R. J. Cadmium, copper, and zinc adsorption by a forest soil in the presence of sludge leachate. **Water, Air, & Soil Pollution**, Guelph, v. 36, n. 1-2, p. 103-113, november 1987.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi “in vitro”. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 144, n. 9-10, p. 491-494, november 1996.

ZANELLATO, M. et al. The essential oils in agriculture as an alternative strategy to herbicides: a case study. **International Journal of Environment and Health**, Roma, v. 3, n. 2, p. 198-213, 2009.

ZEPPA, S. et al. *Tilia platyphyllos* Scop.-*Tuber brumale* Vittad. vs. *T. platyphyllos* Scop.- *T. borchii* Vittad. ectomycorrhizal systems: a comparison of structural and functional traits. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 7, p. 709-716, july 2005.

ZIEGLER, J.; FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 735-769, june 2008.

ZUCHIWSCHI, E. et al. Limitações ao uso de espécies florestais nativas pode contribuir com a erosão do conhecimento ecológico tradicional e local de agricultores familiares. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 270-282, janeiro/março 2010.

### 3 Capítulo I

#### Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador do crescimento de fungos ectomicorrízicos *in vitro*

##### 3.1 Resumo

Os metabólitos secundários extraídos de essências florestais conhecidamente micossimbiontes podem estimular o crescimento de isolados ectomicorrízicos *in vitro*. Assim, determinou-se o efeito de concentrações do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* no estímulo ao crescimento dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24 e UFSC Pt 188), *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), *Chondrogaster angustiporus* (UFSC Ch 163), *Scleroderma citrinum* (UFSC Sc 124) e *Suillus* sp. (UFSM RA 2.2 e UFSM RA 2.8) em meio de cultura líquido. Após o período de 25 dias de incubação, avaliou-se a morfologia e o crescimento dos isolados. A adição do óleo essencial nas concentrações de 20 a 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  promoveu crescimento miceliano *in vitro* nos isolados UFSC Pt 24, UFSC Pt 116, UFSC Ch 163, UFSC Sc 124, UFSM RA 2.2 e UFSM RA 2.8. A adição do óleo essencial na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  resultou em aumento no diâmetro e na ramificação das hifas dos isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24. A utilização de óleo essencial na elaboração de meios de cultura para o crescimento de isolados ectomicorrízicos mostra-se eficiente, por aumentar a produção de massa micelial do fungo.

**Palavras-chave:** Crescimento miceliano; metabólitos secundários; produção de inóculo.

### 3.2 Introdução

Nas últimas décadas, o interesse pela utilização dos fungos ectomicorrízicos inoculados a espécies florestais se intensificou devido aos benefícios que estes proporcionam às plantas (SMITH; READ, 2008). A inoculação ectomicorrízica torna possível o estabelecimento de espécies florestais em solos que apresentam condições sub ótimas de disponibilidade de nutrientes, ou mesmo com presença de poluentes (OLIVEIRA; GIACHINI, 1999; BRUNNER, 2001; ROSSI et al., 2002; ANDREAZZA et al., 2004; SOUZA et al., 2006). No entanto, a micorrização controlada de essências florestais exige não somente a seleção de espécies fúngicas eficientes em formar simbiose com a planta (OLIVEIRA; GIACHINI, 1999; ROSSI et al., 2002), mas a multiplicação em larga escala destes isolados fúngicos, possibilitando a inoculação adequada das mudas florestais.

Segundo Brady e Weil (2002) e Pera e Parladé (2005), as micorrizas são consideradas a simbiose de maior expressão ecológica e econômica entre fungos do solo e raízes de plantas superiores. Os fungos ectomicorrízicos, além de estarem envolvidos na ciclagem de nutrientes em ecossistemas arbóreos (HÖGBERG; HÖGBERG, 2002; HOBBIÉ, 2006; COURTY et al., 2010) desempenham funções fundamentais no estabelecimento e na manutenção de comunidades florestais (SMITH, READ, 2008).

Na simbiose mutualística ocorre uma micotrofia, onde os fungos além de proporcionar ao hospedeiro maior absorção de água e nutrientes minerais essenciais ao seu desenvolvimento, conferem às raízes maior tolerância a estresses bióticos e abióticos (ZEPPA et al., 2005; SMITH; READ, 2008). Em contrapartida, a planta libera na forma de exudatos radiculares, alguns fotossintatos, compostos orgânicos e aminoácidos, beneficiando o desenvolvimento miceliano e a manutenção da simbiose (ANTONIOLLI; KAMINSKI, 1991; ZEPPA et al., 2005; SOUZA et al., 2006; SMITH; READ, 2008; NEHLS et al., 2010).

Durante a formação da simbiose ectomicorrízica, ocorrem algumas alterações fisiológicas na planta hospedeira, que irão determinar a compatibilidade ou não com o fungo. Estas alterações compreendem desde modificações morfológicas nas raízes até a formação e deposição de exudatos radiculares e compostos fenólicos, dependendo do isolado ectomicorrízico utilizado (BAPTISTA et al., 1999; SMITH; READ, 2008).



Segundo Mulder et al. (2005), a interação entre microrganismos e plantas é estabelecida a partir do reconhecimento, por parte dos microrganismos, de compostos excretados pelas raízes, os quais funcionam como sinais específicos ocorrentes em determinadas condições ambientais. De acordo com Sullivan (2004) e Akiyama et al. (2005), estes sinais podem ocorrer através de compostos e substratos simples, como açúcares, compostos fenólicos, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos metabólicos como proteínas e mucilagens.

Os compostos fenólicos ou essências vegetais são compostos de origem natural, que podem ser obtidos pela hidrodestilação de tecidos vegetais, recebendo a denominação de óleos essenciais (SALGADO; CAMPOS, 2003), os quais estão envolvidos nas interações entre plantas e microrganismos (SIMIONATTO, 2004), atuando na adaptabilidade da planta ao ambiente em que se encontram (MATOS, 2004). Atualmente, a utilização de metabólitos secundários, devido às propriedades encontradas nos terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos presentes nestes compostos, representa uma alternativa biotecnológica no manejo de microrganismos patogênicos ou simbioses do solo (LUDLEY et al., 2009; BÂ et al., 2010).

Embora os metabólitos secundários ou óleos essenciais estejam relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência da planta, exercendo papel fundamental na defesa do vegetal contra a ação de microrganismos (SIQUI et al., 2000; OLUMA; GARBA, 2004; DEL GIUDICE et al., 2008; MAFFEI et al., 2010; SHRIVASTAVA et al., 2010), alguns trabalhos descrevem que os efeitos aleloquímicos dos compostos fenólicos podem assumir diferentes formas de ação sobre o desenvolvimento de organismos (BRIMECOMBE et al., 2001), inibindo determinado organismo (SCHAWN-ESTRADA et al., 2003; MEDICE et al., 2007) ou estimulando seu desenvolvimento, dependendo da concentração de uso e da interação entre os compostos (SIQUEIRA et al., 1991; TSAI et al., 1991; MARTINS et al., 2000).

No caso da associação ectomicorrízica, a formação da simbiose fungo-planta depende, de forma direta, das condições biológicas dos exudatos radiculares e das condições físico-químicas da rizosfera (SOUZA et al., 2006). Segundo Martin et al. (1997), Barker et al. (1998), Baptista et al. (1999), Menotta et al. (2004), Martin et al. (2008) e Smith e Read (2008), o quimiotropismo é estabelecido pela exudação de compostos fenólicos pelas raízes da planta hospedeira, os quais atuam como sinalizadores bioquímicos e estabilizadores da simbiose ectomicorrízica.

Em florestas de coníferas, Koide et al. (1998) observaram que a decomposição dos resíduos vegetais sobre o solo resulta em acúmulo de metabólitos secundários, os quais influenciam no crescimento de fungos ectomicorrízicos, limitando sua associação com as raízes das plantas. Com base nestes dados, Kainulainen et al. (2003) verificaram que em comunidades florestais, a liteira em decomposição é responsável pela liberação de metabólitos secundários, que estabelecem, dependendo da concentração, a relação de espécies de fungos capazes de tolerar estes compostos e formar simbiose com a planta.

Avaliando o crescimento de isolados de fungos ectomicorrízicos em substratos contendo diferentes concentrações de metabólitos secundários, Ludley et al. (2008, 2009) observaram variação significativa, tanto de inibição como de estímulo dos isolados, dependendo da espécie ectomicorrízica e da concentração dos metabólitos. Segundo os autores, o comportamento das espécies ectomicorrízicas frente à presença de metabólitos secundários é fundamental para a seleção de isolados capazes de formar simbiose com determinada comunidade de plantas.

Segundo Alves et al. (2001), a adoção de tecnologias alternativas deve proporcionar o aperfeiçoamento dos métodos de multiplicação de isolados ectomicorrízicos com elevada qualidade e baixo custo. Esforços estão sendo concentrados não somente no aprimoramento de metodologias para fabricação de inoculantes micorrízicos, mas também na otimização do desenvolvimento micelial, buscando-se compostos orgânicos com capacidade de bioestimulação do crescimento fúngico, visando a maior produção de material para ser utilizado nos programas de micorrização.

Partindo-se do conhecimento sobre as interações estabelecidas na simbiose entre os fungos ectomicorrízicos e o sistema radicular de plantas e do conceito sobre a síntese e constituição dos óleos essenciais, o objetivo nesse trabalho foi determinar a ação bioestimuladora do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* no crescimento de isolados ectomicorrízicos *in vitro*.

### 3.3 Material e métodos

O experimento foi constituído pela utilização do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* em diferentes concentrações, visando determinar a concentração na qual ocorreria máxima estimulação do micélio fúngico. O trabalho foi realizado em três etapas: (1) extração do óleo essencial de *E. grandis* por hidrodestilação (SERAFINI; CASSEL, 2001) e caracterização dos compostos obtidos; (2) avaliação do efeito do óleo essencial de *E. grandis* como bioestimulador do desenvolvimento *in vitro* de sete isolados de fungos ectomicorrízicos e (3) caracterização morfológica dos isolados de fungos ectomicorrízicos inoculados em meio de cultura líquido contendo óleo essencial de eucalipto.

#### 3.3.1 Obtenção do óleo essencial de *Eucalyptus grandis*

A extração do óleo essencial foi realizada através da técnica de hidrodestilação, utilizando-se folhas frescas de eucalipto, segundo a metodologia proposta por Vitti e Brito (2003).

Para a extração do óleo, as folhas frescas de *E. grandis* foram pesadas em amostras de 100 g, as quais foram cortadas com tesoura em pedaços de, aproximadamente, 2 cm e, posteriormente, colocadas em balão volumétrico, completando-se o volume do balão de hidrodestilação com, aproximadamente, 600 mL de água destilada. Em seguida, realizou-se o procedimento para obtenção do óleo essencial em aparelho de Clevenger modificado (SERAFINI; CASSEL, 2001) durante 3 horas, mantendo-se água destilada em ebulição dentro do balão com aquecedor externo.

Os componentes líquidos vegetais extraídos, após a passagem por um condensador, foram coletados e mantidos sob refrigeração a 4° C até sua utilização.

#### 3.3.2 Isolados de fungos ectomicorrízicos

Utilizou-se como inóculo fungos ectomicorrízicos das espécies *Pisolithus* sp. (isolados UFSC Pt 24 e UFSC Pt 188), *Pisolithus microcarpus* (isolado UFSC Pt 116), *Chondrogaster angustiporus* (isolado UFSC Ch 163), *Scleroderma citrinum* (isolado UFSC Sc 124) e *Suillus* sp. (isolados UFSM RA 2.2 e UFSM RA 2.8). Os

cinco primeiros isolados foram fornecidos pelo banco de fungos do Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Os isolados do gênero *Suillus* foram coletados e multiplicados no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo e do Ambiente Professor Marcos Rubens Fries da Universidade Federal de Santa Maria (ANDREAZZA et al., 2006).

Os isolados foram mantidos em meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado MNM (MARX, 1969) em pH 5,8, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. O material foi mantido em estufa a 26<sup>o</sup> C e multiplicados a partir de culturas da coleção, através de repicagens para o meio da mesma composição, sob condições assépticas.

### 3.3.3 Determinação dos compostos presentes no óleo essencial

Para a caracterização dos compostos, o óleo essencial foi seco sob sulfato de sódio anidro e recolhido em recipiente para fins de quantificação do rendimento do óleo.

Para as análises cromatográficas foram utilizados: cromatógrafo marca Varian<sup>®</sup> 3800 dotado de detector de ionização de chama FID e equipado com o programa Star Chromatography Workstation (versão 4.5); e cromatógrafo marca Shimadzu GC-17A dotado de espectrômetro de massas Shimadzu<sup>®</sup> modelo QP5000. Em ambos os equipamentos, empregou-se coluna capilar SPB<sup>TM</sup>-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm de fase estacionária) da Supelco (Bellefonte, PA, USA).

As condições cromatográficas do GC-FID e do GC/MS foram: injetor a 250<sup>o</sup> C em modo split 1:50; temperatura do forno: iniciando a 40<sup>o</sup> C , subindo 3<sup>o</sup> C por minuto até 200<sup>o</sup> C e permanecendo nesta temperatura por 2 minutos; detector a 250<sup>o</sup> C. Volume injetado: 0,2 µL do óleo puro. No GC/MS, utilizou-se 240<sup>o</sup> C de temperatura da interface; energia de impacto de +70 eV, e relação massa/carga de 35-350m/z. Uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C8–C20) (PolyScience, Illinois, EUA) foi utilizada em ambos equipamentos para se calcular os índices de retenção de Kovats. Os espectros de massa obtidos foram comparados com os espectros do site da NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>) na internet.

### 3.3.4 Avaliação do óleo essencial de *E. grandis* sobre o desenvolvimento de isolados de fungos ectomicorrízicos *in vitro*

Para a avaliação do efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de *E. grandis* sobre o desenvolvimento dos isolados ectomicorrízicos, foram utilizados Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura Melin-Norkrans modificado MNM (MARX, 1969) líquido com pH 5,8. Após a esterilização e o resfriamento dos Erlenmeyers a temperatura ambiente, adicionou-se as concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial, previamente solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003). Após a adição do óleo essencial ao meio de cultura, foram inoculados dois discos de 10 mm de diâmetro do micélio fúngico retirado das bordas de crescimento em meio de cultura sólido. O material foi mantido em incubadora a 26° C, por 25 dias no escuro.

A fim de se conhecer a interferência do etanol no crescimento fúngico, acrescentou-se um tratamento controle contendo apenas meio de cultura Melin-Norkrans modificado MNM (MARX, 1969) líquido e etanol na concentração utilizada para solubilizar a concentração mais elevada de óleo essencial.

Após a montagem das unidades experimentais, as mesmas foram incubadas por 25 dias, a 26° C  $\pm$  0,2 no escuro. Terminado o período de incubação, os micélios foram retirados dos Erlenmeyers sob filtração em papel Watman nº 3 e lavados em água destilada sobre peneira de 0,037 mm. Em seguida, foram secos em estufa a 65° C sob ventilação forçada durante 72 horas, a fim de determinar a massa seca dos micélios fúngicos.

As regressões foram obtidas pelo Software Table Curve (Jandel Scientific, 1991). Para a determinação dos tratamentos mais eficientes quanto ao bioestímulo do desenvolvimento miceliano, os dados obtidos nos tratamentos foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0,1$  e submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000). A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada pelo software CANOCO Versão 4.0 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998).

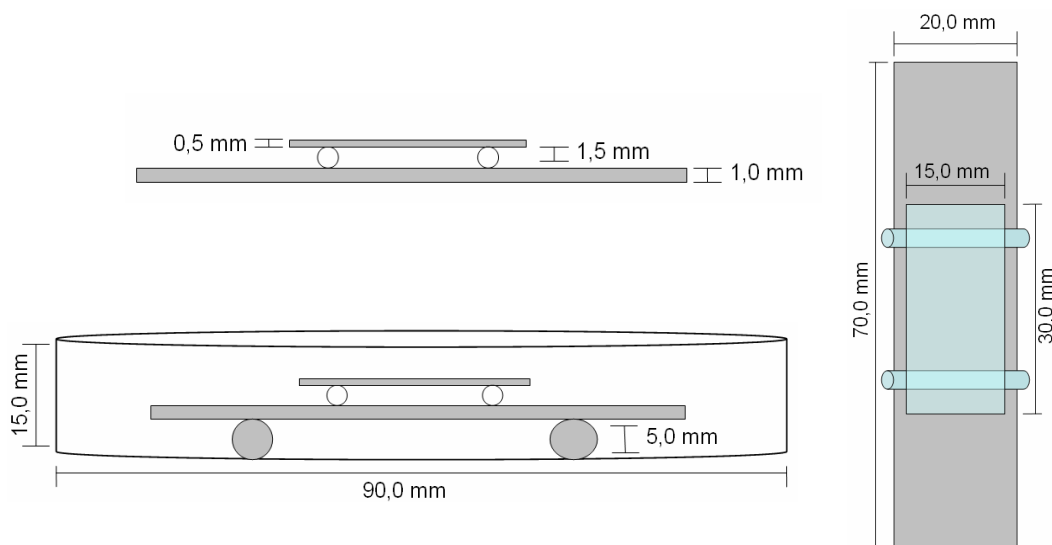
### 3.3.5 Características morfológicas das hifas

Após a determinação dos isolados fúngicos que melhor responderam à adição de óleo essencial ao meio de cultura e da concentração ideal do óleo essencial, estes isolados foram avaliados quanto (1) à evolução do crescimento *in vitro* dos isolados ectomicorrízicos expostos ao óleo essencial em relação ao tratamento controle e (2) às características morfológicas das hifas fúngicas crescidas em meio de cultura líquido contendo o óleo essencial.

Para a avaliação da evolução do crescimento miceliano, os isolados ectomicorrízicos foram inoculados em 25 mL de meio de cultura Melin-Norkrans modificado MNM líquido a pH 5,8 (MARX, 1969), em Erlenmeyers de 125 mL. Após a adição do óleo essencial ao meio de cultura, inocularam-se 2 discos de 10 mm de diâmetro do micélio fúngico em cada Erlenmeyer. O material foi mantido em incubadora por 25 dias, a  $26^{\circ}\text{C} \pm 0,2$  no escuro, com seis repetições. As avaliações foram realizadas a cada cinco dias.

Para a avaliação das características morfométricas dos isolados ectomicorrízicos, utilizaram-se lâminas de microscopia, sobre as quais foram acoplados cânulos de vidro de 1,5 mm de diâmetro. Sobre esta estrutura, colocou-se uma lamínula de microscopia de forma que houvesse espaço entre a lâmina e a lamínula, formando a unidade experimental (Figura 3.1). No espaço entre as lâminas, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultura Melin-Norkrans modificado MNM líquido a pH 5,8 (MARX, 1969). Foram utilizadas três concentrações de óleo essencial de eucalipto: (1) tratamento controle (sem a adição do óleo essencial), (2) concentração do óleo essencial que proporcionou melhor resposta ao estímulo do crescimento miceliano ( $20\ \mu\text{L L}^{-1}$  para os isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24) e (3) concentração do óleo essencial que resultou em menor crescimento miceliano ( $40\ \mu\text{L L}^{-1}$  para os isolados UFSC Pt 116 e  $50\ \mu\text{L L}^{-1}$  para o isolado UFSC Pt 24).

Cada unidade experimental foi acomodada sobre suporte de 5 mm de altura dentro de uma placa de Petri, com diâmetro de 90 mm, contendo água destilada estéril, a fim de proporcionar um ambiente úmido evitando a desidratação do meio de cultura (Figura 3.1).



**Figura 3.1** - Ilustração da montagem das unidades experimentais utilizadas na avaliação das características morfológicas das hifas fúngicas crescidas em meio de cultura líquido.

As unidades experimentais permaneceram em incubadora a  $26^{\circ} \text{C} \pm 0,2$  no escuro por um período de cinco dias. Decorrido este período, retirou-se os cânulos de vidro, forçando o contato entre a lâmina e a lamínula de vidro para visualização do crescimento das hifas em microscópio.

Cada conjunto (lâmina + lamínula) foi avaliado e fotografado em máquina fotográfica digital marca Sony, acoplada ao microscópio óptico com aumento de 300x. As imagens obtidas foram ampliadas no software GIMP 2.4.5 (GNU Image Manipulation Program), onde avaliou-se o diâmetro médio das hifas. Os dados obtidos nas imagens foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0,1$  e submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000), tomando-se como base os níveis de significância maiores que 95% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4 Resultados e discussão

No óleo essencial de *E. grandis* foram identificados 40 compostos (Tabela 3.1), Estes compostos corroboram com os descritos na literatura referente à composição de óleos essenciais extraídos de plantas do gênero *Eucalyptus* (BARANSKA et al., 2005).

**Tabela 3.1** - Componentes do óleo essencial extraído de folhas frescas de *Eucalyptus grandis*. Santa Maria, 2010.

<b>Composto</b>	<b>% Rel.<sup>1</sup></b>	<b>Composto</b>	<b>% Rel.<sup>1</sup></b>
Eucalyptol (1,8-cineol)	9,87	Tenuifoleno	0,62
p-Cymeno	7,87	Terpinen-4-ol	0,57
Spathulenol	6,58	Camphene	0,55
Lepidozenal	4,89	Bergamotol	0,41
Cubeb-11-ene	3,89	8,9-Epoxytelina-4,11-diene	0,39
Junenol	3,48	Eudesma-1,4(15),11-triene	0,38
4(15)-Dehydroglobulol	3,20	(E)-Caryophyllene	0,36
Deca-4,8-dienol, 1-ethynyl-	2,42	Neryl acetate	0,28
1,5,9-trimethyl-		γ-Terpineno	0,28
α-Phellandrene	2,26	Longipinene epoxide	0,27
allo-Aromadendra-		β-Myrcene	0,25
4(15),10(14)-diene	2,00	α-Murolene	0,23
(E)-Nerolidol	1,95	Elemene	0,19
α-Humulene	1,87	Bisabolene	0,14
α-Guaiol	1,70	α-Farnesene	0,12
T-Cadinol	1,28	(E)-3(10)-carene-4-ol	0,11
Germacrene B	0,95	Terpinoleno	0,10
γ-Himalacheno	0,84	Epiglobulol	0,09
Guaia-6,10(14)-diene 4β--ol	0,84	β-Pineno	0,08
α-Terpineol	0,76	Hinesol	0,08
Eremoligenol	0,74		
Eudesm-11-en-4alfa-ol	0,73		

<sup>1</sup> Porcentagem Relativa em relação ao total extraído.

Dentre estes componentes, o monoterpeneo 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]-octano, conhecido como eucaliptol (1,8-Cineol) destacou-se em proporção em relação aos demais. Chalchat et al. (1997), Lucia et al. (2007) e García et al. (2009) atribuem os efeitos de inibição ou bioestímulo do crescimento vegetal e microbiano principalmente ao eucaliptol, seguido pelo citral, timol, α e β-pineno, cetonas e compostos flavônicos. Estes compostos, dependendo da concentração, podem proporcionar relações de sinergismo, resultando na indução do crescimento de microrganismos ou plantas (LAGRANGE et al., 2001; LUDLEY et al., 2009). Segundo Estanislau et al. (2001) provavelmente este efeito esteja relacionado ao



fato do eucaliptol interagir com radicais livres contendo radical hidroxila, inibindo a produção de substâncias oxigenadas reativas.

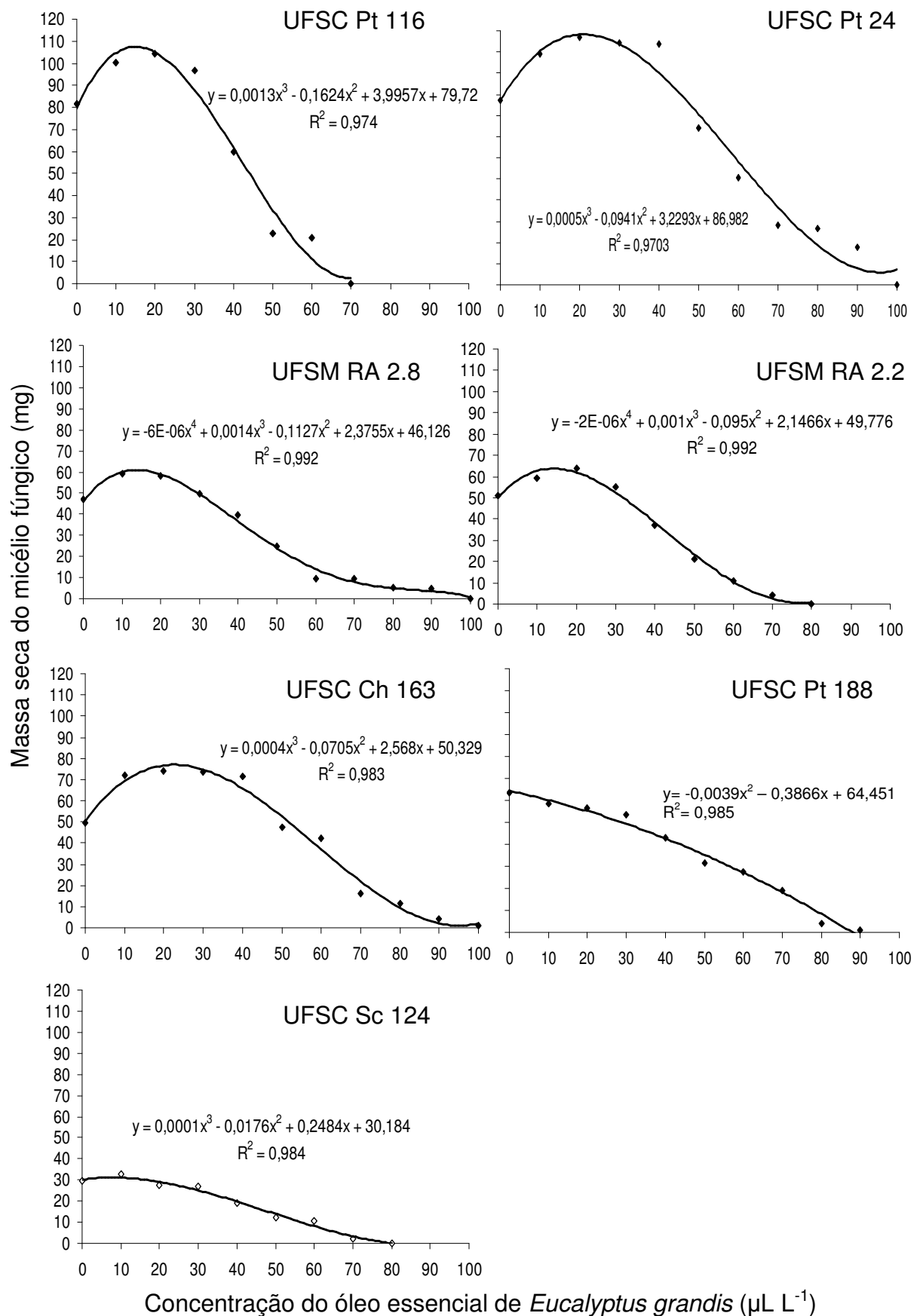
Alguns compostos vegetais, quando utilizados em concentrações extremamente reduzidas, podem proporcionar efeito Hormese no crescimento microbiano. Segundo Forbes (2000), este efeito se caracteriza pela indução de determinadas características provocada pela utilização de baixas concentrações de compostos considerados tóxicos. Baseados nesta característica, alguns trabalhos demonstram atividade de óleos essenciais na bioestimulação do desenvolvimento microbiano (TSAI et al., 1991; MARTINS et al., 2000; LUDLEY et al., 2009).

As concentrações de óleo essencial que proporcionaram incrementos no crescimento miceliano fúngico encontram-se entre 10 e 30  $\mu\text{L L}^{-1}$ , dependendo do isolado ectomicorrízico utilizado (Figura 3.2). No entanto, o isolado UFSC Pt 188 (*Pisolithus microcarpus*) apresentou maior crescimento no meio de cultura sem a adição do óleo essencial, uma vez que o óleo, mesmo na concentração de 10  $\mu\text{L L}^{-1}$ , apresentou efeito negativo sobre o isolado.

Os isolados UFSC Sc 124 (*Scleroderma citrinum*), UFSC Ch 163 (*Chondrogaster angustiporus*) e UFSM RA 2.8 (*Suillus* sp.) apresentaram maior crescimento quando da adição de 10  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleo essencial de eucalipto ao meio de cultura. Já, os isolados UFSC Pt 116 (*Pisolithus microcarpus*), UFSC Pt 24 (*Pisolithus* sp.) e UFSM RA 2.2 (*Suillus* sp.) apresentaram maior crescimento com a adição de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleo essencial.

De forma geral, os efeitos da utilização dos óleos essenciais, tanto no controle de microrganismos como no bioestímulo do crescimento destes, podem ser atribuídos aos compostos fenólicos e terpenos, com ênfase aos monoterpenos e sesquiterpenos presentes na composição dos metabólitos secundários de plantas bioativas.

De acordo com Taiz e Zeiger (2004), os compostos fenólicos, compostos contendo grupos fenóis, um grupo hidroxila e um anel aromático, apresentam grande variedade de funções nas espécies vegetais, atuando como sinal bioquímico na simbiose de plantas e microrganismos mutualistas.



**Figura 3.2** - Crescimento miceliano *in vitro* de isolados ectomicorrízicos (UFSC Pt 116, UFSC Pt 24, UFSM RA 2.8, UFSM RA 2.2, UFSC Ch 163, UFSC Pt 188 e UFSC SC 124) em meio de cultura líquido contendo concentrações crescentes de óleo essencial de *Eucalyptus grandis*. Santa Maria, 2010.

Os terpenos ou terpenóides, sintetizados a partir da Acetil CoA, apresentam função relacionada ao crescimento e ao desenvolvimento dos vegetais, devido à presença de diterpenos (giberelinas), tripterpenos (componentes essenciais de membranas), terpenos com quinze carbonos (ácido abscísico) e álcoois politerpênicos de cadeia longa, os quais agem como transportadores de açúcares na parede celular e na síntese de glicoproteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

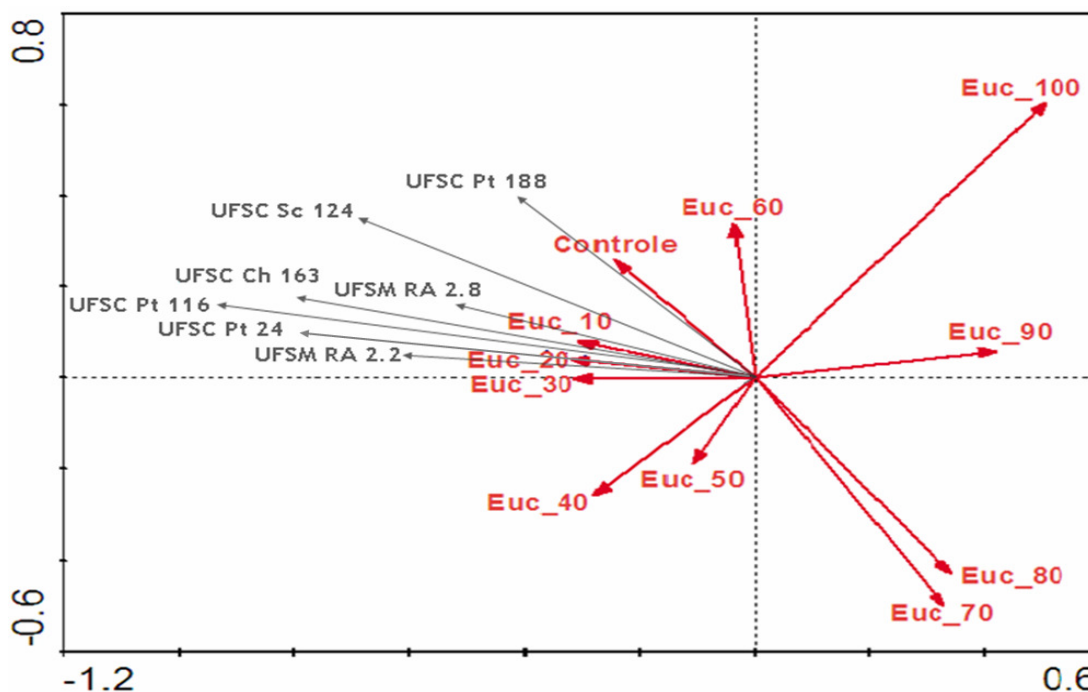
Segundo Ludley et al. (2009), os resultados referentes à ação de óleos essenciais no estímulo ou na inibição do crescimento de microrganismos não estão somente relacionados ao tipo de compostos presentes nos óleos, mas sim no comportamento dose-efeito. Segundo os autores, embora alguns metabólitos secundários sejam essenciais para o desenvolvimento e crescimento miceliano, alguns compostos, quando em concentrações elevadas, causam retardo ou até mesmo limitam a expansão das hifas de isolados ectomicorrízicos. De acordo com Atanda et al. (2007), os óleos essenciais de *Cinnamomun cassia* Blume e *Laurus nobilis* L. estimularam o crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus in vitro*.

Em concentrações de óleo essencial acima de 30  $\mu\text{L L}^{-1}$ , observa-se que começa a ocorrer diminuição do crescimento fúngico, evidenciado pela menor massa seco do micélio (Tabela 3.2). Soliman e Badeaa (2002) em estudos quanto ao efeito de óleos essenciais de plantas bioativas sobre micotoxinas e fungos patogênicos, observaram que a inibição do crescimento fúngico está diretamente relacionada à concentração dos compostos presentes nos óleos. Singh et al. (2003) observaram efeito inibitório sobre o crescimento fúngico, utilizando óleos essenciais de plantas bioativas em concentrações superiores a 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

De acordo com a análise de componentes principais (PCA), observa-se que todos os isolados, com exceção do isolado UFSC Pt 188 (*Pisolithus microcarpus*) apresentaram incremento no crescimento miceliano em concentrações do óleo essencial entre 10 e 30  $\mu\text{L L}^{-1}$ , sendo a concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ , a que proporcionou maior crescimento, não influenciando negativamente os isolados (Figura 3.3).

Os isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 apresentaram crescimento significativamente superior em comparação aos demais isolados avaliados, quando da adição do óleo essencial (Tabela 3.2). Segundo Oliveira e Giachini (1999), o gênero *Pisolithus*, correspondente a estes isolados, representa o genótipo mais utilizado na inoculação de espécies florestais. Contudo, estes isolados já

apresentavam crescimento significativamente superior aos demais no tratamento controle (sem a adição do óleo essencial ao meio de cultura).



**Figura 3.3** - Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) relacionando as dimensões 1 e 2 referentes ao crescimento dos isolados ectomicorrízicos (UFSC Pt 116, UFSC Pt 24, UFSM RA 2.8, UFSM RA 2.2, UFSC Ch 163, UFSC Pt 188 e UFSC SC 124) em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *Eucalyptus grandis*. (Euc\_Número) representa a utilização do óleo de eucalipto nas diferentes concentrações. Santa Maria, 2010.

Em comparação à massa seca do micélio no tratamento controle, o fungo ectomicorrízico *Chondrogaster angustiporus* (isolado UFSC Ch 163) foi o que apresentou melhor resposta à adição do óleo essencial no meio de cultura líquido (incremento de 49,13%). No entanto, este isolado apresenta crescimento lento em meio de cultura, sendo sua massa micelial significativamente inferior aos isolados pertencentes ao gênero *Pisolithus* (Tabela 3.2). Desta forma, o fECM *Chondrogaster angustiporus* não apresenta características ideais para ser utilizado em programas de produção de inoculo em larga escala.

A utilização do álcool como solubilizante do óleo essencial, demonstrado pela massa seca do micélio no tratamento álcool (MSCAL), não afetou o crescimento miceliano. Apenas para o fungo ectomicorrízico *Suillus* sp. (isolado UFSM RA 2.2), a presença do álcool no meio de cultura resultou em aumento no crescimento miceliano (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** - Massa seca do micélio fúngico (mg) dos isolados ectomicorrízicos incubados na presença do do óleo essencial de *Eucalyptus grandis*. Média de seis repetições (n=6). Santa Maria, 2010.

<b>Fungo ectomicorrízico</b>	<b>MSC<sup>1</sup></b>	<b>MSCAL<sup>2</sup></b>	<b>MSOE<sup>3</sup></b>
<i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24)	87,24 a B*	91,32 a B	116,65 a A
<i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116)	81,45 a B	81,69 ab B	106,57 a A
<i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 188)	63,47 b A	66,07 bc A	63,47 bc A
<i>Chondrogaster angustiporus</i> (UFSC Ch 163)	49,52 bc B	55,00 c B	73,85 b A
<i>Suillus</i> sp. (UFSM RA 2.2)	49,15 bc B	53,47 c AB	60,05 c A
<i>Suillus</i> sp. (UFSM RA 2.8)	46,80 bc B	48,85 cd B	59,10 c A
<i>Scleroderma citrinum</i> (UFSC Sc 124)	30,07 c A	31,40 d A	32,37 d A
CV (%)**	8,95	7,60	6,96

<sup>1</sup> Massa seca do micélio no tratamento controle.

<sup>2</sup> Massa seca do micélio no tratamento controle álcool.

<sup>3</sup> Massa seca do micélio no tratamento com a concentração de óleo essencial de maior eficiência. UFSC Pt 24 (20 µL L<sup>-1</sup>), UFSC Pt 116 (20 µL L<sup>-1</sup>), UFSC Pt 188 (0 µL L<sup>-1</sup>), UFSC Ch 163 (10 µL L<sup>-1</sup>), UFSM RA 2.2 (20 µL L<sup>-1</sup>), UFSM RA 2.8 (10 µL L<sup>-1</sup>) e UFSC Sc 124 (10 µL L<sup>-1</sup>).

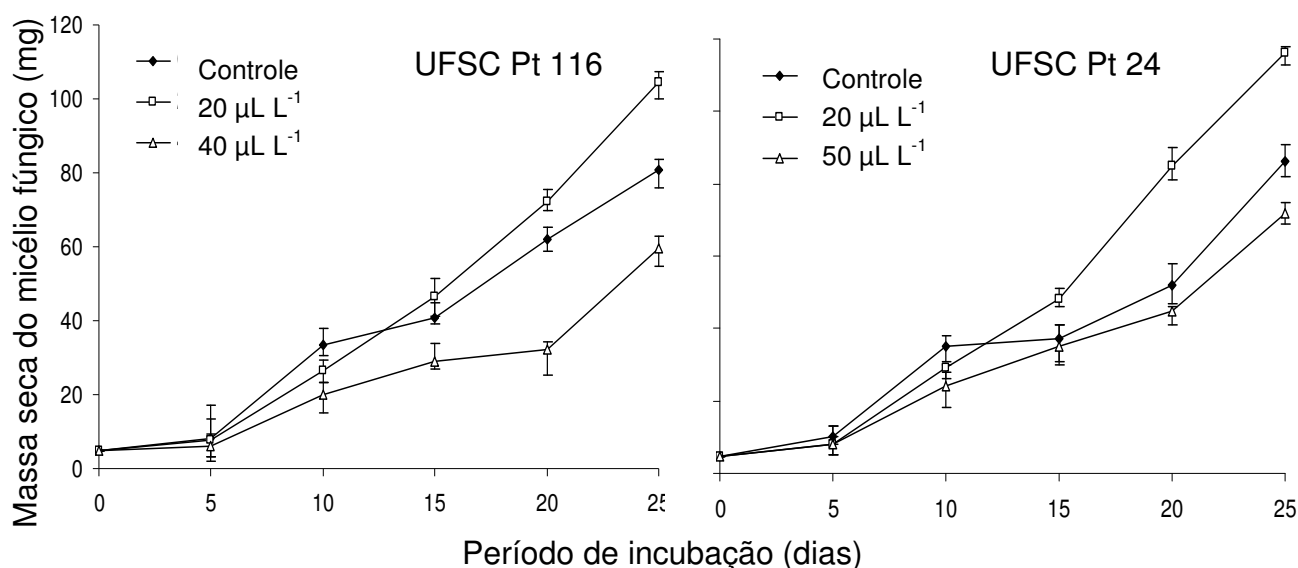
\* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*\* Coeficiente de variação

Estudando o efeito da utilização do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. no controle de fungos do gênero *Aspergillus*, García et al. (2009) observaram que a oxidação provocada pelo composto eucaliptol (1,8-cineol) provocou a formação dos compostos 2-exo-hydroxi-1,8-cineol, 2-endo-hydroxi-1,8 cineol, 3-exo-hydroxi-1,8-cineol e 3-endo-hydroxi-1,8-cineol, os quais resultaram na inativação do patógeno. Já Bakkali et al. (2008) observaram que os componentes aromáticos e alifáticos presentes nos metabólitos secundários dos vegetais podem atuar como pró-oxidantes danosos, afetando as membranas celulares dos organismos, ou como anti-oxidantes benéficos, beneficiando a manutenção e o desenvolvimento celular, dependendo da concentração e natureza.

Analisando-se o crescimento miceliano dos isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 durante o período de incubação, verifica-se que ao final de 25 dias, estes apresentaram crescimento significativamente superior quando inoculados em meios de cultura com a adição de 20 µL L<sup>-1</sup> de óleo essencial. No entanto, este maior crescimento começa a ser evidente apenas entre o 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias de incubação para ambos isolados (Figura 3.4).

Desde a repicagem do material (tempo zero) até o 5º dia de incubação, a adição ou não do óleo essencial não alterou o crescimento miceliano de ambos os isolados. A partir do 5º dia de incubação, no tratamento controle, no qual não se adicionou o óleo essencial, os isolados apresentaram crescimento acelerado, sendo este evidenciado até o 10º dia de incubação (Figura 3.4). A partir do 10º dia, ambos isolados (UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24) apresentaram diminuição na taxa de crescimento, permanecendo até o 15º. Durante este período, os tratamentos onde foi utilizado o óleo essencial na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  de meio de cultura apresentaram crescimento contínuo e linear até o término do período de incubação.



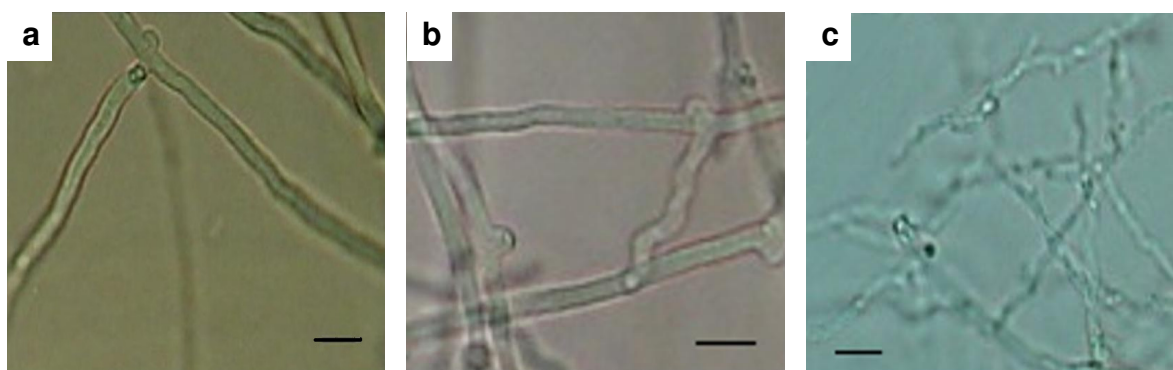
**Figura 3.4** - Curva de crescimento do micélio dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) em meio líquido contendo diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Santa Maria, 2010.

A partir do 15º dia, os isolados incubados no tratamento controle voltam a crescer, não sendo observado diminuição no crescimento até o término do período de incubação.

Os isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24, nos tratamentos onde aplicou-se as concentrações de óleo essencial que limitaram o crescimento fúngico, igualando-se ao tratamento controle (Figura 3.2), apresentaram crescimento miceliano inferior aos demais tratamentos a partir do 5º dia de incubação. No entanto, este tratamento não limitou o crescimento miceliano no período do 10º ao 15º dia, observado no tratamento controle.

Verificou-se que a adição de  $20 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto no meio de cultura líquido resultou em maior densidade de micélio fúngico, evidenciado pela menor distância entre os pontos de ramificações, pelo maior diâmetro das hifas e maior número de hifas laterais partindo de um mesmo ponto de ramificação (Figuras 3.5, 3.6 e 3.7). Segundo Denny e Wilkins (1987), esta maior densidade de micélio proporciona ao isolado maior grau de sobrevivência no campo e maior eficiência na associação e manutenção da simbiose com plantas simbiotes.

O aumento no diâmetro das hifas, devido à adição de  $20 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto ao meio de cultura, resultou em maior massa de micélio fúngico por área. Tendo em vista que  $100 \text{ mg}$  de micélio são suficientes para inocular  $1 \text{ m}^2$  de viveiro, o ganho em massa micelial observado com a adição do óleo essencial possibilita a inoculação de maior número de mudas em relação ao inóculo tradicional (sem a utilização do óleo essencial).



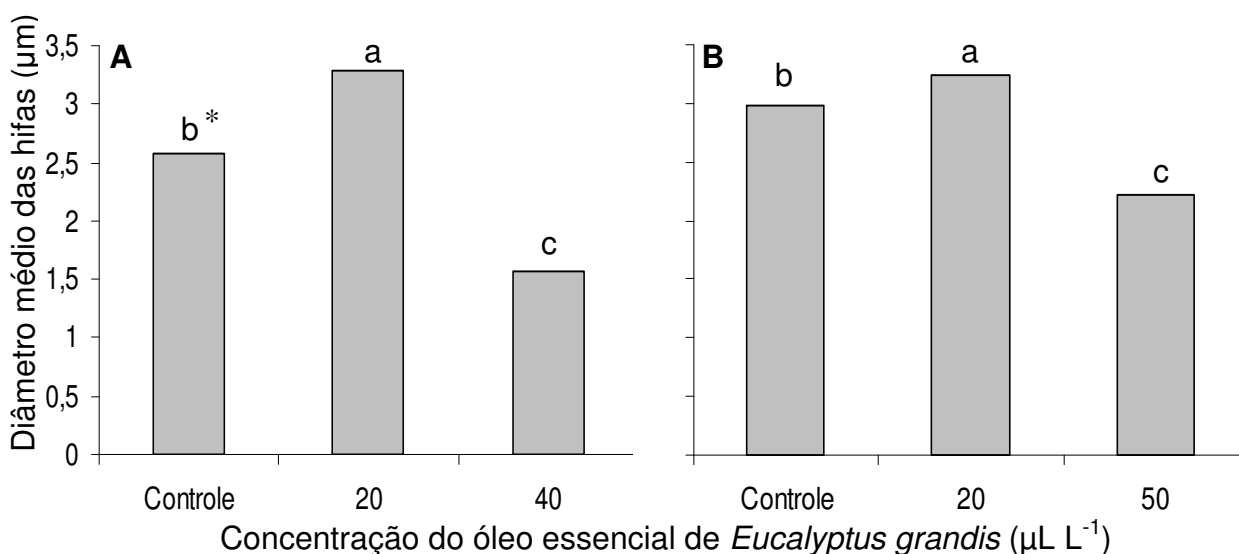
Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 3.5** - Hifas do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) no tratamento controle (a), tratamento  $20 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial (b) e tratamento  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial (c), cinco dias após a incubação. ( \_  $5 \mu\text{m}$ ). Santa Maria, 2010.

Quando adicionado óleo essencial na concentração de  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $50 \mu\text{L L}^{-1}$ , houve redução significativa no diâmetro das hifas dos isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 respectivamente. Estas concentrações resultaram em crescimento miceliano abaixo do crescimento observado no tratamento controle (Figura 3.2).

Além do efeito de estímulo ou limitação do desenvolvimento das hifas fúngicas, evidenciado pelo diâmetro destas, dependendo da concentração do óleo essencial adicionado ao meio de cultura, o óleo proporcionou maior ou menor ramificação das hifas, estabelecendo-se uma relação de dose-efeito. Este padrão de comportamento foi demonstrado por Ludley et al. (2009), em estudos quanto ao

desenvolvimento de fungos ectomicorrízicos na presença de determinados compostos presentes no metabolismo secundário de coníferas.

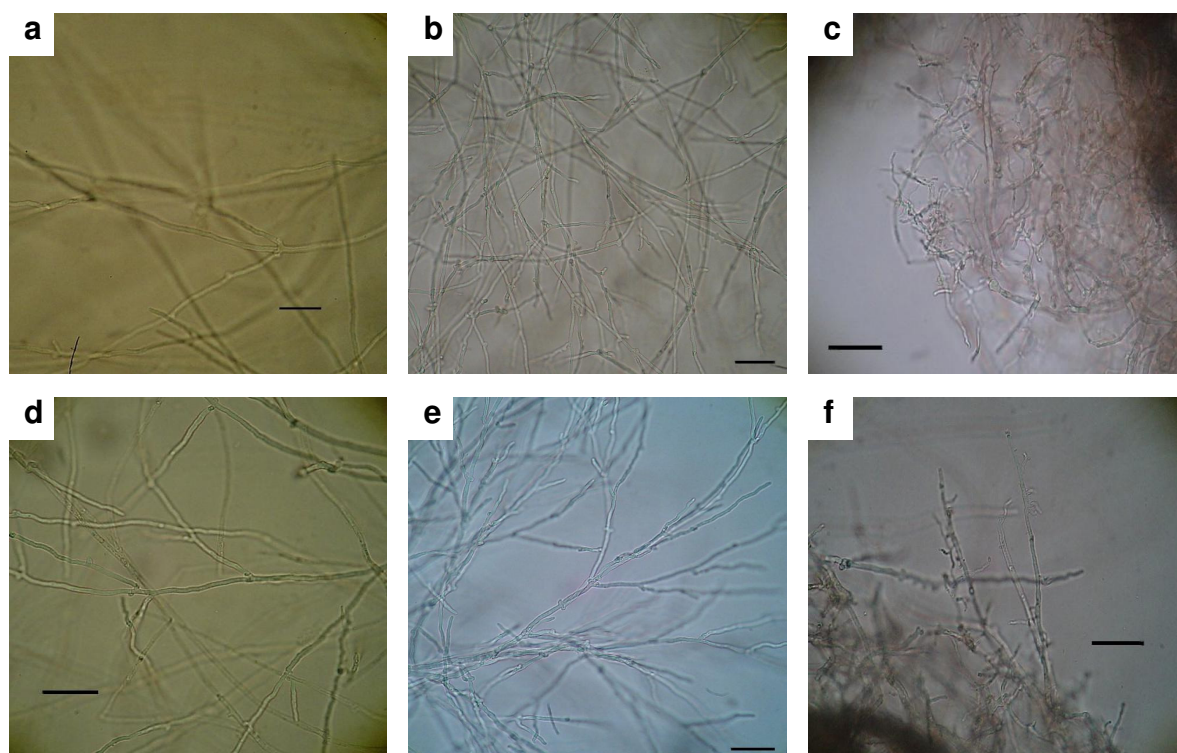


**Figura 3.6** - Diâmetro médio das hifas dos fungos ectomicorrízicos (A) *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) nos tratamentos controle, 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  e do fungo ectomicorrízico (B) *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) nos tratamentos controle, 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Média de seis repetições. \* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. UFSC Pt 116 (CV% 7,15), UFSC Pt 24 (CV% 8,61). Santa Maria, 2010.

Durante a formação da simbiose micorrízica, observou-se na planta a formação e o acúmulo de polipeptídeos de baixo peso molecular, idênticos aos observados quando da penetração de fungos patogênicos no sistema radicular, evidenciando a reação de mecanismos de defesa (FEUGEY et al., 1999; BOUWMEESTER et al., 2003). Observou-se também a indução da quitinase, peroxidase e o estímulo ao metabolismo de fenilpropanóides, resultando este na deposição de compostos fenólicos responsáveis pela estabilização da simbiose (MENSEN et al., 1998; FEUGEY et al., 1999). Em plantas micossimbiontes, a formação destes elicitores, especialmente dos N-acetilglucosamina, garante não somente a associação, mas também sua manutenção e seu crescimento no decorrer do tempo (SALZER et al., 1996). Burgess et al. (1995) e Lagrande et al. (2001) demonstraram a síntese destes polipeptídeos durante a simbiose ectomicorrízica em *E. grandis*. Desta forma, pressupõe-se que a utilização do óleo essencial de *E. grandis* esteja atuando de forma similar à que ocorre na natureza, como promotor do crescimento miceliano de isolados ectomicorrízicos *in vitro*.



Segundo Tani et al. (1992), consideram-se estimuladores todos os compostos ou tratamentos capazes de induzir o crescimento e/ou desenvolvimento de microrganismos ou plantas. De acordo com os resultados apresentados, evidenciou-se que o óleo essencial de *E. grandis*, atuou como estimulador do crescimento miceliano, proporcionando maior extensão das hifas e crescimento fúngico.



Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 3.7** - Hifas dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) nos tratamentos controle (a), 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial (b) e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial (c) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) nos tratamentos controle (d), 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial (e) e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial (f). ( \_ 25  $\mu\text{m}$ ). Santa Maria, 2010.

Levando-se em consideração o rendimento da extração do óleo essencial de *E. grandis*, os 100 g de folhas frescas fornecem, aproximadamente, 175  $\mu\text{L}$  de óleo essencial, volume que dependendo da resposta do isolado ectomicorrízico à concentração do óleo é suficiente para elaborar de 5 a 9 litros de meio de cultura líquido. Desta forma, de acordo com o ganho em massa fúngica obtido pela utilização do óleo essencial, a adição deste mostra-se uma alternativa eficiente e de baixo custo para elevar o crescimento de micélio ectomicorrízico *in vitro*.

### 3.5 Conclusões

O estímulo ao crescimento fúngico devido a adição do óleo essencial de *E. grandis* ao meio de cultura MNM líquido apresenta respostas de dose-efeito, dependendo da concentração do óleo essencial e do isolado ectomicorrízico utilizado;

O óleo essencial de *Eucalyptus grandis* utilizado em meio de cultura líquido apresenta eficiência para o aumento na massa de micélio fúngico dos isolados ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), *Chondrogaster angustiporus* (isolado UFSC Ch 163), *Scleroderma citrinum* (isolado UFSC Sc 124) e *Suillus* sp. (isolados UFSM RA 2.2 e UFSM RA 2.8);

O óleo essencial de *E. grandis*, em concentrações acima de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ , atua como supressor da atividade fúngica, limitando o crescimento miceliano *in vitro*.

### 3.6 Referências bibliográficas

AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, p. 824–827, June 2005.

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

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. 51-59, dezembro 2004.

ANDREAZZA, R. **Associação de fungos ectomicorrízicos com espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul, RS**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ANTONIOLLI, Z. I.; KAMINSKI, J. Micorrizas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 2, n. 3, p. 441-455, 1991.

ATANDA, O. O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. The potential of some species essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. **Food Control**, Reading, v. 18, n. 5, p. 601-607, May, 2007.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Richmond, v. 46, n. 2, p. 446-475, February 2008.

BAPTISTA, M. J. et al. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, outubro 1999.

BARANSKA, M. et al. Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of *Eucalyptus* essential oils. **Biopolymers**, Hoboken, v. 78, n. 5, p. 237–248, April 2005.

BARKER, S. J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, Illinois, v.116, n. 4, p. 1201-1207, april 1998.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soils**. 13 ed. Upper Saddle River, New Jersey, 2002, 960p.

BRIMECOMBE, M. J.; LEIJ, F. A. de; LYNCH, J. M. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. Ed. Marcel Dekker, New York, 2001. 424p.

BRUNNER, I. Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zürich, v. 4, n. 1, p. 13-27, june 2001.

BURGESS, T. et al. Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. **Planta**, Bonn, v. 195, n. 3, p. 408-417, january 1995.

COURTY, P. E. et al. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 42, n. 5, p. 679-698, may 2010.

DEL GIUDICE, L. et al. The microbial community of Vetiver root and its involvement into essential oil biogenesis. **Environmental Microbiology**, Braunschweig, v. 10, n. 10, p. 2824-2841, october 2008.

DENNY, H. J.; WILKINS, D. A. Zinc tolerance in *Betula* spp. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. **New Phytologist**, Lancaster, v. 106, n. 3, p. 535-544, 1987.

FABROWSKI, F. J. et al. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* R. T. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 95-106, june 2003.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, n. 12 (Edição Especial), p. 175-204, 2000.

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

FEUGEY, L. et al. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. **New Phytologist**, Lancaster, v. 144, n. 3, p. 541-547, march 1999.

GARCÍA, C. et al. Bioxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, Delft, v. 59, n. 1-3, p. 171-176, july 2009.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso de metais pesados. In: CURI, N. et al. (Eds.) **Tópicos em Ciência do Solo**. v. I, Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. 430p.

HOBBIE, E. A. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. **Ecology**, Davis, v. 87, n. 3, p. 563-569, march 2006.

HÖGBERG, M. N.; HÖGBERG, P. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. **New Phytologist**, Lancaster, v. 154, n. 3, p. 791-795, june 2002.

JANDEL SCIENTIFIC. **User's manual**. California, 1991. 280p.

KAINULAINEN, P.; HOLOPAINEN, T.; HOLOPAINEN, J. K. Decomposition of secondary compounds from needle litter of Scots pine grown under elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. **Global Change Biology**, Illinois, v. 9, n. 2, p. 295-304, february 2003.

KOIDE, R. T. et al. Interactions between needles of *Pinus resinosa* and ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Lancaster, v. 140, n. 3, p. 539-547, november 1998.

LAGRANGE, H.; JAY-ALLGMAND, C.; LAPEYRIE, F. Rutin, the phenolglycoside from eucalypt root exudates, stimulates *Pisolithus hyphal* growth at picomolar concentration. **New Phytologist**, Lancaster, v. 149, n. 2, p. 349-355, february 2001.

LUDLEY, K. E. et al. Differential response of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal mycelium from coniferous forest soils to selected monoterpenes. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 40, n. 3, p. 669-678, march 2008.

LUDLEY, K. E. et al. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forest is revealed by novel experimental system. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 41, n. 1, p. 117-124, january 2009.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, Scottsville, In Press, Corrected Proof, Available online 8 April 2010.

MARTIN, F.; LAPEYRIE, F.; TAGU, D. Altered gene expression during ectomycorrhizal development. In: LEMKE, P.; CAROLL, G. (Eds.) **Plant Relationships**. Springer-Verlag, Berlin, 1997.

MARTIN, F. et al. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature**, London, v. 452, n. 7183, p. 88–92, march 2008.

MARTINS, M. A.; GONÇALVES, G. F. de; SOARES, A. C. F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1465-1471, july 2000.

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

MATOS, O. C. de. Substâncias naturais de origem vegetal com actividade biocida: seu uso na protecção das culturas. **IIR Portugal Lisboa**, 2004. 14p.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, janeiro/fevereiro 2007.

MENOTTA, M. et al. Headspace solid-phase microextraction with gas chromatography and mass spectrometry in the investigation of volatile organic compounds in an ectomycorrhizae synthesis system. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Washington, v. 18, n. 2, p. 206-210, january 2004.

MENSEN, R.; HAGER, A.; SALZER, P. Elicitor - induced changes of wall - bound and secreted peroxidase activities in suspension - cultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 102, n. 4, p. 539-546, april 1998.

MOYNA, P.; DELLACASA, E.; MENÉNDEZ, P. Técnicas analíticas aplicadas aos óleos essenciais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002, 433p.

MULDER, L. et al. Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 123, n. 2, p. 207-218, 2005.

NEHLS, U. et al. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. **Plant Biology**, Freiburg, v. 12, n. 2, p. 292-301, march 2010.

OLIVEIRA, V. L.; GIACHINI, A. J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. UFLA: Lavras, 1999. 818p.

OLUMA, H. O. A.; GARBA, I. U. Screening of *Eucalyptus globulus* and *Ocimum gratissimum* against *Pythium aphanidermatum*. **Nigerian Journal of Plant Protection**, v. 21, p. 109-114, 2004.

PERA, J.; PARLADÉ, J. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. **Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales**, Madrid, v. 14, n. 3, p. 419-433, 2005.

ROSSI, M. J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V. L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 59, n. 2-3, p. 175-181, july 2002.

SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, V. P. Extratos naturais na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro e de *Meloidogyne incognita* raça 3 em feijoeiro. **Nematrologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, n. 1, p. 41-48, junho 2003.

SALZER, P. et al. Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors

by extracellular spruce cell enzymes. **Planta**, Bonn, v. 198, n. 1, p. 118-126, january 1996.

SCHAWN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: SBF, 2003. p. 54-56.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463p.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.

SHRIVASTAVA, G. et al. Plant volatiles-based insect pest management in organic farming. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 29, n. 2, p. 123-133, march 2010.

SIMIONATTO, E. **Estudo dos constituintes químicos de óleos voláteis de plantas medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação e modificação estrutural e atividade biológica**. 2004, 193f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SINGH, G.; SINGH, O. P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some indian Curcuma species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 45, n. 1-2, p. 75-81, january, 2003.

SIQUEIRA, J. O. et al. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.

SIQUI, A. C. et al. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 16, p. 38-43, setembro/outubro 2000.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3<sup>a</sup> ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787p.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, Richmond, v. 40, n. 11, p. 1669-1675, november 2002.



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

SOUZA, V. C. de et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612–618, julho/setembro 2006.

SULLIVAN, T. **Interactions between soil microbial communities and plant roots: A minireview**. Soil and Crop Sciences, Colorado State University (USA), 2004. 16p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719p.

TANI, M. et al. Structure of endogenous oligogalacturonides inducing shikonin biosynthesis in *Lithospermum* cell cultures. **Phytochemistry**, Egham, v. 31, n. 8, p. 2719-2723, august 1992.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: Software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998.

TSAI, S. M.; PHILLIPS, D. A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores "in vitro". **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1485-1488, may 1991.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

ZEPPA, S. et al. *Tilia platyphyllos* Scop.-*Tuber brumale* Vittad. vs. *T. platyphyllos* Scop.- *T. borchii* Vittad. ectomycorrhizal systems: a comparison of structural and functional traits. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 7, p. 709-716, july 2005.

## 4 Capítulo II

### Efeito do óleo essencial de eucalipto na germinação e no desenvolvimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden

#### 4.1 Resumo

A utilização de extratos e óleos essenciais de plantas bioativas vem sendo uma alternativa eficiente no bioestímulo do crescimento e na proteção vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do óleo essencial extraído de folhas de *Eucalyptus grandis* sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de mudas de eucalipto em condições de viveiro. Sementes de eucalipto foram incubadas em concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial em ambiente controlado. Posteriormente, plântulas de eucalipto foram pulverizadas periodicamente com 0, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial por planta. Avaliou-se o efeito do óleo sobre o desenvolvimento vegetal aos 30 e 60 dias após o transplante. Os resultados evidenciaram que a germinação foi significativamente superior quando as sementes foram pulverizadas com 25  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial. A aplicação do óleo essencial nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ , proporcionou maior desenvolvimento das raízes e da parte aérea das mudas de eucalipto em ambiente controlado, sendo uma alternativa eficiente na bioestimulação do crescimento vegetativo de mudas de eucalipto.

**Palavras-chave:** Metabólitos secundários; bioestimulação; essência florestal.

## 4.2 Introdução

O aumento anual das áreas de reflorestamento incentivou as pesquisas quanto à produção de mudas de essências florestais, não somente visando a quantidade, mas principalmente a qualidade das mudas, as quais devem apresentar vigor suficiente para resistir ao estresse inicial após o transplante para o campo (GOMES et al., 2002; SILVA et al., 2003; TREVISAN et al., 2007).

Neste sentido, estudos estão sendo concentrados no desenvolvimento de tecnologias que otimizem a qualidade na produção de mudas de eucalipto. Entre estas tecnologias, atualmente estão sendo estudados alguns produtos, sintéticos ou biológicos, que apresentam capacidade de promoção do crescimento direto ou indireto de plantas de eucalipto, seja a partir do fornecimento de compostos que atuem como reguladores do crescimento da planta ou que reduzam os efeitos negativos às plantas proporcionados pela ação de determinados organismos patogênicos ou adversidades ambientais (MAFIA et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; MAFIA et al., 2007).

Com o desenvolvimento de técnicas de extração, purificação e identificação de compostos presentes em extratos vegetais, novas linhas de pesquisa têm demonstrado efeito benéfico da utilização de metabólitos secundários de plantas bioativas nas mais variadas áreas do conhecimento (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; SERAFINI et al., 2001). No setor agrícola, alguns resultados de pesquisa demonstram que os metabólitos secundários ou óleos essenciais de plantas bioativas, como as do gênero *Eucalyptus* estão sendo utilizados como agentes biológicos no controle de pragas e doenças de espécies vegetais de interesse comercial (DELASQUIS et al., 2002; BONALDO et al., 2004, STEFFEN et al., 2008).

Embora os óleos essenciais estejam relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000), a elucidação das propriedades antimicrobianas encontradas nos compostos secundários dos vegetais pode dar subsídios para o desenvolvimento de técnicas de estimulação do crescimento vegetal (BONALDO et al., 2004).

Entre os componentes presentes nos óleos essenciais das plantas do gênero *Eucalyptus*, o 1,8-Cineol ou eucaliptol e o citronelal são encontrados em maiores concentrações (CHALCHAT et al., 1997). Além destes compostos, Fabrowski (2002),

Baranska et al. (2005) e Sandi e Blanco (2007) destacam a presença de citral, timol, felandreno, piperitona,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, limoneno, além de cetonas, compostos flavônicos e alguns aldeídos voláteis, os quais, dependendo da concentração de uso, podem beneficiar determinados organismos.

Segundo Mafia et al. (2007), a interação entre os compostos voláteis e alguns fitopatógenos pode interferir positivamente no desenvolvimento vegetal. Mafia et al. (2005) e Bonaldo et al. (2007) descrevem que a aplicação de óleos essenciais sobre as plantas resulta na ativação de mecanismos de defesa latentes ou reguladores do crescimento, como fitoalexinas e citocininas. A ativação destes mecanismos pode resultar em maior desenvolvimento vegetal, devido ao biocontrole de patógenos responsáveis por distúrbios fisiológicos na planta. Segundo Vitti e Brito (2003), os óleos essenciais de plantas do gênero *Eucalyptus* apresentam propriedades bactericidas, inseticidas e anti-sépticas.

De acordo com Mulder et al. (2005), a interação entre microrganismos e plantas é estabelecida a partir do reconhecimento de determinados compostos excretados pelas raízes, os quais funcionam como sinais específicos ocorrentes em determinadas condições ambientais. Estes sinais podem ocorrer através de compostos e substratos simples de baixo peso molecular como aminoácidos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Devido a estas interações, podem ocorrer alterações bioquímicas como produção e acúmulo de polipeptídeos pela planta, regulação de atividades enzimáticas e biossíntese de proteínas estruturais, as quais resultam em maior desenvolvimento vegetal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Embora a utilização do extrato ou do óleo essencial de plantas de eucalipto possa causar alelopatia a determinadas espécies vegetais (CRUZ et al., 2000; FERREIRA; AQUILA, 2000; GOETZE; THOMÉ, 2004), dependendo da concentração de determinados compostos, podem ocorrer relações de sinergismo, proporcionando a indução do crescimento de microrganismos ou plantas (BLUM, 1999; MAIRESSE, 2005).

De acordo com Mairesse (2005), alguns compostos vegetais, quando utilizados em concentrações extremamente reduzidas, podem apresentar efeito Hormese. Segundo Forbes (2000), este efeito se caracteriza pela indução de determinadas características provocada pela utilização de baixas concentrações de compostos considerados tóxicos. Para Tani et al. (1992), o efeito de estímulo está relacionado à produção, em nível elevado, de fitoalexinas pelo vegetal. Baseados

nesta característica, alguns trabalhos demonstram influência de óleos essenciais na bioestimulação do desenvolvimento de espécies olerícolas e graníferas (ALVES et al., 2004; BONALDO et al., 2007). Entretanto, não há relatos na literatura mostrando o efeito da aplicação do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. no desenvolvimento de essências florestais.

Bonaldo et al. (2007) em estudos sobre as atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas do *Eucalyptus citriodora* em plantas de soja e sorgo, observaram alto potencial desta espécie na proteção de plantas, tanto pelo controle direto de fitopatógenos, agindo no crescimento micelial e na germinação dos esporos, como pelo controle indireto através da ativação de mecanismos de defesa nas plantas estudadas.

Avaliando o efeito da aplicação de extratos de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) e *Cymbopogon citratus* Stapf. (capim-cidró), Mairesse (2005) observou reação de estímulo dos extratos na germinação de sementes e no crescimento vegetativo de plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface).

Segundo Russo e Berlyn (1991), alguns compostos vegetais são denominados de bioestimuladores, representando produtos sem características nutricionais, os quais proporcionam maior produção vegetal e resistência a fatores externos.

No Brasil, a elevada extração e comercialização do óleo essencial de eucalipto situa o País em posição de destaque quanto ao volume e à qualidade do óleo produzido (MAFFEIS et al., 2000; SILVA et al., 2006). Em vista disso, a avaliação dos efeitos benéficos destes óleos essenciais sobre o desenvolvimento vegetal pode representar uma alternativa biológica para a otimização da produção e da qualidade de mudas florestais destinadas ao campo.

Neste sentido, o objetivo nesse trabalho foi avaliar a utilização do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* sobre a germinação e o crescimento de mudas desta espécie florestal.

### 4.3 Material e métodos

O experimento foi dividido em duas etapas: (1) efeito do óleo essencial sobre a germinação de sementes de *E. grandis* em ambiente controlado e (2) efeito do óleo essencial sobre o desenvolvimento e crescimento inicial de mudas de *E. grandis* em casa de vegetação. Os ensaios foram constituídos por seis tratamentos, correspondentes a seis concentrações do óleo essencial de eucalipto. Para o desenho experimental, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições nos ensaios de germinação e sete repetições nos ensaios de crescimento inicial das mudas de eucalipto.

#### 4.3.1 Obtenção do óleo essencial de *Eucalyptus grandis*

A extração do óleo essencial de folhas frescas de eucalipto foi realizada através da técnica de hidrodestilação. Inicialmente, foram coletadas as folhas de eucalipto segundo a metodologia proposta por Vitti e Brito (2003). As folhas frescas foram cortadas em pedaços de 2 cm, pesadas e separadas em lotes individuais de 100 g. Posteriormente, as folhas foram colocadas em balão de fundo redondo no aparelho de Clevenger modificado (SERAFINI; CASSEL, 2001), mantendo-se água destilada em ebulição dentro do balão com aquecedor externo. Os componentes vegetais extraídos, após a passagem por um condensador, foram coletados e mantidos sob refrigeração a 4° C, até a sua utilização.

#### 4.3.2 Sementes

As sementes de *E. grandis* foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO. Para a desinfestação das sementes, as mesmas foram imersas em etanol (70%) durante 30 segundos, sob agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada estéril para retirada do residual de etanol. Posteriormente, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (1%) durante 30 segundos e lavadas três vezes em água destilada estéril para retirada do residual de hipoclorito.

#### 4.3.3 Avaliação do efeito do óleo essencial de *E. grandis* sobre a germinação de sementes

Para a avaliação da contribuição do óleo essencial sobre a germinação das sementes, cinco placas de Petri de 100 mm de diâmetro foram forradas com papel de germinação, sobre o qual foram dispostas 100 sementes de eucalipto por placa. Após a distribuição das sementes, o papel foi umedecido com água destilada estéril contendo concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto, previamente solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003).

Após a montagem das unidades experimentais, as placas de Petri foram incubadas por 72 horas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ , com fotoperíodo de 14 horas. Avaliou-se a porcentagem de germinação das sementes em intervalos de 12 horas.

Os dados referentes às porcentagens de sementes germinadas para cada período de avaliação foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0,1$  e submetidos à análise de variância e ao teste de médias de acordo com Scott Knott a 5% de probabilidade, pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000).

#### 4.3.4 Avaliação do efeito do óleo essencial de *E. grandis* sobre o desenvolvimento e crescimento inicial de plântulas de eucalipto

Sementes de eucalipto foram desinfestadas segundo metodologia descrita para o ensaio anterior. As sementes germinadas em papel de germinação foram mantidas a  $26^{\circ}\text{C}$  no escuro, por um período de cinco dias.

Decorrido o período de germinação, as plântulas de eucalipto foram transplantadas para tubetes de plástico de  $50\text{ cm}^3$ , contendo turfa como substrato. A turfa utilizada apresentava pH em água 5,8; cálcio  $25,9\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ; magnésio  $4,7\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ; H+Al  $2,5\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$ ; CTC efetiva 31,1; matéria orgânica 17%; argila 9%; potássio  $176\text{ mg dm}^{-3}$  e fósforo  $14,4\text{ mg dm}^{-3}$ .

Após o transplante, os tubetes permaneceram em casa de vegetação. A reposição da umidade foi realizada adicionando-se diariamente água destilada aos tubetes, sendo aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951), em intervalos de 15 dias.

Para avaliação do efeito da concentração do óleo essencial de eucalipto sobre o desenvolvimento das plântulas, solubilizou-se o óleo essencial em etanol

96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003). Pulverizou-se, por planta, 2 mL da solução oleosa nas concentrações de 0, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ , em intervalos de 7 dias a contar da data de transplante das mudas.

As avaliações foram realizadas em duas épocas: aos 30 dias após o transplante, visando analisar o efeito da aplicação do óleo essencial de eucalipto na fase inicial de crescimento da planta, e aos 60 dias após o transplante. Neste período, o espaço físico do tubete ainda não é considerado fator limitante ao crescimento da planta (BONNASSIS, 2007). Nestes intervalos de tempo, foram avaliados os parâmetros: altura da planta (mm), massa fresca e seca da parte aérea (mg), comprimento de raízes (mm), volume radicular ( $\text{cm}^3$ ), massa fresca e seca das raízes (mg).

Para a determinação da massa da parte aérea fresca e seca, as plantas foram cortadas ao nível do solo. Em seguida, foi determinada a massa fresca da parte aérea. As raízes foram separadas do solo, lavadas com água destilada, secas em papel toalha para determinação da massa fresca das raízes. Concomitantemente, determinou-se o comprimento das raízes pivotantes com auxílio de régua milimetrada e o volume radicular pelo método de deslocamento de água, adaptando-se metodologia utilizada para solos (EMBRAPA, 1997).

Após, as raízes e a parte aérea das plantas foram colocadas em sacos de papel individuais, devidamente identificados e levados à estufa a 65° C, onde permaneceram até atingirem peso constante, efetuando-se a determinação da massa da parte aérea seca e massa das raízes secas.

Os dados obtidos foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0,1$  e submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000). Para a determinação dos tratamentos mais eficientes quanto ao bioestímulo do desenvolvimento das mudas de eucalipto, realizou-se análise dos componentes principais pelo software CANOCO Versão 4.0 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998).



#### 4.4 Resultados e discussão

As respostas à aplicação do óleo essencial de eucalipto sobre a germinação das sementes e o crescimento das plantas de *E. grandis* variaram de acordo com a concentração do óleo essencial. Analisando-se o percentual de germinação das sementes de eucalipto, observou-se que nos primeiros períodos de avaliação (12 – 48 horas), a germinação evoluiu de forma heterogênea, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4.1). Estes resultados, provavelmente, estejam relacionados ao vigor das sementes utilizadas na condução dos ensaios.

Após 60 horas de incubação das sementes, o efeito do óleo essencial sobre o percentual germinativo das sementes passou a ser evidente, sendo que as concentrações entre 25 e 75  $\mu\text{L L}^{-1}$  proporcionaram germinação significativamente superior às demais concentrações de óleo utilizadas (Tabela 4.1).

Decorridas 72 horas de incubação das sementes, observou-se um padrão de germinação, onde a aplicação das concentrações de 25, 50 e 75  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto resultaram em diferenças significativas quanto à germinação das sementes (Tabela 4.1), aumentando a germinação em 18,36; 14,29 e 8,16%, respectivamente.

**Tabela 4.1** - Porcentagem de germinação de sementes de eucalipto após incubação a diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de cinco repetições (n = 5). Santa Maria, 2010.

Óleo essencial ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	Porcentagem de germinação					
	12 h**	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
0	1,66 a*	6,66 b	30,00 b	55,00 b	75,00 c	81,66 d
10	1,66 a	13,33 a	35,00 b	68,33 a	76,66 b	83,33 c
25	0 a	8,33 a	38,33 b	66,66 a	85,00 a	96,66 a
50	0 a	13,33 a	38,33 b	71,66 a	83,33 a	93,33 a
75	0 a	6,66 b	39,00 a	65,00 a	80,00 a	88,33 b
100	0 a	10,00 a	38,33 b	71,66 a	78,33 b	83,00 c
CV(%)***	27,60	24,13	13,23	13,02	3,56	3,08

\* Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

\*\* Período de avaliação em horas.

\*\*\* Coeficiente de variação

Segundo Labouriau (1983) o efeito da aplicação de determinado produto sobre as sementes pode ser expresso tanto na velocidade de germinação como no percentual final de sementes germinadas. Segundo Ferreira e Áquila (2000), este efeito varia conforme a reação da semente ao produto, como efeitos sobre a

permeabilidade das membranas, conformação de enzimas, de receptores e utilização do oxigênio. Dudai et al. (1999) e De Feo (2002) descreveram que, em concentrações elevadas, alguns óleos essenciais podem causar inibição da germinação, sendo considerados bioherbicidas. No presente trabalho, este efeito foi observado na concentração de  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ , na qual a germinação das sementes apresentou decréscimo.

Os resultados obtidos neste trabalho diferiram dos encontrados por Batish et al. (2004), os quais verificaram, independentemente da concentração de uso, efeito bioherbicida do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre a germinação e o crescimento inicial de diversas plantas.

Quanto ao crescimento inicial de plantas de *E. grandis*, observou-se que, aos 30 dias após o transplante, a aplicação do óleo essencial nas concentrações de 30 e  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  proporcionou maior altura das plantas em relação às demais concentrações (Tabela 4.2). Já aos 60 dias após o transplante, no tratamento  $30 \mu\text{L L}^{-1}$ , a altura das mudas de eucalipto passou a ser significativamente superior aos valores nos demais tratamentos, seguido pelas concentrações de 40, 20 e  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  (Tabela 4.2). Este efeito da concentração do óleo sobre a altura das mudas de eucalipto 60 dias após o transplante, refletiu no maior acúmulo tanto na massa fresca como na massa seca da parte aérea nos tratamentos onde se utilizou o óleo essencial a uma concentração de  $30 \mu\text{L L}^{-1}$ .

**Tabela 4.2** - Altura e massa fresca e seca da parte aérea de mudas de eucalipto aos 30 e 60 dias após o transplante, tratadas com concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de sete repetições (n = 7). Santa Maria, 2010.

Óleo essencial ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	Altura da plântula (mm)		Massa fresca da parte aérea (mg)		Massa seca da parte aérea (mg)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Controle	38,25 ab <sup>*</sup>	89,20 b	42,50 a	464,20 b	6,83 a	178,80 b
20	49,32 ab	94,60 b	42,25 a	482,80 b	7,11 a	185,20 b
30	53,83 a	120,00 a	52,08 a	655,40 a	7,51 a	213,80 a
40	50,90 a	113,20 ab	51,42 a	633,40 a	6,92 a	201,00 ab
50	46,83 b	92,80 b	41,21 a	434,00 b	7,01 a	173,20 b
60	34,87 b	51,82 c	38,77 a	262,00 c	6,51 a	109,00 c
CV(%)**	8,60	4,88	9,21	5,94	8,10	4,24

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

\*\* Coeficiente de variação

Para a concentração de  $60 \mu\text{L L}^{-1}$  de óleo essencial de eucalipto, tanto aos 30 como aos 60 dias após o transplante, observou-se crescimento das mudas inferior

ao tratamento controle, evidenciando o efeito da elevada concentração do óleo essencial, passando da condição de estímulo para efeito inibitório (Tabela 4.2).

Segundo Harbone (1991) este efeito inibitório resultante da utilização de determinadas concentrações do óleo essencial de plantas do gênero *Eucalyptus* pode ser facilmente observado em comunidades de plantas do gênero, as quais não apresentam vegetação sob a copa das árvores. Segundo o autor, em comunidades florestais, este efeito ocorre devido aos terpenos e monoterpenos constituintes do óleo essencial presente nas folhas de eucalipto, os quais inibem outras plantas devido à decomposição, volatilização, lixiviação e exudação de compostos presentes nos tecidos vegetais depositados sobre o solo.

Comparando-se os valores de massa fresca e seca da parte aérea, observou-se que a aplicação do óleo essencial não apresentou diferenças significativas aos 30 dias em relação ao tratamento controle (Tabela 4.2). Provavelmente, esta resposta esteja relacionada à curta exposição destas plantas ao efeito do óleo. Aos 60 dias após o transplante, as concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  resultaram em plantas com maior massa fresca e seca da parte aérea (Tabela 4.2).

Quanto aos valores de massa seca radicular, observou-se que até os 30 dias após o transplante das mudas, a aplicação do óleo essencial de eucalipto não resultou em maior massa radicular. Já aos 60 dias após o transplante, a aplicação do óleo nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  proporcionou aumento no desenvolvimento radicular (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** - Massa fresca e seca das raízes de eucalipto e razão raiz / parte aérea aos 30 e 60 dias após o transplante, tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de sete repetições (n = 7). Santa Maria, 2010.

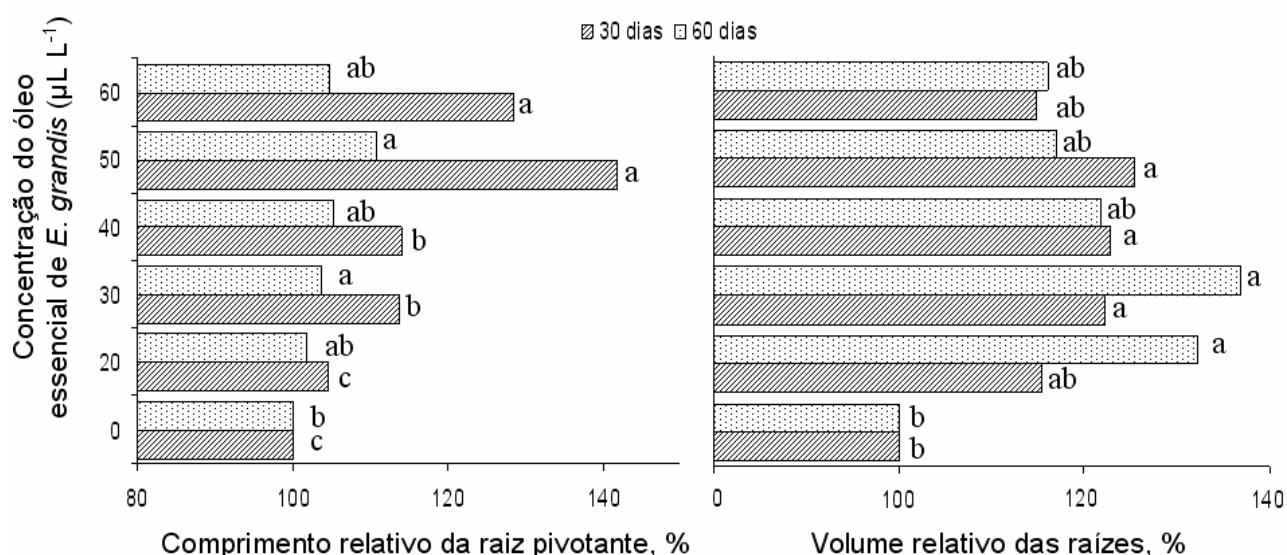
Óleo essencial ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	Massa fresca da raiz (mg)		Massa seca da raiz (mg)		Razão raiz / parte aérea	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Controle	22,87 b*	351,60 b	2,10 a	68,67 b	0,30	0,38
20	27,12 ab	401,00 a	2,23 a	69,06 b	0,31	0,37
30	35,87 a	507,40 a	2,29 a	86,56 a	0,30	0,40
40	34,00 ab	484,60 ab	2,28 a	73,38 ab	0,33	0,36
50	31,62 ab	398,00 ab	2,52 a	67,48 b	0,36	0,38
60	28,75 ab	192,40 b	2,08 a	40,66 c	0,32	0,37
CV(%)**	17,60	10,25	18,40	18,13		

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

\*\* Coeficiente de variação

Na concentração de  $50 \mu\text{L L}^{-1}$ , a aplicação do óleo essencial de eucalipto proporcionou estímulo ao crescimento radicular em profundidade, o qual pode ser observado pelo aumento em 41,7% no comprimento relativo da raiz principal, após 30 dias do início da aplicação do óleo (Figura 4.1). Decorridos 60 dias após o transplante, o efeito da aplicação do óleo essencial sobre o desenvolvimento radicular passou a ser menor. Quanto ao volume radicular, o estímulo ao crescimento proporcionado pela aplicação do óleo essencial sobre as plantas de *E. grandis* aos 60 dias após o transplante, passou a ser significativamente superior nas concentrações de 20 e  $30 \mu\text{L L}^{-1}$ .

O efeito de estímulo ao crescimento vegetal, expresso tanto nos valores de massa seca da parte aérea e raiz, quando da aplicação do óleo essencial a  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  aos 60 dias (Tabelas 4.2 e 4.3), resultou em uma razão raiz/parte aérea de 0,40, valor este próximo ao proposto por Brissette (1984), o qual estabelece a razão 0,5 como sendo a ideal para o desenvolvimento das plantas.



**Figura 4.1** - Comprimento e volume relativo das raízes de mudas de *Eucalyptus grandis* aos 30 e 60 dias após o transplante, tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. (Médias seguidas de mesma letra nas barras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade). Santa Maria, 2010.

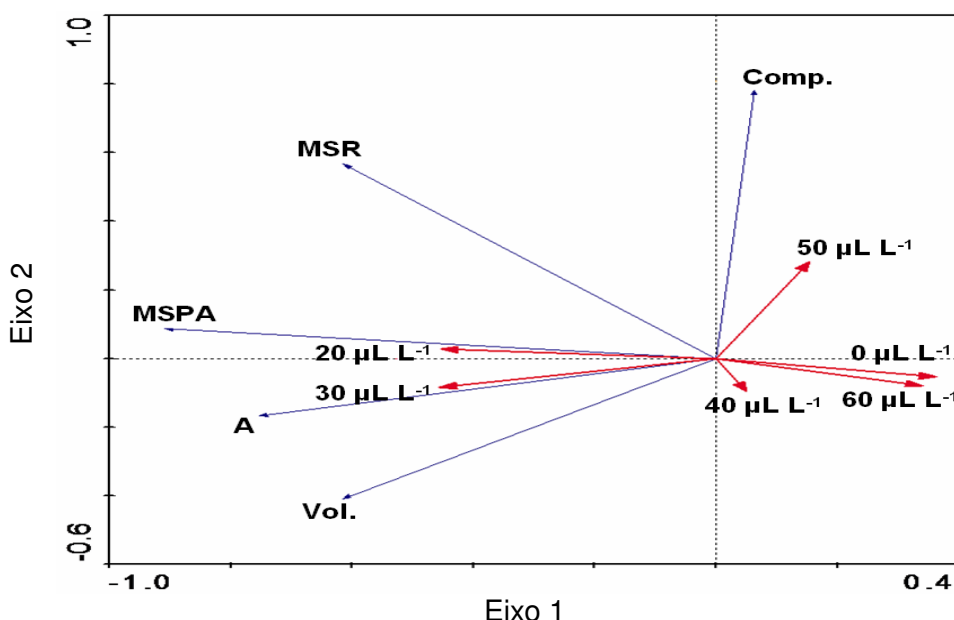
De acordo com a análise multivariada dos dados obtidos neste trabalho (Figura 4.2), observou-se variação quanto à eficiência dos tratamentos, a qual foi expressa por dois eixos. No eixo 1, as variáveis foram separadas em dois grupos de eficiência, o primeiro englobando as concentrações de 20 e  $30 \mu\text{L L}^{-1}$ , as quais influenciaram a produção de massa seca tanto radicular como aérea, a altura da

planta e o volume radicular. O segundo grupo englobou os tratamentos controle, 40, 50 e 60  $\mu\text{L L}^{-1}$  de óleo essencial de eucalipto (Figura 4.2).

Analisando-se o segundo eixo, observa-se que a concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  esteve mais relacionada à maior produção de massa seca radicular e aérea, enquanto que a concentração de 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  apresentou maior influência no volume radicular e na altura das plantas (Figura 4.2).

Segundo Souza (2003), a massa seca de ramos e folhas é o parâmetro mais importante em estudos onde se busca verificar a eficiência de determinadas variáveis sobre o desenvolvimento e crescimento vegetal. Estes fatores representam a eficiência da planta na formação de tecidos. Com base nisso, as concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial aplicado em mudas de *E. grandis* representariam os tratamentos com maior efeito bioestimulatório em relação aos demais tratamentos avaliados.

Observou-se que a concentração de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  apresentou maior influência no comprimento das raízes pivotantes e que os tratamentos controle, 40 e 60  $\mu\text{L L}^{-1}$ , não apresentaram influência significativa no crescimento das plantas em relação aos demais tratamentos analisados (Figura 4.2).



**Figura 4.2** - Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) relacionando as dimensões 1 e 2 referentes ao desenvolvimento das plantas de *Eucalyptus grandis* pulverizadas com diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. (vol) volume radicular, (A) altura das mudas, (MSPA) massa seca da parte aérea, (MSR) massa seca de ramos e folhas, (Comp) comprimento das raízes principais. Santa Maria, 2010.

O resultado da aplicação do óleo essencial via parte aérea das plantas pode ter ocorrido de duas formas: na primeira, os compostos podem ter sido utilizados pela planta como reguladores do crescimento, resultando em modificações enzimáticas na planta ou em alterações fisiológicas ocorridas nas raízes, o que explicaria o maior desenvolvimento das plantas submetidas a determinadas concentrações do óleo. Outra possibilidade que explicaria o maior desenvolvimento das plantas de eucalipto não está relacionada ao fornecimento de compostos reguladores, mas aos efeitos indiretos do óleo essencial sobre organismos ou microrganismos que possam alterar o desenvolvimento vegetal.

A análise do sistema radicular das mudas de *E. grandis* demonstrou que as plantas mantidas no tratamento controle apresentaram menor desenvolvimento de pêlos radiculares na zona de maturação, quando comparadas às raízes das plantas que receberam a aplicação do óleo essencial de eucalipto na concentração de  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 4.3).

Segundo Taiz e Zeiger (2004), alguns componentes dos metabólitos secundários das plantas atuam no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, o que poderia explicar a resposta das plantas de eucalipto à aplicação destes metabólitos.



Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 4.3** - Mudanças de *Eucalyptus grandis* aos 60 dias após o transplante nos tratamentos com aplicação de  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto (A1) e no tratamento controle (B1), raiz secundária das plantas nos tratamentos com aplicação de  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto (A2) e no tratamento controle (B2) e corte transversal da raiz secundária das plantas nos tratamentos com aplicação de  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto (A3) e no tratamento controle (B3). Santa Maria, 2010.

Embora neste trabalho não tenham sido realizadas análises quanto às possíveis alterações fisiológicas e bioquímicas ocorridas nas plantas, e quantificação da produção de fitormônios, os resultados obtidos evidenciaram que a aplicação do óleo essencial de eucalipto, em determinadas concentrações, proporcionou maior germinação das sementes e crescimento das plantas de *E. grandis*.

#### 4.5 Conclusões

O uso do óleo essencial de *E. grandis* é eficiente na bioestimulação do crescimento vegetativo de mudas de eucalipto;

A aplicação do óleo essencial de *Eucalyptus grandis*, na concentração de 25  $\mu\text{L L}^{-1}$ , proporciona maior germinação das sementes, e nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  favorece maior desenvolvimento das raízes e da parte aérea das mudas de eucalipto.



#### 4.6 Referências bibliográficas

ALVES, M. da C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p.1083-1086, novembro 2004.

ANDRADE, W. F. de; ALMEIDA, M. de; GONÇALVES, A. N. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, dezembro 2006.

BARANSKA, M. et al. Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of *Eucalyptus* essential oils. **Biopolymers**, Hoboken, v. 78, n. 5, p. 237–248, abril 2005.

BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, Melbourne, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, december 2008.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris – soil bioassays: some reflections. Pp.17-23. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology: Allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, 589p.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 123-134, march/april 2004.

BONALDO, S. M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopatológica**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.

BONNASSIS, P. A. P. **Caracterização de isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção do crescimento e na colonização radicular de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Florianópolis, 2007, 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BRISSETTE, J. C. Summary of discussions about seedling quality. In: SOUTHERN NURSERY CONFERENCES, 1984, Alexandria. **Proceedings...** New Orleans: USDA. Forest Service. Southern Forest Experiment Station, 1984. p. 127-128.

CHALCAT, J. C. et al. Aromatic plants of Rwanda. II. Chemical composition of essential oils of ten *Eucalyptus* species growing in Ruhande Arboretum, Butare, Rwanda. **Journal of Essential Oil Research**, Messina, v. 9, n. 2, p. 159-165, march/april 1997.

CRUZ, M. E. da S.; NOZAKI, M. de H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 15, p. 28-34, julho/agosto 2000.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, Egham, v. 61, n. 5, p. 573-578, november 2002.

DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Food Microbiology**, Summit-Argo, v. 74, n. 1-2, p. 101-109, march 2002.

DUDAI, N. et al. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 25, n. 5, p. 1573-1561, may 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997, 212p.

FABROWSKI, F. J. ***Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 2002, 225f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FABROWSKI, F. J. et al. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* R. T. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 95-106, june 2003.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, n. 12 (Edição Especial), p. 175-204, 2000.

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

FORBES, V. E. Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology**, Amherst, v. 14, n. 1, p. 12-24, february 2000.

GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 43-50, janeiro/março 2004.

GOMES, J. M. et al. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 655-664, novembro/dezembro 2002.

HARBORNE, J. B. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In: **Ecological Chemistry and Biochemistry of plant Terpenoids**. Ed. Oxford: Claredon Press. 1991. p.399-426.

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

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA. 1983. 683p.

MAFFEIS, A. R.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; BRITO, J. O. Reflexos das deficiências de macronutrientes e boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 87-98, junho 2000.

MAFIA, R. G. et al. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843-851, novembro/dezembro 2005.

MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 589-597, julho/agosto 2007.

MAIRESSE, L. A. da S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. Santa Maria, 2005, 340p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª Ed. Editora UFLA. 2006, 729p.

MULDER, L. et al. Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 123, n. 2, p. 207-218, 2005.

RUSSO, R. O.; BERLYN, G. P. The use of organica biostimulants to help low input sustainable agriculture. **Journal of Sustainable Agriculture**, Santa Cruz, v.1, n. 2, p. 19-42, january 1991.

SANDI, J. T. T.; BLANCO, R. F. Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, (Coleoptera: curculionidae), **Biology & Health Journal**, Dois Vizinhos, v. 1, n. 1, p.101-106, 2007.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463p.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.

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

SOUZA, L. A. B. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2003, 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719p.

TANI, M. et al. Structure of endogenous oligogalacturonides inducing shikonin biosynthesis in *Lithospermum* cell cultures. **Phytochemistry**, Egham, v. 31, n. 8, p. 2719-2723, august 1992.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: Software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998.

TREVISAN, R. et al. Efeito da intensidade de desbaste nas características dendrométricas e tecnológicas da madeira de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 377-387, outubro/dezembro 2007.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

## 5 Capítulo III

### Influência do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* no crescimento de isolados de fungos ectomicorrízicos em diferentes concentrações de cobre, zinco e níquel

#### 5.1 Resumo

Os metabólitos secundários de plantas bioativas são capazes de estimular o crescimento dos fungos ectomicorrízicos. Quando em associação com plantas, esses fungos proporcionam as mesmas condições de se desenvolverem em ambientes contaminados por metais pesados. Avaliou-se o efeito da adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* no crescimento de isolados ectomicorrízicos na presença dos metais pesados cobre, zinco e níquel em meio de cultura líquido. Os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) foram incubados em meio de cultura líquido na presença de concentrações crescentes de cobre, zinco e níquel e de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Após período de incubação de 25 dias, avaliou-se a massa seca do micélio e a concentração que inibiu o crescimento fúngico em 50%. A adição de óleo essencial de eucalipto em meio de cultura líquido, na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ , favoreceu o crescimento de isolados ectomicorrízicos na presença de cobre, zinco e níquel. Nos meios de cultura líquido onde a concentração de cobre, zinco e níquel foram superiores a 3,94, 1,57 e 0,85  $\text{mmol L}^{-1}$  respectivamente, não foi verificado aumento no crescimento dos isolados ectomicorrízicos avaliados pela adição do óleo essencial. A presença do óleo essencial de *E. grandis* em meio de cultura líquido aumentou a tolerância dos isolados ectomicorrízicos UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 aos metais pesados cobre, zinco e níquel.

**Palavras-chave:** metais pesados; metabólitos secundários; ectomicorrizas.

## 5.2 Introdução

A contaminação do solo por metais pesados oriundos tanto de processos de mineração e manufatura de metais como pela deposição de produtos contendo estes elementos, resulta em problemas ambientais, afetando os mais variados ecossistemas (NAVARRO-AVIÑÓ et al., 2007; KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

A remediação do solo contaminado por metais pesados pode ser realizada por processos físicos, químicos e/ou biológicos, dependendo do tipo de metal contaminante e da destinação futura da área (KHAN et al., 2006). Segundo Khan et al. (2000), as técnicas de descontaminação do solo podem ser divididas em dois grupos: 1) utilizando-se técnicas *ex situ*, onde o solo contaminado é removido do local para posterior tratamento, ou 2) técnicas *in situ*, onde estratégias de remediação são utilizadas no próprio local, sendo esta a mais recomendada devido a fatores econômicos e ambientais.

Recentemente, estudos estão sendo direcionados para a utilização de microrganismos na biorremediação de solos contaminados por metais, como alternativa para recuperação de áreas degradadas. Dentre as alternativas, a utilização de fungos ectomicorrízicos (fECM) apresenta resultados satisfatórios quando da implantação de povoamentos florestais nas áreas recuperadas (BELLION et al., 2006; SMITH; READ, 2008).

Os fECM apresentam função fundamental nos ecossistemas florestais, contribuindo, devido ao mutualismo estabelecido entre fungo e planta, nos processos de ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica do solo, mobilização de nutrientes e interações com outros microrganismos presentes na micorrizosfera (COURTY et al., 2010; NEHLS et al., 2010). Em ambientes com excesso de metais pesados, as micorrizas conferem maior tolerância das plantas a estes elementos, devido ao aumento na absorção de nutrientes pelas raízes e a capacidade de imobilizar os metais pesados (GRAZZIOTTI et al., 2001a; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006; SMITH; READ, 2008). Segundo os mesmos autores, os fECM representam uma valiosa alternativa devido ao fato de fornecerem benefícios ao crescimento da planta hospedeira, principalmente em situações em que fatores edáficos são limitantes.

A capacidade dos fungos micorrízicos reduzirem a biodisponibilidade de metais pesados tem sido atribuída à habilidade dessas associações em reter os metais no micélio fúngico, devido a mecanismos de complexação, quelação, compartimentalização e volatilização (KHAN et al., 2000; CUMMING et al., 2001; FOMINA et al., 2005; BELLION et al., 2006; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006), evitando a translocação destes para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (AGGANGAN et al., 1998; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que a contaminação por metais pode inibir o desenvolvimento de alguns isolados fúngicos (GRAZZIOTTI et al., 2001b, 2003) e a colonização ectomicorrízica (BELL et al., 1988). Rühling e Söderstrom (1990) observaram redução no número de frutificações em espécies de Basidiomicetos com o aumento do nível de contaminação por arsênio, cádmio, cobre, chumbo e zinco. Contudo, são poucos os trabalhos que visam avaliar alternativas de crescimento dos isolados ectomicorrízicos em condições com excesso de metais pesados. Desse modo, estudos para a maximização do crescimento micelial na presença de metais tornam-se necessários para utilização destes isolados na remediação e produção economicamente viável de áreas contaminadas.

Dentre as alternativas de estímulo ao crescimento fúngico, encontra-se a utilização de metabólitos secundários de plantas bioativas, capazes de induzir a formação e o acúmulo de determinados ácidos orgânicos em fECM. Segundo Weathers et al. (2006) e Zhi-Lin et al. (2007) os compostos fenólicos e terpenóides constituintes dos óleos essenciais de plantas micossimbiontes atuam como sinal bioquímico para o crescimento miceliano de fECM.

Embora os óleos essenciais sejam usualmente utilizados na proteção de plantas, em baixas concentrações estes podem estimular o crescimento microbiano (MARTINS et al., 2000; MUCCIARELLI et al., 2003). Schützen-Dübel e Polle (2002) descrevem que quanto maior o teor de metais pesados no solo, maior o estímulo à produção de compostos fenólicos na planta, os quais estimulam a manutenção da simbiose micorrízica. Desta forma, acredita-se que a aplicação destes compostos via óleo essencial extraído de plantas micossimbiontes possa auxiliar no crescimento de fECM em condições de excesso de metais.

No entanto, até o presente momento, inexistem trabalhos mostrando o efeito da utilização de óleos essenciais de plantas micossimbiontes no estímulo ao



crescimento fúngico em condições de excesso de metais pesados. Assim, nesse trabalho o objetivo foi determinar se o óleo essencial de *E. grandis* contribui no crescimento e tolerância de fungos ectomicorrízicos aos metais pesados cobre, zinco e níquel em meio de cultura líquido.

## 5.3 Material e métodos

### 5.3.1 Isolados ectomicorrízicos

Foram utilizados como inóculo fECM das espécies *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) fornecidos pelo banco de fungos do Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes isolados foram utilizados por apresentarem crescimento significativamente superior aos demais isolados quando incubados na presença do óleo essencial de *E. grandis* (Capítulo I) e pelo fato do gênero *Pisolithus* apresentar grande diversidade genética e adaptação ecológica (JUNGHANS et al., 1998; OLIVEIRA; GIACHINI, 1999).

Os isolados foram mantidos em meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado MNM em pH 5,8 (MARX, 1969), em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, sendo multiplicados a partir de culturas da coleção, através de repicagens para o meio da mesma composição, sob condições assépticas.

### 5.3.2 Obtenção do óleo essencial de *E. grandis*

A extração do óleo essencial foi realizada através da técnica de hidrodestilação, utilizando-se folhas frescas de eucalipto, segundo a metodologia proposta por Vitti e Brito (2003).

Para a extração do óleo, as folhas frescas de *E. grandis* foram pesadas em amostras de 100 g, as quais foram cortadas com tesoura em pedaços de aproximadamente 2 cm e, posteriormente, colocadas em balão volumétrico, completando-se o volume do balão de hidrodestilação com, aproximadamente, 600 mL de água destilada. Em seguida, realizou-se o procedimento para obtenção do óleo essencial em aparelho de Clevenger modificado (SERAFINI; CASSEL, 2001) durante 3 horas, mantendo-se água destilada em ebulição dentro do balão com aquecedor externo.

Os componentes líquidos vegetais extraídos, após a passagem por um condensador, foram coletados e mantidos sob refrigeração a 4°C até sua utilização.

### 5.3.3 Efeito do óleo essencial de *E. grandis* no crescimento *in vitro* de isolados ectomicorrízicos

Para a montagem dos ensaios, utilizou-se o meio de cultura Melin-Norkrans modificado MNM líquido (MARX, 1969) acrescido com seis concentrações de cada metal na forma de soluções de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . A precipitação dos metais no meio de cultura líquido foi evitada utilizando-se adaptação proposta por Graziotti et al. (2001), excluindo-se o  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , sendo parte do nitrogênio fornecido por  $203 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . A concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi ajustada para  $750 \text{ mg L}^{-1}$  e o pH do meio ajustado para 4,7.

As unidades experimentais constaram de Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura, nas quais foram adicionados 2 discos de 10 mm de diâmetro do micélio fúngico retirados das bordas de crescimento em meio de cultura sólido, incubados a  $26^\circ \text{C}$  sob agitação constante de 50 RPM durante 25 dias. Após o período de incubação, os micélios foram retirados dos Erlenmeyers sob filtração em papel Watman nº 3 e lavados em água corrente sobre peneira de 0,037 mm, secos em estufa de ventilação forçada durante 72 horas para posterior determinação da matéria seca.

A fim de se determinar o efeito da adição do óleo essencial de eucalipto na tolerância dos isolados ectomicorrízicos aos metais pesados, a incubação dos isolados na presença dos metais foi novamente realizada, porém, adicionando-se o óleo essencial de eucalipto ao meio de cultura.

Para isso, o óleo essencial foi solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003), obtendo-se concentração de  $20 \mu\text{L L}^{-1}$ .

Após o período de incubação, os micélios foram retirados dos Erlenmeyers sob filtração em papel Watman nº 3, lavados em água corrente sobre peneira de 0,037 mm e secos em estufa de ventilação forçada.

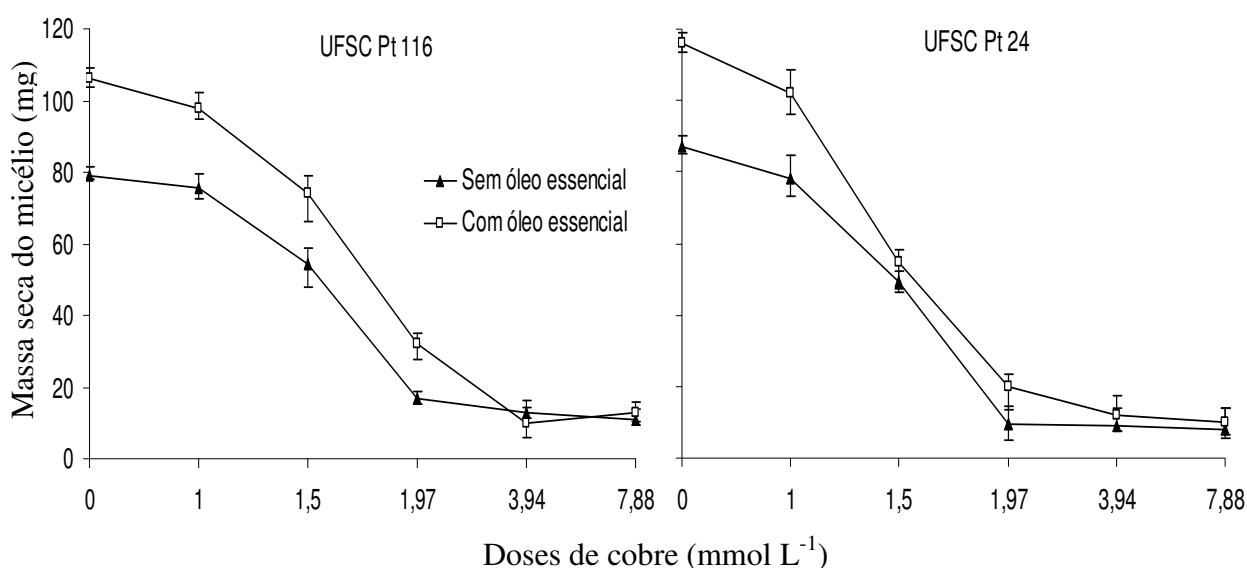
Os dados referentes à massa de micélio seco obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias de acordo com Scott e Knott (1974) pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000). A determinação da concentração do metal que inibiu o crescimento miceliano em 50% foi determinada pelo software PriProbit versão 1.63 (SAKUMA, 1998) e as equações de resposta do crescimento

fúngico em relação à concentração de metal pesado foram determinadas pelo software Systat 11 (Systat software, Inc.).

## 5.4 Resultados e discussão

O crescimento fúngico, avaliado pela massa do micélio seco de ambos isolados ectomicorrízicos apresentou redução significativa de acordo com o aumento da concentração dos metais pesados cobre, zinco e níquel nos meios de cultura líquidos (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3). De acordo com os resultados observados, a resposta dos fECM aos metais pesados foi influenciada pelo isolado, tipo de metal e sua concentração no meio de cultura.

O comportamento dos fECM *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), embora semelhante de acordo com o tipo de metal, apresentou particularidades quanto à resposta à concentração do metal no meio de cultura. Egerton-Warburton e Griffin (1995) e Graziotti et al. (2001b) demonstraram estas variações em isolados do mesmo gênero.



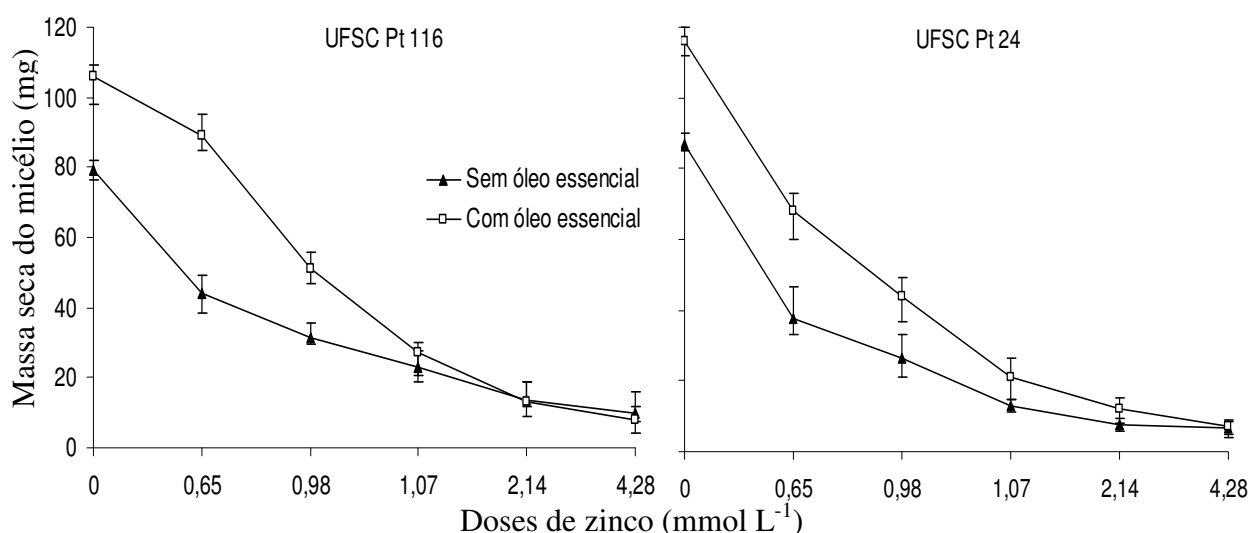
**Figura 5.1** - Massa seca do micélio dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de cobre em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Santa Maria, 2010.

Segundo Graziotti et al. (2001b), Gadd et al. (2001) e Bellion et al. (2006), diferentes isolados ectomicorrízicos podem apresentar níveis distintos de tolerância a metais pesados. Blaudez et al. (2000) descrevem que a heterogeneidade observada para fECM em relação à tolerância a metais pesados é intrínseca do isolado, não sendo influenciada por mecanismos de adaptação. Donnelly e Entry (1998) descrevem que, apesar da aparente tolerância a metais pesados observada

em determinados isolados ectomicorrízicos, de modo geral, muitos isolados são incapazes de suportar a presença do metal a longo prazo, tanto no solo como em meios de cultura.

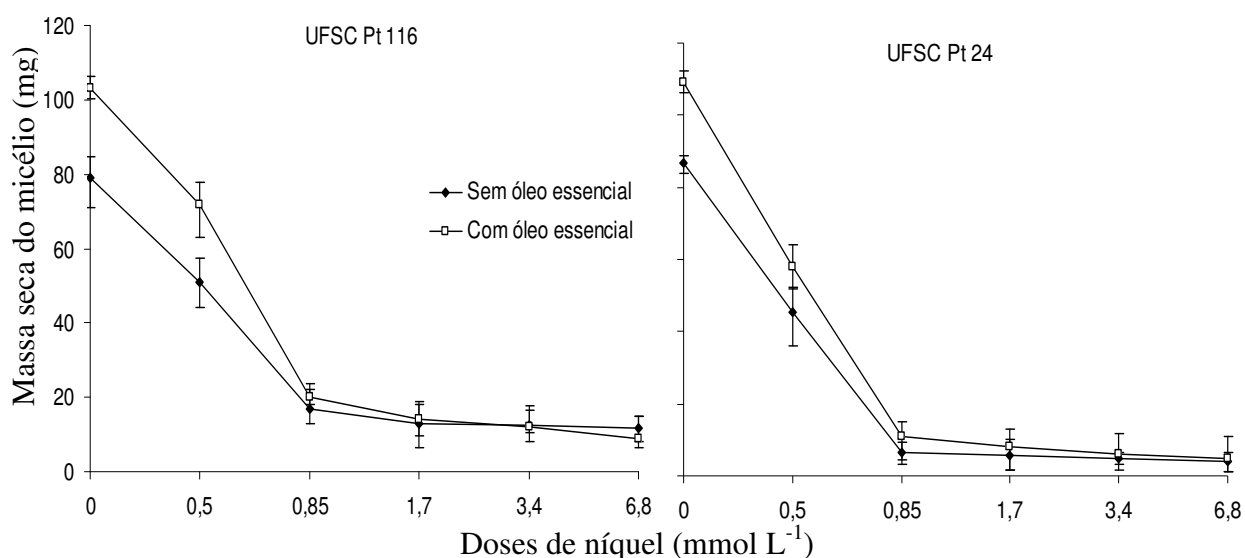
Quando da adição do óleo essencial na concentração de  $20 \mu\text{L L}^{-1}$  ao meio de cultura contendo diferentes concentrações de metais pesados, os isolados ectomicorrízicos apresentaram crescimento superior ao observado sem a presença do óleo essencial (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3).

Na presença do cobre, o isolado UFSC Pt 116 apresentou crescimento significativamente superior até a concentração de  $1,97 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 5.1). Já para o isolado UFSC Pt 24, o incremento no crescimento miceliano ocorreu até a concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , sendo o crescimento semelhante nas demais concentrações (Figura 5.1).



**Figura 5.2** - Massa seca do micélio dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de zinco em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de  $20 \mu\text{L L}^{-1}$ . Santa Maria, 2010.

Quando na presença do zinco, a adição do óleo essencial ao meio de cultura proporcionou maior crescimento miceliano até a concentração de  $0,98 \text{ mmol L}^{-1}$  para ambos isolados (Figura 5.2). Em concentrações superiores a  $0,98 \text{ mmol L}^{-1}$ , os isolados avaliados apresentaram crescimento semelhante tanto no meio de cultura contendo o óleo essencial como no meio de cultura normal, devido ao efeito tóxico do zinco ao fungo.



**Figura 5.3** - Massa seca do micélio dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de níquel em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Santa Maria, 2010.

Na presença do níquel, apenas o isolado UFSC Pt 116 apresentou resposta significativa à adição de óleo essencial ao meio de cultura até a concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$ , decaindo o crescimento fúngico em concentrações maiores.

O efeito de estímulo do crescimento dos isolados ectomicorrízicos em meio de cultura contendo metais pesados pode ter ocorrido devido à produção e excreção de ácidos orgânicos e proteínas com propriedades de formar quelatos com os metais. A maior produção de massa miceliana pelos isolados ectomicorrízicos observada quando da adição do óleo essencial ao meio de cultura (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3), pode ter ocorrido devido a mecanismos de excreção de moléculas orgânicas, principalmente de ácidos di e tri-carboxílicos, os quais formam quelatos com os íons metálicos (BELLION et al., 2006; NEHLS et al., 2010), e/ou aumento na formação de melaninas fúngicas, as quais atuam nos mecanismos de tolerância dos fECM a metais pesados (GRAZZIOTTI et al., 2001a; 2001b).

Ahonen-Jonnarth et al. (2008) observaram que em isolados ectomicorrízicos expostos a diferentes concentrações de metais pesados, há estímulo à produção de ácidos orgânicos como oxálico, cítrico, láctico, acético, propiônico, fumárico, fórmico, butírico e iso-butírico, os quais atuam nos mecanismos de quelação dos metais pesados.

A concentração de metal pesado que inibiu o crescimento fúngico em 50% ( $\text{CL}_{50}$ ) para o isolado UFSC Pt 116 foi de 1,898; 0,713 e 0,599  $\text{mmol L}^{-1}$  para o cobre, zinco e níquel, respectivamente. Já para o isolado UFSC Pt 24, a

concentração de metal correspondente ao CL<sub>50</sub> foi de 1,516, 0,550 e 0,487 599 mmol L<sup>-1</sup> para o cobre, zinco e níquel, respectivamente (Tabela 5.1).

Com a adição do óleo essencial aos meios de cultura contendo a mesma concentração de metais que inicialmente provocou redução do crescimento fúngico em 50%, o isolado UFSC Pt 116 apresentou ganho de 40,05, 66,01 e 31,65% na massa micelial quando na presença de cobre, zinco e níquel, respectivamente (Tabela 5.1). Para o isolado UFSC Pt 24, o ganho em massa micelial foi de 28,92, 55,38 e 21,80% quando foi adicionado óleo essencial de eucalipto ao meio de cultura líquido na presença de cobre, zinco e níquel, respectivamente (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1** - Resposta dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de cobre, zinco e níquel em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20 µL L<sup>-1</sup>.

Metal	Óleo essencial (µL L <sup>-1</sup> )	Equação*	CL <sub>50</sub> ** (mmol L <sup>-1</sup> )	MS micélio na CL <sub>50</sub> *** (mg)
<i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116)				
Cobre	0	$y = 0,0546x^3 + 1,9148x^2 - 27,84x + 85,087$	1,898	39,52
	20	$y = 0,3846x^3 - 0,8588x^2 - 29,646x + 112,08$		
Zinco	0	$y = -3,081x^3 + 26,751x^2 - 74,306x + 79,659$	0,713	39,16
	20	$y = -0,1485x^3 + 12,012x^2 - 72,631x + 110,74$		
Níquel	0	$y = -2,1606x^3 + 24,746x^2 - 78,212x + 78,454$	0,599	40,02
	20	$y = -2,811x^3 + 32,406x^2 - 104,39x + 104,2$		
<i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24)				
Cobre	0	$y = -0,1959x^3 + 5,3711x^2 - 40,998x + 93,946$	1,516	43,45
	20	$y = -0,3647x^3 + 8,2346x^2 - 56,7x + 124,32$		
Zinco	0	$y = -5,0691x^3 + 41,243x^2 - 102,49x + 87,252$	0,550	42,52
	20	$y = -4,3728x^3 + 39,619x^2 - 115,44x + 118,3$		
Níquel	0	$y = -5,1124x^3 + 40,442x^2 - 63,12x + 64,76$	0,487	43,02
	20	$y = -4,1124x^3 + 44,132x^2 - 71,15x + 72,06$		

\* Equação de resposta do fungo à concentração de metal no meio líquido.

\*\* Concentração de metal no meio de cultura que inibiu em 50% o crescimento miceliano.

\*\*\* Massa seca do micélio na concentração que inibiu em 50% o crescimento miceliano.

A concentração de níquel que inibiu em 50% (CL<sub>50</sub>) o crescimento dos isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 foi semelhante à observada por Ray et al. (2005) para isolados de *Pisolithus tinctorius*. No entanto, quando da adição do óleo essencial ao meio de cultura líquido, a concentração do CL<sub>50</sub> obtida neste trabalho foi superior à encontrada pelos autores. Graziotti et al. (2001b) estudando o efeito de metais pesados sobre o crescimento do fungo *P. tinctorius* (isolado Pt 306),



observaram que as concentrações de  $1,18 \text{ mmol L}^{-1}$  de cobre e de  $2,71 \text{ mmol L}^{-1}$  de zinco inibiram o crescimento fúngico em 50% ( $CL_{50}$ ). No entanto, os mesmos autores observaram estímulo ao crescimento de *P. tinctorius* quando incubado com  $0,47 \text{ mmol L}^{-1}$  de cobre. Este efeito de estímulo ao crescimento miceliano não foi observado no presente trabalho. Segundo Grazziotti et al. (2001a), a tolerância de fECM a metais pesados é dependente não somente do tipo de metal, mas do isolado ectomicorrízico utilizado.

Todavia, o micélio de Basidiomicetos pode apresentar diferenças em seu crescimento quando houver ausência de substratos sólidos, o que, em alguns casos, pode alterar a resposta de isolados de fECM a metais (HARTLEY et al., 1997).

Neste sentido, deve-se ter cuidado quanto aos resultados de sobrevivência dos isolados de fECM na presença de metais pesados em meios de cultura, visto que os meios podem, dependendo da sua constituição, precipitar os metais, reduzindo sua disponibilidade (ANGLE et al., 1992). Segundo Grazziotti et al. (2003) este é um dos motivos para a realização, em um segundo momento, de testes de toxicidade no próprio solo, a fim de determinar a real concentração de metal capaz de inibir o crescimento fúngico.

Devido à grande variação de resultados na literatura, os quais apresentam as concentrações de metais pesados capazes de limitar o crescimento de fungos mantidos tanto em meio de cultura como no solo, resultados recentes (BELLION et al., 2006) colocam em dúvida a especificação de concentrações de metais pesados, os quais causariam toxidez a fungos, sendo necessária a realização de calibrações para cada espécie ou isolado fúngico de interesse. Por este motivo, afirmações quanto à inoculação de uma espécie de fECM em uma determinada essência florestal, a qual garantiria o desenvolvimento da planta em solos contendo elevados teores de cobre, devem ser cautelosas.

## 5.5 Conclusões

O óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  em meio de cultura líquido, favorece o crescimento de isolados ectomicorrízicos na presença de cobre, zinco e níquel;

A adição do óleo essencial de *E. grandis* proporciona aumento no crescimento dos isolados ectomicorrízicos avaliados até concentrações de 3,94  $\text{mmol L}^{-1}$  de cobre, 1,57  $\text{mmol L}^{-1}$  de zinco e 0,85  $\text{mmol L}^{-1}$  níquel no meio de cultura líquido;

A presença do óleo essencial de *E. grandis* em meio de cultura líquido aumenta a tolerância dos isolados ectomicorrízicos UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 aos metais pesados cobre, zinco e níquel.

## 5.6 Referências bibliográficas

AHONEN-JONNARTH, U. et al. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentration. **New Phytologist**, Lancaster, v. 146, n. 3, p. 555-67, July 2008.

ANGLE, J. S.; McGRATH, S. P.; CHAUDRI, A. M. Effects of media components on toxicity of Cd to rhizobia. **Water, Air, & Soil Pollution**, Guelph, v. 64, n. 3-4, p. 627-633, September 1992.

BELLION, M. et al. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 254, n. 2, p. 173-181, January 2006.

BLAUDEZ, D. et al. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metal *in vitro*. **Mycological Research**, Ottawa, v. 104, n. 11, p. 1366-1371, November 2000.

COURTY, P. E. et al. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 42, n. 5, p. 679-698, May 2010.

CUMMING, J. R. et al. Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum *in vitro*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 31, n. 4, p. 703-710, April 2001.

DONNELLY, P. K.; ENTRY, J. A. Bioremediation of soils with mycorrhizal fungi. In: ADRIANDO, D. C.; BOLLAG, J. M.; FRANKENBERGER, Jr. W. T.; SIMS, R. C. **Bioremediation of contaminated soils**. Madison, Wisconsin, USA, 1998. 677p.

EGERTON-WARBURTON, L. M.; GRIFFIN, B. J. Differential responses of *Pisolithus tinctorius* to aluminum *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 73, n. 8, p. 1229-1233, August 1995.

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

FOMINA, M. et al. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Jena, v. 71, n. 1, p. 371-381, January 2005.

GADD, G. M. et al. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 204, n. 2, p. 311-316, november 2001.

GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bonn, v. 223, n. 6, p. 1115-1122, may 2006.

GRAZZIOTTI, P. H. et al. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 839-848, julho/agosto 2001a.

GRAZZIOTTI, P. H. et al. Efeito de Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 831-837, julho/agosto 2001b.

HARTLEY, J.; CAIRNEY, J. W. G.; MEHARG, A. A. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, n. 2, p. 303-319, february 1997.

JUNGHANS, D. T. et al. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 7, n. 5, p. 243-248, february 1998.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer, 2007. 450p.

KHAN, A. G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, Atlanta, v. 41, n. 1-2, p. 197-207, july 2000.

KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 7, n. 7, p. 503-514, july 2006.

MARTINS, M. A.; GONÇALVES, G. F. de; SOARES, A. C. F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1465-1471, july 2000.

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

MUCCIARELLI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, Lancaster, v. 158, n. 3, p. 579–591, June 2003.

NAVARRO-AVIÑÓ, J. P.; ALONSO, I. A.; LÓPEZ-MOYA, J. R. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. **Ecosistemas**, Alicante, v. 16, n. 2, p. 1-17, Mayo 2007.

NEHLS, U. et al. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. **Plant Biology**, Freiburg, v. 12, n. 2, p. 292-301, March 2010.

OLIVEIRA, V. L.; GIACHINI, A. J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. UFLA: Lavras, 1999. 818p.

RAY, P. et al. Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 21, n. 3, p. 309-315, April 2005.

SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 33, n. 3, p. 339-347, 1998.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, n. 372, p. 1351-1365, May 2002.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3<sup>a</sup> ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787p.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

WEATHERS, P. J.; ELKHOLY, S.; WOBBE, K. K. Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 42, p. 309-317, 2006.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, june 2007.

## 6 Capítulo IV

### Efeito do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden

#### 6.1 Resumo

O estabelecimento da maioria das essências florestais exóticas é dependente da associação das plantas com fungos ectomicorrízicos. Estes elevam a resistência das mudas aos estresses iniciais após transplante no campo, favorecendo a manutenção dos povoamentos florestais em condições adversas. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do óleo essencial de eucalipto na colonização ectomicorrízica *in situ* e no crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis*, em condições de casa de vegetação. Os tratamentos foram constituídos por cinco concentrações do óleo essencial de eucalipto e dois isolados ectomicorrízicos, além dos tratamentos controle. Foram utilizados fungos das espécies *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116). Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com oito repetições. Noventa dias após o transplante das plântulas de eucalipto para tubetes foram avaliados os parâmetros: altura da muda (cm), diâmetro do colo (mm), massa da parte aérea fresca e seca (mg), volume radicular (cm<sup>3</sup>), massa das raízes secas (mg) e porcentual de colonização ectomicorrízica. A inoculação de ambos os isolados ectomicorrízicos proporcionou aumentos significativos tanto na massa fresca como na massa seca da parte aérea das mudas de eucalipto. A utilização do óleo essencial de eucalipto no crescimento de mudas de eucalipto micorrizadas apresentou resposta de dose-efeito, dependendo do isolado ectomicorrízico utilizado. A utilização do óleo essencial de eucalipto nas concentrações de 20 a 40 µL L<sup>-1</sup> proporcionou aumentos na parte aérea e nas raízes das mudas de eucalipto. O óleo essencial de *E. grandis* mostrou-se eficiente no estímulo à colonização ectomicorrízica das mudas de eucalipto, porém, quando aplicado em concentrações acima de 40 µL L<sup>-1</sup>, resultou em diminuição do crescimento das mudas.

**Palavras-chave:** ectomicorrizas; simbiose; eucalipto; metabólitos secundários.

## 6.2 Introdução

O êxito na formação de povoamentos florestais é diretamente proporcional à qualidade das mudas das essências florestais utilizadas, sendo que estas devem apresentar vigor suficiente para resistir ao estresse inicial após o transplante (GOMES et al., 2002; TREVISAN et al., 2007). Em decorrência disso, busca-se alternativas tecnológicas para produção de mudas de qualidade (PERA; PARLADÉ, 2005). Segundo Bâ et al. (2010) o estabelecimento da maioria das essências florestais exóticas somente é possível devido à associação das plantas com fungos ectomicorrízicos (fECM) capazes de proporcionar as condições necessárias para a manutenção das plantas no campo.

Segundo Brundrett (2009), a grande maioria das essências florestais necessitam de micorrizas para sua nutrição. Em virtude disso, a micorrização controlada apresenta-se como uma ferramenta fundamental, tornando possível o estabelecimento de mudas florestais em solos com condições de deficiência de nutrientes ou mesmo na presença de alguns poluentes (BRUNNER, 2001; PERA; PARLADÉ, 2005; SMITH; READ, 2008).

Dentre os fungos do solo capazes de formar associações ectomicorrízicas, os do gênero *Pisolithus* apresentam ampla distribuição geográfica, sendo capazes de formar associação simbiótica com aproximadamente 450 espécies florestais, especialmente as de interesse econômico pertencentes às famílias Pinaceae e Myrtaceae (CHAMBERS; CAIRNEY, 1999; PEREIRA et al., 2005; SMITH; READ, 2008). Devido a isto, o gênero *Pisolithus* é um dos mais utilizados em estudos quanto à colonização micorrízica e em programas de micorrização controlada (BURGESS et al., 1995; PEREIRA et al., 2005; YUWA-AMORNPITAK, 2009).

Embora os fungos do gênero *Pisolithus* possuam a habilidade de formar basidiósporos *in situ* e disseminem seus esporos no solo das comunidades florestais consolidadas (BRUNDRETT et al., 1996), devem ser inoculados na produção de mudas em larga escala nos viveiros florestais, garantindo a simbiose entre fungo e planta, resultando em mudas florestais com maior vigor e aptas para o transplante a campo (PERA; PARLADÉ, 2005).

Além do aumento da absorção de água e nutrientes minerais proporcionado pelas micorrizas às plantas (TARKKA et al., 2005; SMITH; READ, 2008), é reconhecido também o papel dos fungos micorrízicos no controle biológico de



determinados patógenos de raízes (WHIPPS, 2004), no aporte de substâncias reguladoras do crescimento vegetal (BARKER; TAGU, 2000), na sobrevivência das mudas após o transplante para o campo (MELLO et al., 2009), nas interações com microrganismos da rizosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), na ciclagem de nutrientes e manutenção de comunidades florestais (HÖGBERG; HÖGBERG, 2002; HOBBIE, 2006) e no aumento do crescimento vegetal (SOUZA, 2003; SILVA et al., 2003; SOUZA et al., 2006; ALVES et al., 2010).

No Brasil, apesar do crescente interesse pelo cultivo de essências florestais, os programas de micorrização controlada ainda são limitados, apresentando grandes possibilidades de expansão e de melhoria da qualidade das mudas produzidas (PEREIRA et al., 2005). Nos programas de reflorestamento, o controle da micorrização, desde a seleção do isolado ectomicorrízico a ser utilizado até a inoculação deste na semeadura de espécies florestais, é de fundamental importância para o sucesso no estabelecimento das plantas após o transplante e para a manutenção da estabilidade de comunidades florestais (ANDREAZZA et al., 2004; SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2006).

Os trabalhos encontrados na literatura sobre a otimização da colonização ectomicorrízica e, conseqüentemente, sobre o maior desenvolvimento das plantas inoculadas, baseiam-se nos modos de inoculação e dosagens utilizadas (ROSSI et al., 2002, 2007; PERA; PARLADÉ, 2005), colonização consorciada (PARLADÉ et al., 1999; BONNASSIS, 2007), especificidade micorrízica (MEIJER, 2001; DUÑABEITIA et al., 2004; GIACHINI et al., 2004; MELLO et al., 2006; SOUZA et al., 2008) e inoculação das plantas com mais de um isolado (PROBANZA et al., 2001; DORMENECH et al., 2004; RINCÓN et al., 2005).

A associação de fungos mutualistas com o sistema radicular de plantas hospedeiras representa uma estratégia adaptativa do vegetal. A produção e o acúmulo de determinados metabólitos secundários dos vegetais desempenham papel fundamental durante o processo (ZHI-LIN et al., 2007). Wenke et al. (2010) ao descreverem as funções dos compostos voláteis no solo, demonstram a importância destes nas interações formadas entre microrganismos e entre microrganismos e plantas. Segundo Ryabushkina (2005) e Wenke et al. (2010) os compostos voláteis exudados pelas raízes devem ser considerados como sinais bioquímicos essenciais para a manutenção de ecossistemas.

A presença destes sinais bioquímicos ou “moléculas verdes” estimula a fase pré-simbiótica, desencadeando as mudanças fisiológicas e morfológicas tanto no fungo como na planta (BÉCARD et al., 2004 ; AKIYAMA et al., 2005; ZHI-LIN et al., 2007). No entanto, os relatos sobre a utilização de compostos voláteis vegetais no estímulo à colonização micorrízica são raros (LUDLEY et al., 2008, 2009), sendo necessários estudos mais aprofundados, a fim de se determinar o efeito da aplicação destes extratos em mudas florestais.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação do óleo essencial de eucalipto na colonização ectomicorrízica e no crescimento de mudas de *E. grandis* em condições de casa de vegetação.

### 6.3 Material e métodos

O experimento objetivou avaliar o efeito da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto na colonização ectomicorrízica *in situ* e no crescimento de mudas de *E. grandis*, em condições de casa de vegetação. Os tratamentos foram constituídos por cinco concentrações do óleo essencial de eucalipto e dois isolados ectomicorrízicos, além dos tratamentos controle. Para o desenho experimental, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições.

#### 6.3.1 Obtenção do óleo essencial de *Eucalyptus grandis*

A extração do óleo essencial foi realizada através da técnica de hidrodestilação das folhas frescas de eucalipto. Inicialmente, foram coletadas as folhas de eucalipto segundo a metodologia proposta por Vitti e Brito (2003). As folhas frescas foram cortadas em pedaços de 2 cm, pesadas e separadas em lotes individuais de 100 g. Posteriormente, as folhas foram colocadas em balão volumétrico no aparelho de Clevenger modificado (SERAFINI; CASSEL, 2001), mantendo-se água destilada em ebulição dentro do balão volumétrico com aquecedor externo. Os componentes vegetais líquidos extraídos, após a passagem por um condensador, foram coletados e mantidos sob refrigeração a 4° C, até sua utilização.

#### 6.3.2 Sementes

As sementes de *E. grandis* foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO. Para a desinfestação das sementes, as mesmas foram imersas em etanol (70%) durante 30 segundos, sob agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada estéril para retirada do residual de etanol. Posteriormente, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (1%) durante 30 segundos e lavadas três vezes em água destilada estéril, para retirada do residual de hipoclorito.

Após a assepsia das sementes, estas foram pré-germinadas em placas de Petri contendo solução de germinação de ácido bórico (3  $\mu\text{M}$ ), glicose (2 g L<sup>-1</sup>),

sulfato de cálcio ( $500 \mu\text{M}$ ) e ágar ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ), a pH 5,7 (Figura 6.1), conforme metodologia descrita por Bonnassis (2007).



Foto: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 6.1** - Plântulas de *Eucalyptus grandis* pré-germinadas em meio de cultura.

### 6.3.3 Isolados ectomicorrízicos

Utilizou-se como inóculos os fECM das espécies *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116), fornecidos pelo banco de fungos do Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Para formação do inóculo básico, os isolados foram mantidos em meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado MNM em pH 5,8 (MARX, 1969), em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. O material foi colocado em estufa a  $26^\circ \text{C}$  e, posteriormente, multiplicado através de repicagens para o meio da mesma composição, sob condições assépticas.

### 6.3.4 Produção do inóculo de fungo ectomicorrízico

Para produção do inoculante vegetativo de fECM utilizou-se uma adaptação da técnica descrita por Chávez et al. (2009), sendo realizadas suspensões micelianas dos isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 em 50 mL de meio Melin-Norkrans modificado MNM líquido (MARX, 1969) em Erlenmeyers de 150 mL, a partir de discos de 10 mm de diâmetro obtidos das culturas em placa, seguindo-se de incubação a  $26^\circ \text{C}$ , durante 30 dias. Após este período, o conteúdo dos Erlenmeyers foi separado por isolado e fragmentado em 200 mL de meio MNM

líquido, em liquidificador, durante 10 segundos, e misturado a 300 mL de turfa esteril, em bequer de 1000 mL. Após a fragmentação do micélio fúngico e sua homogeneização no substrato, este foi acondicionado em incubadora a 26° C, até o momento da utilização.

### 6.3.5 Preparação dos tubetes

Em casa de vegetação, tubetes cônicos de PVC de 100 cm<sup>3</sup> foram dispostos sobre telado utilizado em viveiros comerciais e preenchidos 90% do seu volume com turfa. A turfa utilizada como substrato foi produzida pela empresa Turfa Fértil S.A. A composição do substrato apresentou pH em água 5,8; cálcio 25,9 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; magnésio 4,7 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al 2,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC efetiva 31,1; matéria orgânica 12%; argila 9%; potássio 176 mg dm<sup>-3</sup> e fósforo 11,3 mg dm<sup>-3</sup>. Antes do transplante das plântulas, o substrato foi esterilizado em autoclave a 121° C durante 60 minutos, três vezes consecutivas, com um intervalo de 24 horas entre cada esterilização.

Preenchidos os tubetes, estes foram irrigados a fim de adensar a turfa no seu interior, chegando esta a um volume aproximado de 80% do tubete. Após este processo, completou-se o volume restante dos tubetes com a turfa inoculada com os isolados ectomicorrízicos, mantendo-se o substrato úmido até o momento do transplante das plântulas de eucalipto.

### 6.3.6 Germinação e crescimento inicial de mudas de *E. grandis* micorrizadas

Decorrido o período de germinação das sementes, as plântulas de eucalipto foram transplantadas para tubetes de plástico de 100 cm<sup>3</sup>, contendo turfa inoculada com fECM. Após o transplante, os tubetes permaneceram sobre telado em casa de vegetação. A reposição da umidade foi realizada adicionando-se diariamente água destilada aos tubetes, sendo aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951) em intervalos de 25 dias.

Para avaliação do efeito da concentração do óleo essencial de eucalipto sobre o desenvolvimento das plântulas, solubilizou-se o óleo essencial em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003). Aplicou-se sobre o substrato de cada tubete, 3 mL do óleo solubilizado

nas concentrações de 0, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$ , em intervalos de 7 dias a contar da data de transplante das plântulas.

### 6.3.7 Avaliações

As avaliações foram realizadas aos 90 dias após o transplante das plântulas sendo avaliados os parâmetros: altura da muda (cm), diâmetro do colo (mm), massa da parte aérea fresca e seca (mg), volume radicular ( $\text{cm}^3$ ), massa das raízes secas (mg) e porcentual de colonização ectomicorrízica.

Para a determinação da massa da parte aérea fresca e seca, as plantas foram cortadas no nível do substrato. Em seguida, foi pesada a parte aérea, caracterizando a massa da parte aérea fresca. As raízes foram separadas do substrato e lavadas com água destilada. O diâmetro do colo foi determinado com auxílio de paquímetro universal e o volume radicular pelo método de deslocamento de água, adaptando-se metodologia utilizada para solos (EMBRAPA, 1997).

Para a determinação da porcentagem de colonização radicular, utilizou-se a técnica das intersecções de Giovanetti e Mosse (1980), modificado por Brundrett et al. (1996), onde as raízes, previamente separadas do substrato, foram lavadas cuidadosamente em água corrente. As raízes foram cortadas em pedaços de 2 cm e conservadas em solução de FAA (5% de formalina a 40%, 5% de ácido acético e 90% de álcool etílico a 50%), segundo Kormanik e MC Grow (1982), até o momento da avaliação.

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

As raízes e a parte aérea das plantas foram colocadas em sacos de papel individuais, os quais foram levados à estufa a 65° C, onde permaneceram até os tecidos vegetais atingirem peso constante, efetuando-se a determinação da massa da parte aérea seca e massa de raízes secas.

Os dados de altura da muda, diâmetro do colo, massa da parte aérea fresca e seca, volume radicular, massa de raízes secas e porcentual de colonização

ectomicorrízica foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000).

## 6.4 Resultados e discussão

Analisando-se os resultados referentes à altura e ao diâmetro do colo das mudas de eucalipto submetidas à aplicação do óleo essencial de *E. grandis*, observou-se que este interferiu no crescimento das mudas, dependendo da concentração do óleo e do isolado ectomicorrízico utilizado. As mudas inoculadas com o fECM *P. microcarpus* (UFSC Pt 116) e submetidas à adição do óleo essencial de eucalipto nas concentrações de 30, 40 e 50  $\mu\text{L L}^{-1}$ , apresentaram altura significativamente superior em relação às demais. Já para o diâmetro do colo, não houve diferença significativa quando da utilização do óleo essencial nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Tabela 6.1).

Para o fungo *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), a aplicação do óleo essencial de eucalipto na concentração de 20 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  proporcionou aumentos significativos na altura das mudas e no diâmetro do colo, respectivamente, embora as concentrações de 20 e 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  não tenham apresentado diferença significativa para a altura das mudas (Tabela 6.1).

**Tabela 6.1** - Altura das mudas e diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus grandis* aos 90 dias após a micorrização e o início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de oito repetições (n = 8). Santa Maria, 2010.

Tratamento / Concentração	Altura das mudas (cm)				
	0 $\mu\text{L L}^{-1}$	20 $\mu\text{L L}^{-1}$	30 $\mu\text{L L}^{-1}$	40 $\mu\text{L L}^{-1}$	50 $\mu\text{L L}^{-1}$
Sem fungo	18,02 b B*	18,35 b B	19,70 b A	19,00 c AB	18,81 c AB
UFSC Pt 116	24,80 a B	24,88 a B	25,94 a AB	27,80 a A	26,80 a AB
UFSC Pt 24	24,42 a B	26,17 a A	25,61 a A	25,30 b AB	24,48 b AB
CV (%)**	4,42	5,56	4,91	3,94	5,15
Diâmetro do colo (mm)					
Sem fungo	1,72 b B*	1,77 b B	2,00 c A	1,72 c B	1,79 c B
UFSC Pt 116	2,52 a B	2,67 a B	2,94 a A	2,92 a A	2,70 a B
UFSC Pt 24	2,42 a AB	2,46 a AB	2,62 b AB	2,67 b A	2,40 b B
CV (%)**	6,26	7,82	3,40	2,87	6,74

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

\*\* Coeficiente de variação

A altura e o diâmetro do colo demonstram o efeito de concentração do óleo essencial sobre os isolados ectomicorrízicos (Tabela 6.1). Observou-se maior desenvolvimento das mudas nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Com a utilização do óleo na concentração de 50  $\mu\text{L L}^{-1}$ , começou a ocorrer decréscimo no



crescimento das mudas, evidenciando o efeito antagonista do óleo essencial quando em concentrações elevadas (BATISH et al., 2004; ZANELATTO et al., 2009).

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os encontrados por Ludley et al. (2009), os quais descrevem que a resposta de fECM à presença de metabólitos secundários dos vegetais não está condicionada apenas à concentração dos compostos presentes, mas ao gênero, à espécie e até mesmo ao isolado micorrízico exposto a estes compostos.

Analisando-se os resultados referentes apenas à inoculação de fECM nas mudas de *E. grandis*, evidencia-se que a inoculação resultou em plantas com maior desenvolvimento, visto que as ectomicorrizas, através de seu manto fúngico, podem absorver e armazenar glicogênio, proteínas e lipídios, além dos nutrientes inorgânicos, como N, P, K e Ca (SMITH; READ, 2008). Outro efeito observado corresponde à influência do óleo essencial aplicado nas mudas não micorrizadas, onde a concentração de 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  proporcionou plantas maiores e com caule mais desenvolvido (Tabela 6.1). Desta forma, assim como foi observado no capítulo II deste trabalho, a aplicação do óleo essencial nas mudas de *E. grandis* pode ter ocasionado tanto modificações enzimáticas e/ou fisiológicas no vegetal, devido à ativação de elicitores, como pela inibição seletiva de microrganismos associados à rizosfera das mudas, os quais estariam associados a estresses bióticos ao seu crescimento, ou promoção do desenvolvimento de microrganismos capazes de produzir hormônios vegetais, como citocininas, giberelinas e ácido indol-3-acético e vitaminas, como riboflavina, niacina e vitamina B12, que contribuem para o crescimento vegetal (LEINHOS; VACEK, 1994), sendo chamados de microrganismos “helpers” (DUPONNOIS; GARBAYE, 1990).

O crescimento vegetal ocorrido nos tratamentos onde houve a adição do óleo essencial de eucalipto também pode estar associado à presença de compostos fenólicos e terpenos, os quais atuam no estímulo ao crescimento da planta devido, não somente à presença de hormônios, mas também de componentes de membrana, além de atuarem na síntese de glicoproteínas e como transportadores de açúcares na parede celular (TAIZ; ZEIGER, 2004).

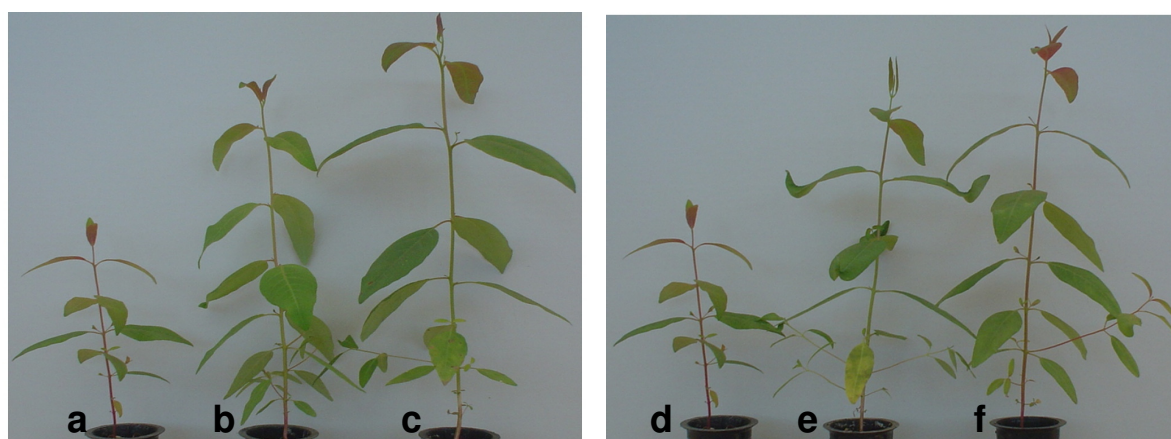
A figura 6.2 demonstra a diferença observada em mudas de *E. grandis* não inoculadas e inoculadas com diferentes isolados de fECM (Figura 6.2a, 6.2b e 6.2c) e o efeito da aplicação do óleo essencial na concentração de 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  em mudas não micorrizadas, em relação ao tratamento controle (Figura 6.2d, e 6.2e). Já a

figura 6.3 demonstra as diferenças observadas quando foi aplicado óleo essencial de eucalipto nas mudas micorrizadas com diferentes isolados ectomicorrízicos. Houve incremento na altura das mudas quando foi realizada inoculação com o isolado UFSC Pt 116 e efeito da utilização do óleo essencial (Figura 6.3a, 6.3b e 6.3c), assim como incremento na altura das mudas quando foi realizada inoculação com o isolado UFSC Pt 24 e efeito da utilização do óleo essencial (Figura 6.3d, 6.3 e 6.3f).



Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 6.2** - Mudanças de *Eucalyptus grandis* submetidas aos tratamentos controle (a), UFSC Pt 116 (b) e UFSC Pt 24 (c) e aos tratamentos controle (d) e aplicação de  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto (e). Santa Maria, 2010.



Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 6.3** - Mudanças de *Eucalyptus grandis* submetidas aos tratamentos controle (a), UFSC Pt 116 (b) e UFSC Pt 116 +  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto (c) e aos tratamentos controle (d) UFSC Pt 24 (e) e UFSC Pt 24 +  $20 \mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de eucalipto (f). Santa Maria, 2010.

Souza (2003) e Smith e Read (2008) consideram que as medidas de diâmetro do colo têm pouca utilidade para avaliar o efeito da inoculação na fase inicial de

desenvolvimento das plantas, pois a resposta inicial da colonização micorrízica está associada ao aumento de captação e aproveitamento de água e nutrientes, tendo maior reflexo na produção de ramos e folhas. Desta forma, observou-se que os benefícios oriundos da inoculação, tanto para os parâmetros de altura e diâmetro do colo (Tabela 6.1) como para massa fresca e seca da parte aérea, foram maiores nos tratamentos onde ocorreu a inoculação dos isolados fúngicos aliada à aplicação do óleo essencial de eucalipto, quando comparados ao tratamento controle, o qual não foi inoculado (Tabela 6.2).

**Tabela 6.2** - Massa fresca e seca da parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis* aos 90 dias após a micorrização e o início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de oito repetições (n = 8). Santa Maria, 2010.

Tratamento / Concentração	Massa fresca da parte aérea (mg)				
	0 $\mu\text{L L}^{-1}$	20 $\mu\text{L L}^{-1}$	30 $\mu\text{L L}^{-1}$	40 $\mu\text{L L}^{-1}$	50 $\mu\text{L L}^{-1}$
Sem fungo	1240 b C*	1640 c AB	1710 b A	1470 c B	1490 b B
UFSC Pt 116	2640 a B	2740 b B	2940 a AB	3190 a A	2750 a B
UFSC Pt 24	2800 a AB	3040 a A	2680 b B	2670 b B	2830 a AB
CV (%)**	6,74	4,05	6,96	5,92	4,98
Tratamento / Concentração	Massa seca da parte aérea (mg)				
	0 $\mu\text{L L}^{-1}$	20 $\mu\text{L L}^{-1}$	30 $\mu\text{L L}^{-1}$	40 $\mu\text{L L}^{-1}$	50 $\mu\text{L L}^{-1}$
Sem fungo	343 b C*	591 c A	584 b A	595 c A	523 c B
UFSC Pt 116	824 a C	850 b C	894 a B	956 a A	843 a C
UFSC Pt 24	856 a B	918 a A	869 a B	797 b B	780 b C
CV (%)**	2,96	4,48	3,89	3,98	2,66

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

\*\* Coeficiente de variação

Avaliando-se o efeito da inoculação micorrízica, verificou-se que a utilização de ambos os isolados proporcionou aumentos significativos tanto na massa fresca como na massa seca da parte aérea das mudas (Tabela 6.2). Esses dados corroboram com os encontrados por Souza (2004) e Silva et al. (2007), os quais trabalhando com *Eucalyptus* spp. verificaram maior crescimento da parte aérea em plantas inoculadas com fECM.

Para as mudas não micorrizadas, a adição do óleo essencial nas concentrações de 20 a 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  resultou em plantas mais desenvolvidas, de acordo com o maior acúmulo de tecidos (Tabela 6.2). Já nas mudas inoculadas com isolados ectomicorrízicos, a adição do óleo essencial nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  resultou em plantas mais desenvolvidas, quando inoculadas com os isolados UFSC Pt 24 e UFSC Pt 116, respectivamente (Tabela 6.2). Estes resultados podem

ter ocorrido devido a interações entre o óleo essencial e a planta, resultando em incrementos no crescimento vegetal. Mafia et al. (2005) e Bonaldo et al. (2007) descrevem que a aplicação de óleos essenciais sobre as plantas resulta na ativação de mecanismos de defesa latentes ou reguladores do crescimento, como fitoalexinas e citocininas.

O valor de massa seca da planta é considerado a variável mais útil para medir o efeito de tratamentos sobre o crescimento das plantas (BONNASSIS, 2007). Desta forma, a adição do óleo essencial, em determinadas concentrações, mostrou-se eficiente no crescimento de mudas de eucalipto em condições de viveiro. Também observou-se que as plantas referentes aos tratamentos onde houve inoculação com fungos e adição do óleo essencial de eucalipto nas mudas apresentaram maior desenvolvimento radicular. As mudas inoculadas com os isolados micorrízicos apresentaram maior volume radicular quando foi adicionado óleo essencial de eucalipto na concentração de  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  (Tabela 6.3). As mudas inoculadas com o isolado UFSC Pt 116 apresentaram maior massa seca das raízes quando submetidas à aplicação do óleo essencial de eucalipto na concentração de  $40 \mu\text{L L}^{-1}$ . Já, as mudas inoculadas com o isolado UFSC Pt 24 não apresentaram diferença significativa com relação à aplicação do óleo essencial (Tabela 6.3).

**Tabela 6.3** - Massa seca das raízes e volume radicular de mudas de *Eucalyptus grandis* aos 90 dias após a micorrização e o início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. Média de oito repetições (n = 8). Santa Maria, 2010.

Tratamento / Concentração	Massa seca das raízes (mg)				
	$0 \mu\text{L L}^{-1}$	$20 \mu\text{L L}^{-1}$	$30 \mu\text{L L}^{-1}$	$40 \mu\text{L L}^{-1}$	$50 \mu\text{L L}^{-1}$
Sem fungo	137,6 b B*	170,8 b A	155,8 b AB	140,6 b B	140,4 b B
UFSC Pt 116	216,0 a B	215,8 a B	219,8 a B	252,0 a A	221,0 a B
UFSC Pt 24	213,4 a A	199,4 b B	207,0 ab B	213,4 ab A	223,4 a A
CV (%)**	7,12	8,09	8,17	9,05	7,27
Tratamento / Concentração	Volume radicular ( $\text{cm}^3$ )				
	$0 \mu\text{L L}^{-1}$	$20 \mu\text{L L}^{-1}$	$30 \mu\text{L L}^{-1}$	$40 \mu\text{L L}^{-1}$	$50 \mu\text{L L}^{-1}$
Sem fungo	0,873 a B*	1,019 b AB	1,009 b AB	1,017 b AB	0,868 b B
UFSC Pt 116	1,315 a B	1,193 a B	1,303 a B	1,344 a A	1,162 a B
UFSC Pt 24	1,271 a AB	1,129 b B	1,154 b B	1,292 a A	1,280 a AB
CV (%)**	9,15	10,59	7,12	7,33	7,27

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

\*\* Coeficiente de variação

Segundo Narloch (2002) a colonização micorrízica promove alterações fisiológicas e trocas especializadas entre os simbiossiontes, estabelecendo um novo

equilíbrio microbiano na região de influência da raiz colonizada. Desta forma, plantas cujo sistema radicular esteja habitado por microrganismos benéficos, como no caso de rizobactérias e fungos micorrízicos, apresentam crescimento superior ao crescimento de plantas cultivadas em substratos estéreis (BANCHIO et al., 2009).

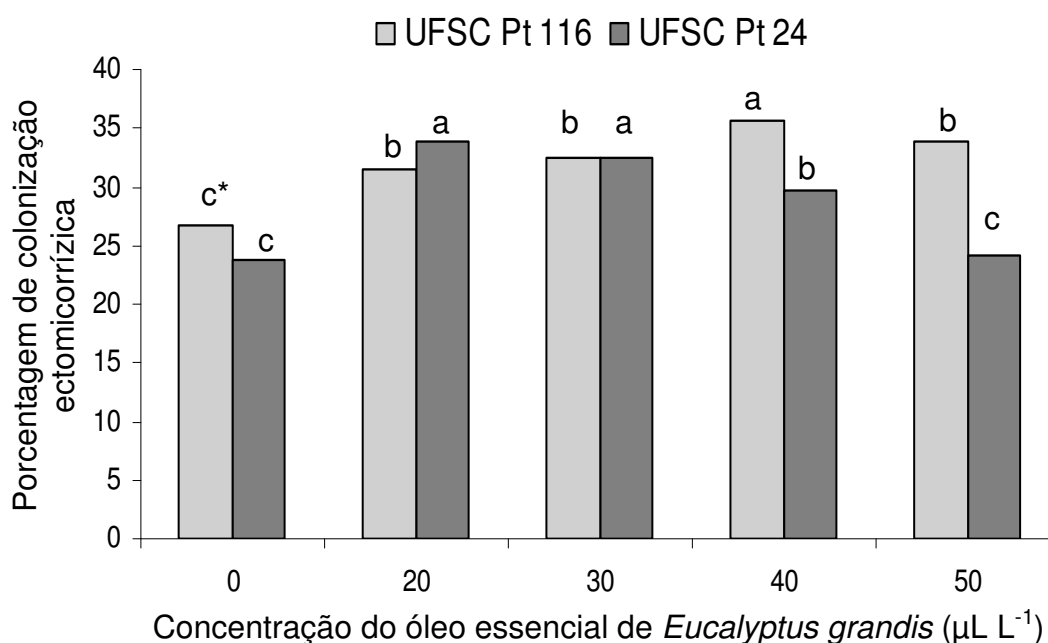
Baptista et al. (1999), em estudos quanto à produção de compostos fenólicos durante a simbiose ectomicorrízica, descrevem que compostos fenólicos vegetais induzem genes catabólicos em diversos microrganismos, assim como genes atuantes na formação e manutenção das simbioses com plantas. Estes compostos agem direta ou indiretamente na sinalização entre planta hospedeira e microrganismo, interferindo no metabolismo vegetal.

Para o estabelecimento da simbiose micorrízica é necessário a presença de metabólitos secundários da planta hospedeira. Após formada a associação, o fungo continua desencadeando na planta mecanismos de defesa, os quais permanecem estimulando a produção de compostos fenólicos responsáveis pela regulação desta simbiose. Larose et al. (2002) observaram alterações prolongadas na concentração de flavonóides metabolizados por plantas colonizadas por fungos micorrízicos. Segundo Luo et al. (2009) apenas fungos capazes de formar associação ectomicorrízica possuem capacidade de suportar o estresse osmótico decorrente da simbiose fungo-planta, devido à presença dos metabólitos secundários na micorrizosfera.

A transdução de sinal observada no processo de simbiose é semelhante à observada no processo de patogênese de plantas. Mas, no caso da simbiose (a exemplo dos fECM) a resposta de defesa da planta é temporária e significativamente inferior, cessando após o estabelecimento da associação (GARCIA-GARRIDO; OCAMPO, 2002; HAHLBROCK et al., 2003; HAUSE; FESTER, 2005). Desta forma, acredita-se que o efeito de estímulo ao crescimento das plantas inoculadas e que receberam o óleo essencial esteja relacionado, entre outros fatores, ao estímulo à colonização micorrízica, visto que, apesar da adição destes compostos ao meio ter ocorrido de forma artificial, estes foram extraídos de planta formadora de associação ectomicorrízica, podendo conter assim, sinais bioquímicos envolvidos na formação e manutenção da simbiose micorrízica. Conforme os dados observou-se que a aplicação do óleo essencial de eucalipto na concentração de  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  resultou em

aumentos significativos na porcentagem de colonização ectomicorrízica de plantas inoculadas com o isolado UFSC Pt 116, e que a adição do óleo essencial nas concentrações de 20 e 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  resultou em aumentos significativos na porcentagem de colonização ectomicorrízica de plantas inoculadas com o isolado UFSC Pt 24 (Figura 6.4).

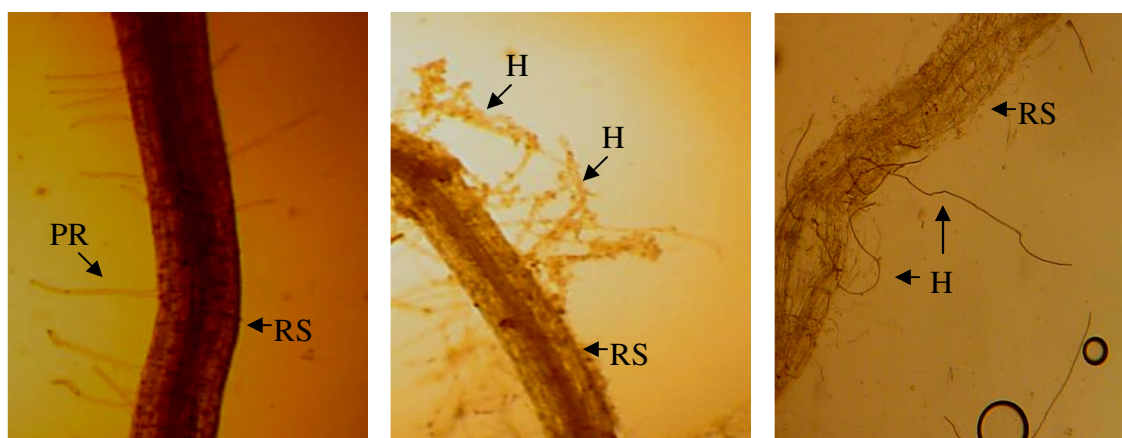
Observou-se também que o efeito alelopático do óleo essencial sobre a colonização ectomicorrízica foi mais evidente no isolado UFSC Pt 24, quando houve aplicação do óleo essencial em concentrações acima de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Figura 6.4).



**Figura 6.4** - Porcentagem de colonização ectomicorrízica das raízes de *Eucalyptus grandis* aos 90 dias após a micorrização e o início da aplicação de diferentes concentrações do óleo essencial de eucalipto. \*Médias seguidas pela mesma letra, em cada isolado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. UFSC Pt 116 CV (%) 4,14. UFSC Pt 24 CV(%) 4,81. Santa Maria, 2010.

Copetta et al. (2006) avaliando a relação existente na interface fungo micorrízico e óleo essencial em plantas de *Ocimum basilicum* L., observaram que a alteração nos componentes do óleo essencial influenciou a porcentagem de colonização das raízes. Os autores atribuíram este efeito à concentração de determinados componentes, os quais atuam na interface fungo-planta. Mucciarelli et al. (2003) observaram aumento na colonização *in vitro* e *in vivo* de fungos endofíticos não micorrízicos, quando da utilização do óleo essencial de *Mentha piperita* L..

Analisando-se a morfologia das raízes colonizadas (Figura 6.5), observou-se a presença de hifas partindo das raízes, não sendo observada a presença de alterações morfológicas características da simbiose ectomicorrízica. De acordo com Agerer (2001) o número de hifas e as características destas enquadram a associação como pequena. De acordo com Kranabetter et al. (2009) este tipo de exploração das hifas representa a maior proporção entre as formas de associação, tanto em plantas com baixa como alta porcentagem de colonização ectomicorrízica.



Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

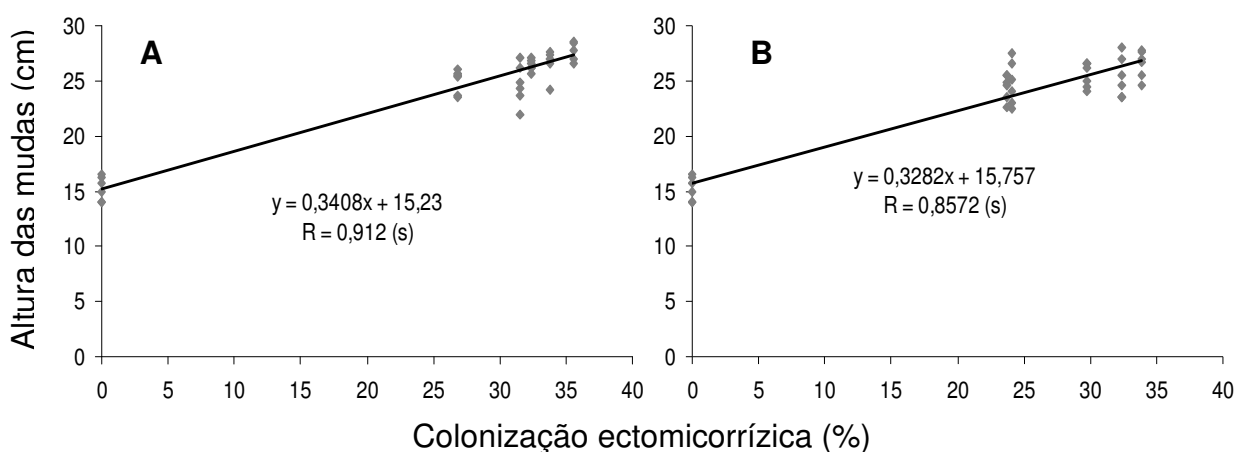
**Figura 6.5** - Raízes de *Eucalyptus grandis* colonizadas pelo fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) aos 90 dias após a inoculação. PR = Pêlo radicular, RS = Raiz secundária, H = hifa do fungo. Santa Maria, 2010.

Considerando-se os benefícios que a aplicação do óleo essencial proporcionou às mudas de eucalipto micorrizadas, resultando em plantas mais desenvolvidas, ficou evidente o efeito benéfico da aplicação do óleo essencial, visto que este estimulou a colonização ectomicorrízica (Figura 6.4), resultando em plantas de maior porte e com maior massa seca (Figuras 6.6 e 6.7).

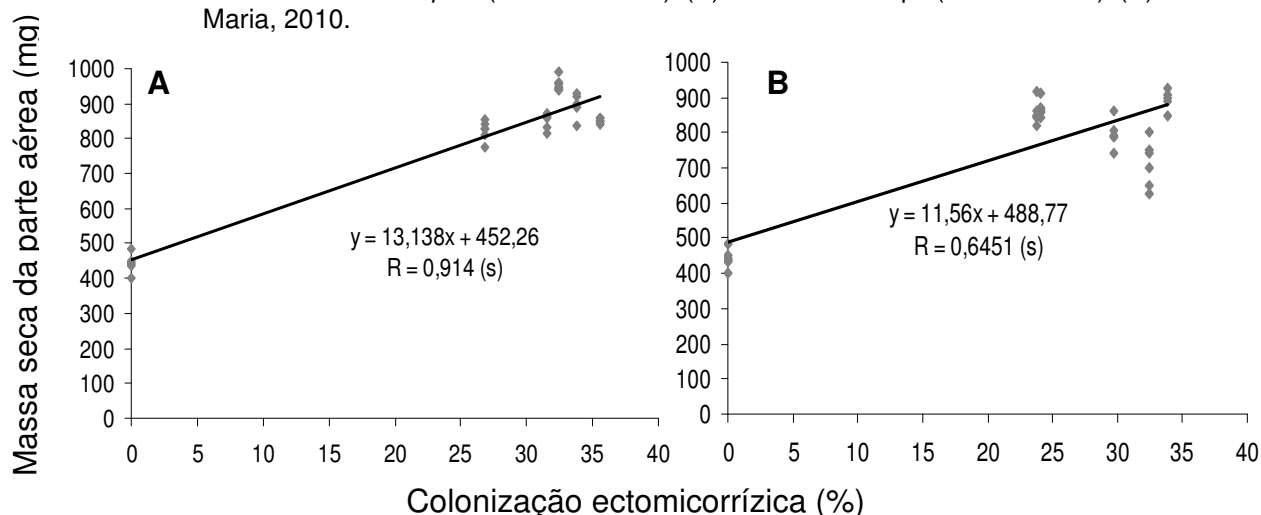
O aumento na colonização ectomicorrízica resultou em incrementos no crescimento vegetal de forma diferenciada, dependendo do isolado ectomicorrízico utilizado. Quando as mudas foram inoculadas com o fungo *P. microcarpus* (UFSC Pt 116), verificou-se que quanto maior a colonização ectomicorrízica, mais homogêneo o crescimento da planta tanto em altura como em massa seca. Já, quando da utilização do fungo *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), a resposta de crescimento das plantas em relação ao aumento da colonização ectomicorrízica foi mais heterogêneo, principalmente para a massa seca da parte aérea das plantas.

De forma geral, os efeitos da utilização dos óleos essenciais, tanto alelopáticos como sinérgicos, podem ser atribuídos aos compostos fenólicos e

terpenos, com ênfase aos monoterpenos e sesquiterpenos presentes na composição dos metabólitos secundários de plantas bioativas (HAHLBROCK et al., 2003; BATISH et al., 2004; RYABUSHKINA et al., 2007; ZHI-LIN et al., 2007).



**Figura 6.6** - Correlação entre a colonização ectomicorrízica e a altura das mudas de *Eucalyptus grandis*, aos 90 dias após o transplante, inoculadas com os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) (A) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) (B). Santa Maria, 2010.



**Figura 6.7** - Correlação entre a colonização ectomicorrízica e a massa seca da parte aérea das mudas de *Eucalyptus grandis*, aos 90 dias após o transplante, inoculadas com os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) (A) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) (B). Santa Maria, 2010.

Apesar dos estudos utilizando-se óleos essenciais de plantas bioativas estarem sendo realizados em grande número nos últimos anos, o conhecimento sobre a ação destes óleos na fisiologia de fECM e sua influência na simbiose com plantas micossimbiontes ainda é escasso. Todavia, com base nos resultados obtidos neste trabalho, fazem-se inferências sobre as possíveis ações do óleo essencial de eucalipto, ou de compostos presentes neste, em alguns pontos referentes ao



desenvolvimento dos isolados como: ação nos mecanismos de estimulação trófica, através da promoção do desenvolvimento de substâncias utilizadas como substratos para os fECM; produção de enzimas que facilitam a penetração das hifas fúngicas no córtex da raiz, tais como enzimas pectinolíticas e celulolíticas; ou lise de compostos fenólicos produzidos pelos fECM, os quais limitam seu próprio desenvolvimento. No entanto, apesar da evidente promoção no crescimento de mudas de *E. grandis* e no estímulo à colonização ectomicorrízica, estudos bioquímicos são necessários para a elucidação das reais funções do óleo essencial de eucalipto na interação fungo-planta.

Quanto à possibilidade de utilização comercial de metabólitos secundários de plantas bioativas<sup>1</sup> na agricultura, Zhi-Lin et al. (2007) descrevem que, em curto prazo, a engenharia metabólica manipulará sinais bioquímicos de origem vegetal, a fim de serem utilizados na formação de associações micorrízicas em larga escala.

---

<sup>1</sup> Segundo Schiedeck (2006) plantas bioativas refere-se a espécies vegetais que tem ação sobre outros seres vivos, manifestando efeito pela sua presença naquele espaço ou pelo uso direto de substâncias delas extraídas, mediante uma intenção ou significado humano.

## 6.5 Conclusões

O óleo essencial de eucalipto nas concentrações de 20 a 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  proporciona aumento no crescimento da parte aérea e nas raízes das mudas de eucalipto;

A colonização ectomicorrízica em mudas de eucalipto é estimulada na presença do óleo essencial de eucalipto até a concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ ;

Concentrações do óleo essencial acima de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  reduzem o crescimento das mudas de eucalipto.

## 6.6 Referências bibliográficas

AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, p. 824–827, june 2005.

ALVES, L.; OLIVEIRA, V. L. de; SILVA FILHO, G. N. Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 41, n. 3, p. 676-684. outubro 2010.

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. 51-59, dezembro 2004.

AGERER, R. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 11, n. 2, p. 107-114, june 2001.

BÂ, A. M. et al. Management of ectomycorrhizal symbionts associated to useful exotic tree species to improve reforestation performances in tropical Africa. **Annals of Forest Science**, Champenoux, v. 67, n. 3, p. 298-307, may 2010.

BANCHIO, E. et al. Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 57, n. 2, p. 653-657, january 2009.

BAPTISTA, M. J. et al. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, outubro 1999.

BARKER, S. J.; TAGU, D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dresden, v. 19, n. 2, p. 144-154, june 2000.

BATISH, D. R. et al. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection**, Washington, v. 23, n. 12, p. 1209-1214, december 2004.

BÉCARD, G. et al. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 82, n. 8, p. 1186-1197, august 2004.

BONNASSIS, P. A. P. **Caracterização de isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção do crescimento e na colonização radicular de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2007, 69f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Canberra, ACIAR, 1996. 374p.

BRUNDRETT, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 320, n. 1-2, p. 37-77, july 2009.

BRUNNER, I. Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zürich, v. 4, n. 1, p. 13-27, june 2001.

BURGESS, T. et al. Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. **Planta**, Bonn, v. 195, n. 3, p. 408-417, january 1995.

CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. G. *Pisolithus*. In: CAIRNEY, J. W. G.; CHAMBERS, S. M. (Eds.). **Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile**. Berlin, Springer-Verlag, 1999. p.1-31.

CHÁVEZ, D. M.; PEREIRA, G. C.; MACHUCA, Á. H. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. **Bosque**, Valdivia, v. 30, n. 1, p. 4-9, enero/abril 2009.

COPETTA, A.; LINGUA, G.; BERTA, G. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilium* L. var. Genovese. **Mycorrhiza**, Dijon Cedex, v. 16, n. 7, p. 485-494, october 2006.

DOMENECH, J. et al. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. ballota: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. **Forest Ecology and Management**, Victoria, v. 194, n. 1-3, p. 293-303, june 2004.

DUÑABEITIA, M. K. et al. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 14, n. 1, p.11-18, february 2004.

DUPONNOIS, R.; GARBAYE, J. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 68, p. 2148-2152, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997, 212p.

EMBRAPA. Embrapa Florestas. **Dedicação à pesquisa florestal**. Colombo, 2003, 54p.

FABROWSKI, F. J. et al. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* R. T. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 95-106, june 2003.

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

GARCÍA-GARRIDO, J. M.; OCAMPO, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, n. 373, p. 1377-1386, june 2002.

GIACHINI, A. J.; SOUZA, L. A. B.; OLIVEIRA, V. L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 14, n. 6, p. 375-381, december 2004.

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

GOMES, J. M. et al. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 655-664, novembro/dezembro 2002.

HAHLBROCK, K. et al. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 2, p. 14569-14576, november 2003.

HAUSE, B.; FESTER, T. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Planta**, Bonn, v. 221, n. 2, p. 184-196, may 2005.

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

HOBBIE, E. A. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. **Ecology**, Davis, v. 87, n. 3, p. 563-569, march 2006.

HÖGBERG, M. N.; HÖGBERG, P. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. **New Phytologist**, Lancaster, v. 154, n. 3, p. 791-795, june 2002.

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, setembro 2002.

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

KRANABETTER, J. M.; DURALL, D. M.; MACKENZIE, W. H. Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 19, n. 2, p. 99-111, february 2009.

LAROSE, G. et al. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal of Plant Physiology**, Irvine, v. 159, n. 12, p. 1329-1339, december 2002.

LEINHOS, V.; VACEK, O. Biosynthesis of auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). **Microbiology Research**, Beijing, v. 149, p. 31-35, 1994.

LUDLEY, K. E. et al. Differential response of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal mycelium from coniferous forest soils to selected monoterpenes. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 40, n. 3, p. 669-678, march 2008.

LUDLEY, K. E. et al. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forest is revealed by novel experimental system. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 41, n. 1, p. 117-124, january 2009.

LUO, Z. B. et al. Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. **Plant Physiology**, Urbana, v. 151, n. 4, p. 1902-1917, december 2009.

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

MARX, D. H. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In: THE MARCUS WALLENBERG FOUNDATION SYMPOSIUM, 7. 1991, Stockolm. **Proceedings...**Wallenberg Foundation, 1991, p. 54-90.

MEIJER, A. A. R. de. Mycological work in the Brazilian State of Paraná. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 72, n. 1-2, p.105-159, february 2001.

MELLO, A. H. de et al. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 293-301, julho/setembro 2006.

MELLO, A. H. de et al. Estabelecimento a campo de mudas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas com *Pisolithus microparcus* (UFSC Pt 116) em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 149-155, abril/junho 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ªEd. Editora UFLA. 2006. 729p.

MUCCIARELLI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, Lancaster, v. 158, n. 3, p. 579–591, june 2003.

NARLOCH, C. **Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos - fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L.** 2002, 171f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

PARLADÉ, J.; ALVAREZ, I. F.; PERA, J. Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp.. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 8, n. 4, p.189-195, january 1999.

PERA, J.; PARLADÉ, J. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. **Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales**, Madrid, v. 14, n. 3, p. 419-433, 2005.

PEREIRA, O. L. et al. Compatibility and ectomycorrhiza formation among *Pisolithus* isolates and *Eucalyptus* spp.. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 337-344, maio/junho 2005.

PROBANZA, A. et al. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. **Microbial Ecology**, Rockville, v. 41, n. 2, p.140-148, february 2001.

RINCÓN, A. et al. Colonization of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. **FEMS Microbiology Ecology**, Aberdeen, v. 51, n. 3, p. 303-311, february 2005.

ROSSI, M. J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V. L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 59, n. 2-3, p. 175-181, july 2002.

ROSSI, M. J.; FURIGO JUNIOR, A.; OLIVEIRA, V. L. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 45, n. 3, p. 277-286, september 2007.

RYABUSHKINA, N. A. Synergism of metabolite action in plant responses to stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 52, n. 4, p. 547-552, july 2005.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.



**Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.

SCHIEDECK G. **Aproveitamento da biodiversidade regional de plantas bioativas para a sustentabilidade dos agricultores de base ecológica na região sul do RS.** Projeto de Pesquisa do Macroprograma 6 – Apoio ao Desenvolvimento da Agricultura Familiar e à Sustentabilidade do Meio Rural. EMBRAPA clima Temperado. Pelotas: texto mimeografiado, 2006.

SILVA, R. F. da et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 9-17, setembro/dezembro, 2003.

SILVA, M. A. et al. Formação de ectomicorrizas por monocários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 917-929, setembro/outubro 2007.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis.** 3ª ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008. **Silviculture-se.** Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

SOUZA, L. A. B. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden.** 2003, 117f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

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

SOUZA, V. C. de et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612–618, julho/setembro 2006.

SOUZA, L. A. B. de et al. Novos isolados de fungos ectomicorrízicos e o crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 235-241, fevereiro 2008.

TARKKA, M.; NEHLS, V.; HAMPP, R. Physiology of ectomicorrhiza (ECM). **Progress in Botany**, Verlag, v. 66, p. 247-276, february 2005.

TREVISAN, R. et al. Efeito da intensidade de desbaste nas características dendrométricas e tecnológicas da madeira de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 377-387, outubro/dezembro 2007.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

WENKE, K.; KAI, M.; PIECHULLA, B. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. **Planta**, Bonn, v. 231, n. 3, p. 499-506, february 2010.

WHIPPS, J. M. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 82, n. 8, p. 1198–1227, august 2004.

YUWA-AMORNPITAK, T. Molecular characterization of ectomycorrhizal fungi associated on eucalyptus root system in Masharakham Province. **Journal of Science and Technology Mabarakham University**, v. 28, n. 1, p. 101-109, 2009.

ZANELATO, M. et al. The essential oils in agriculture as an alternative strategy to herbicides: a case study. **International Journal of Environment and Health**, Roma, v. 3, n. 2, p. 198-213, 2009.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, june 2007.

## 7 Capítulo V

### Utilização do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.)

#### 7.1 Resumo

Apesar da consolidação do conhecimento sobre os benefícios decorrentes da associação micorrízica, poucos são os trabalhos de pesquisa relacionados à simbiose com espécies florestais nativas. Os metabólitos secundários extraídos de espécies florestais formadoras de ectomicorrizas podem estimular a simbiose entre fungos ectomicorrízicos e espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do óleo essencial de eucalipto na formação de associação ectomicorrízica e no crescimento de mudas de sibipiruna, em condições de casa de vegetação. Decorridos 90 dias de crescimento, as mudas foram coletadas e avaliou-se a estatura das plantas, diâmetro do colo, comprimento de raízes, massa seca da parte aérea e porcentagem de colonização micorrízica. A aplicação do óleo essencial de eucalipto favoreceu a ocorrência de associação ectomicorrízica, com *Pisolithus microcarpus* em mudas de sibipiruna, proporcionando maior desenvolvimento da parte aérea das mudas, não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos quanto ao comprimento das raízes.

**Palavras-chave:** Plantas nativas; *Pisolithus microcarpus*; metabólitos secundários.

## 7.2 Introdução

Dentre as inter-relações biológicas estabelecidas no solo, a simbiose entre planta e microrganismos heterotróficos, como o caso das micorrizas, destaca-se pelos benefícios proporcionados à produção vegetal. As micorrizas são consideradas a simbiose de maior expressão ecológica e econômica entre fungos do solo e raízes de plantas superiores (SMITH; READ, 2008), representando alternativa para o estabelecimento de mudas a campo e para a manutenção e estabilidade das florestas (OLIVEIRA et al., 2008). Os fungos ectomicorrízicos (fECM) são importantes agentes estruturadores de comunidades florestais, favorecendo a sucessão e resiliência, especialmente durante períodos de alterações climáticas (SMITH; READ, 2008). Estes microrganismos interagem com espécies vegetais formando associação simbiótica mutualista, resultando em benefícios, como maior absorção de água e nutrientes e proteção das plantas a estresses bióticos e abióticos (KHAN, 2001; GRAZZIOTTI et al., 2001; FENG et al., 2002; SILVA et al., 2003a; PERA; PARLADÉ, 2005; ZEPPA et al., 2005; GOHRE; PASZKOWSKI, 2006).

Apesar da consolidação do conhecimento sobre os benefícios decorrentes da associação micorrízica, poucos são os trabalhos de pesquisa relacionados à simbiose com espécies florestais nativas. Avaliando a simbiose ectomicorrízica *in vitro* de espécies florestais nativas, Silva (2007) observou associação de isolados ectomicorrízicos com as espécies canafístula (*Peltophorum dubium* Sprengel.), angico-vermelho (*Parapiptadinia rigida* Benth.) e timbaúva (*Enterolobium contostisiliquum* Vell.). Estudando a ocorrência natural de associação micorrízica em espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul, Andrezza et al. (2008) observaram somente a presença de fungos micorrízicos arbusculares associados às raízes das espécies araucária (*Araucaria angustifolia* Bertol.), timbaúva, canafístula, ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* Mart. ex DC), ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* Vell.) e grápia (*Apuleia leiocarpa* Vog.). Conforme estes autores, o conhecimento sobre a associação entre espécies florestais nativas no estado gaúcho e fungos ectomicorrízicos pode representar uma alternativa para o estabelecimento, sustentabilidade e desenvolvimento destas espécies arbóreas.

No entanto, os fECM parecem formar simbiose apenas com espécies florestais específicas, limitando a ocorrência dessa associação (SMITH; READ,

2008). Contudo, não há um consenso sobre a ocorrência de ectomicorrizas em espécies florestais nativas do Brasil, sendo considerada rara esta associação em condições naturais (OLIVEIRA et al., 2008). E, para espécies florestais nativas como a sibipiruna, trabalhos relacionados a colonização micorrízica são raros ou inexistem.

Esse comportamento resulta do fato de que muitas espécies, ou mesmo isolados de fECM, apresentam seletividade em relação a determinadas espécies vegetais (SMITH; READ, 2008), permitindo a dependência do fungo na presença de sinais bioquímicos específicos, produzidos pela planta hospedeira (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa relação ocorre em associações compatíveis (SOUZA et al., 2006), onde o sistema radicular das plantas sintetiza e disponibiliza metabólitos secundários preferenciais do fungo que atuam como sinais bioquímicos favoráveis ao quimiotropismo (BAPTISTA et al., 1999; FEUGEY et al., 1999). Assim, a utilização dos metabólitos produzidos por plantas simbiontes, como o eucalipto, pode ser uma alternativa tecnológica para estimular o estabelecimento dessa associação nas espécies florestais nativas do Brasil.

A utilização de metabólitos secundários na forma de óleos essenciais de plantas de eucalipto pode causar efeito antagônico a determinadas espécies de microrganismos (BATISH et al., 2008) e alelopátia a determinadas espécies vegetais (CRUZ et al., 2000; FERREIRA; AQUILA, 2000; GOETZE; THOMÉ, 2004). No entanto, dependendo da concentração de determinados compostos, poderá ocorrer relações de sinergismo, proporcionando a indução do crescimento de microrganismos ou plantas (BLUM, 1999; MAIRESSE, 2005). A partir desse efeito, alguns trabalhos têm mostrado a bioestimulação dos óleos essenciais no desenvolvimento microbiano (MARTINS et al., 2000) e em espécies vegetais (ALVES et al., 2004; BONALDO et al., 2007). Entretanto, não há relatos na literatura mostrando o efeito da aplicação do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. na bioestimulação da colonização ectomicorrízica de espécies florestais nativas.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de *E. grandis* na estimulação da associação ectomicorrízica e no crescimento de mudas de sibipiruna.

## 7.3 Material e métodos

### 7.3.1 Obtenção e preparo das sementes

As sementes de sibipiruna foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO. Para a desinfestação das sementes, as mesmas foram imersas em etanol (70%) durante 30 segundos, sob agitação. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito de sódio (1%) durante 30 segundos e lavadas três vezes em água destilada estéril, para retirada do residual de hipoclorito. Após a assepsia, as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri contendo solução de germinação composta por ácido bórico ( $3 \mu\text{M}$ ), glicose ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ), sulfato de cálcio ( $500 \mu\text{M}$ ) e ágar ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) a pH 5,7, conforme metodologia descrita por Bonnassis (2007).

### 7.3.2 Obtenção do óleo essencial de *E. grandis*

A extração do óleo essencial foi realizada através da técnica de hidrodestilação das folhas frescas de eucalipto (VITTI; BRITO, 2003). As folhas coletadas foram cortadas em pedaços de 2 cm, pesadas e separadas em lotes individuais de 100 g. Posteriormente, as folhas foram colocadas em balão de fundo redondo no aparelho de Clevenger modificado (SERAFINI; CASSEL, 2001), mantendo-se água destilada em ebulição dentro do balão, por meio de aquecedor externo. Os componentes vegetais extraídos, após a passagem do destilado por um condensador, foram coletados e mantidos sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ , até sua utilização.

### 7.3.3 Preparo do inoculante vegetativo de fECM

Utilizou-se o fECM *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt116), mantido em meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado MNM em pH 5,8 (MARX, 1969), em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, em estufa a  $26^{\circ}\text{C}$ .

Para produção do inoculante vegetativo de fECM, adaptou-se a técnica descrita por Chávez et al. (2009). Inicialmente, foram realizadas suspensões micelianas do isolado UFSC Pt116, em 50 mL de meio MNM líquido, em erlenmeyers de 150 mL, a partir de discos de 10 mm de diâmetro obtidos de culturas

puras, mantidas em meio sólido, seguindo-se de incubação a 26° C, durante 30 dias. Após esse período, o conteúdo dos erlenmeyers foi fragmentado em liquidificador, contendo 200 mL de meio MNM líquido, durante 10 segundos, e misturado a 300 mL de turfa estéril, em bequer de 1000 mL, sendo posteriormente acondicionado em incubadora a 26° C até o momento da utilização.

#### 7.3.4 Montagem e condução dos ensaios

Em casa de vegetação, foram utilizados vasos plásticos de cultivo com 1000 cm<sup>3</sup>, os quais tiveram 90% do seu volume preenchido com turfa. A mesma apresentou pH em água 5,8; cálcio 25,9 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; magnésio 4,7 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al 2,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC efetiva 31,1; matéria orgânica 12%; argila 9%; potássio 176 mg dm<sup>-3</sup> e fósforo 11,3 mg dm<sup>-3</sup>. O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a 121° C, durante 60 minutos, por duas vezes consecutivas.

Os vasos foram irrigados a fim de adensar a turfa no seu interior, chegando esta a um volume aproximado de 80% do vaso. Após este processo, estabeleceu-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos: a) não inoculado e sem aplicação de óleo essencial (controle), b) não inoculado + aplicação do óleo essencial (óleo), c) inoculação e sem aplicação do óleo essencial (inoculado) e d) inoculado + aplicação do óleo essencial (inoculado + óleo), com sete repetições. Para os tratamentos com inoculação, completou-se o volume restante dos vasos com o inoculante vegetativo, mantendo-se o substrato úmido até o momento do transplante das plântulas. Para os tratamentos sem inoculação, os vasos foram preenchidos somente com turfa esterilizada.

Decorrido o período de germinação das sementes, as plântulas de sibipiruna com dois pares de folhas definitivas foram transplantadas para os vasos de cultivo. A reposição da umidade foi realizada adicionando-se diariamente água destilada. Aplicou-se solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951) em intervalos de 25 dias.

O óleo essencial foi solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003). Sobre o substrato dos tratamentos correspondentes, foram aplicados 5 mL do óleo solubilizado na concentração de 40 µL L<sup>-1</sup>, nos períodos de 0, 7 e 14 dias a contar da data de transplante das plântulas.

### 7.3.5 Avaliações

As avaliações foram realizadas aos 90 dias após o transplante, sendo determinados e analisados os seguintes parâmetros: diâmetro do colo (mm), estatura da muda (cm), massa seca da parte aérea (mg), comprimento de raízes (cm), porcentagem de colonização radicular e contribuição efetiva dos tratamentos para a altura e massa seca da parte aérea e formação de ectomicorrizas.

O diâmetro do colo foi determinado utilizando-se um paquímetro universal. A estatura foi determinada com régua milimetrada, sendo obtida pela distância do colo da planta até a extremidade das últimas axilas foliares. Posteriormente, as plantas foram cortadas rente ao substrato e colocadas, individualmente, em sacos de papel devidamente identificados e levados à estufa a 65° C, onde permaneceram até peso constante, efetuando-se a determinação da massa seca da parte aérea em balança analítica com precisão de 0,01 g. O comprimento das raízes foi determinado pela distância entre o colo da planta e o ápice da raiz.

Para a determinação da porcentagem de colonização radicular, empregou-se a técnica das intersecções de Giovanetti e Mosse (1980), modificado por Brundrett et al. (1996). A contribuição efetiva dos tratamentos (CET) expressa a contribuição porcentual do tratamento em relação ao controle, sendo calculada pela fórmula:  $CET (\%) = [(PCT - PST) / PST] * 100$ , onde P: parâmetro analisado (altura ou MSPA); CT: com tratamento (óleo, fungo, ou óleo + fungo) e ST: sem tratamento (controle).

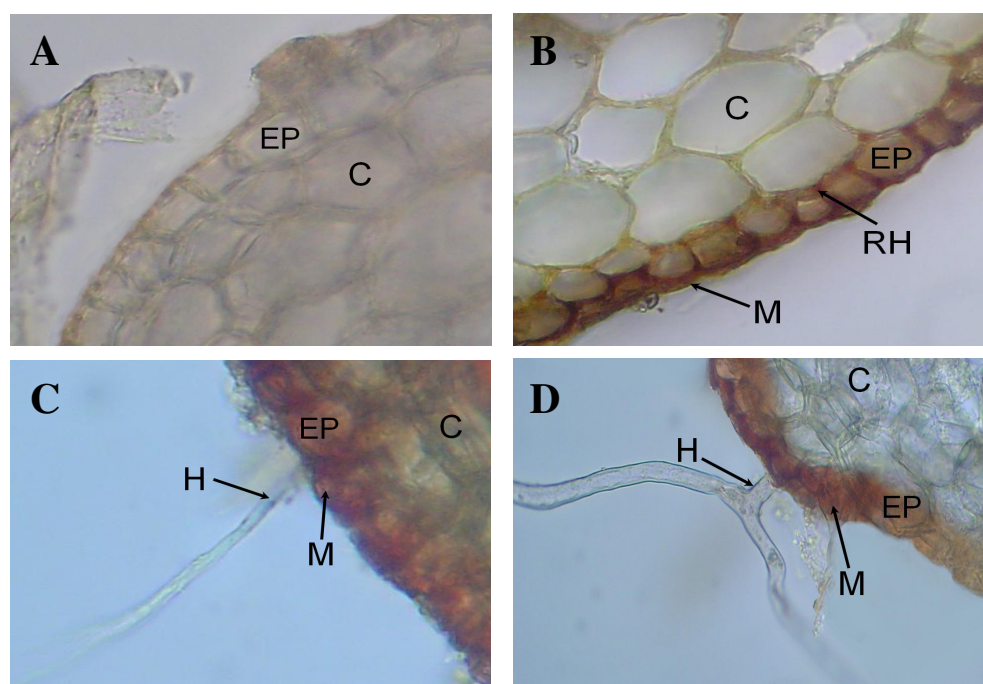
A formação de ectomicorrizas foi avaliada por meio das características anatômicas das raízes, sendo realizados cortes histológicos transversais das raízes adventícias e confecção de lâminas. A avaliação da morfologia interna foi realizada em microscópio óptico, detectando-se a presença de manto fúngico e rede de Hartig (Brundrett et al., 1996).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando da significância dos efeitos apontados pela análise, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000), tomando-se como base os níveis de significância maiores que 95% ( $P \leq 0,05$ ).



## 7.4 Resultados e discussão

Não foram observadas estruturas características da formação de ectomicorrizas nas raízes de sibipiruna não inoculadas com o fECM (Figura 7.1A). Nas raízes das plantas inoculadas e submetidas à aplicação do óleo essencial de eucalipto, observaram-se alterações na morfologia interna pela presença da rede de Hartig e do manto fúngico recobrendo a superfície das raízes (Figura 7.1B). Essas estruturas são típicas formações ectomicorrízicas e são responsáveis pelo armazenamento temporário de nutrientes e pelas trocas de nutrientes e carboidratos entre o fungo e o sistema radicular das plantas (BRUNDRETT et al., 1996; PETERSON et al., 2004).



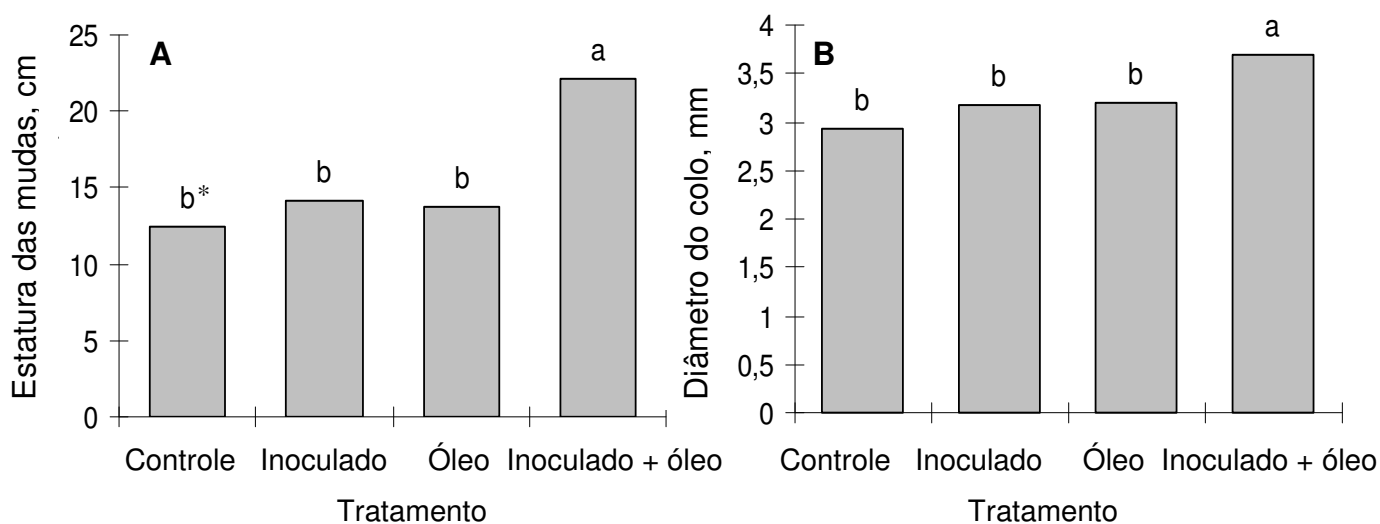
Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 7.1** - Cortes transversais de raízes de mudas de sibipiruna não inoculadas (A) e inoculadas com o fECM *Pisolithus microcarpus* e submetidas à aplicação do óleo essencial de eucalipto (B, C e D). (EP) células da epiderme, (C) células do córtex radicular, (RH) rede de Hartig, (M) manto fúngico, (H) hifa.

Observou-se a penetração de hifas fúngicas através da lamela média, a presença de hifas enoveladas nas camadas externas da epiderme (Figuras 7.1B, 7.1C e 7.1D) e a ocorrência de hifas externas, perpendiculares à raiz, a partir do manto fúngico (Figuras 7.1C e 7.1D). A formação das ectomicorrizas inicia pela

superfície das raízes e, posteriormente, pela penetração destas através das junções celulares na zona de colonização micorrízica (SOUZA et al., 2006).

A formação da associação entre o fECM e o sistema radicular no tratamento inoculado + óleo resultou em maior altura e diâmetro do colo das mudas de sibipiruna (Figuras 7.2A, 7.2B e 7.3).



**Figura 7.2** - Estatura (A) e diâmetro do colo (B) de mudas de sibipiruna submetidas aos tratamentos: controle, inoculado, óleo e inoculado mais óleo. \* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Altura das mudas (CV% 11,94), Diâmetro do colo (CV% 12,31). Santa Maria, 2010.

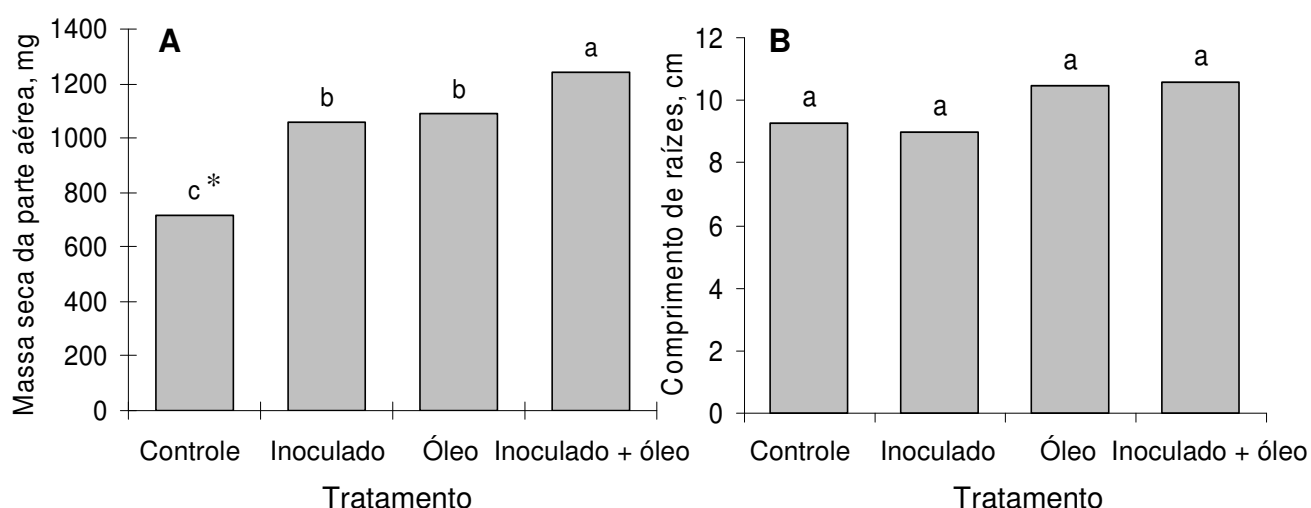


Foto: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 7.3** - Mudas de sibipiruna submetidas ao tratamento inoculado + óleo (A) e ao tratamento controle (B), 90 dias após o transplante. Santa Maria, 2010.

Esses resultados demonstram efeito positivo da aplicação do óleo essencial e da simbiose ectomicorrízica no crescimento em altura e diâmetro das mudas de sibipiruna, já que isoladamente o inóculo micorrízico e o óleo essencial não diferenciaram do controle. Resultados demonstrando o efeito positivo da associação ectomicorrízica quanto ao crescimento das plantas têm sido constantemente relatados na literatura (SILVA et al., 2003b; ANDREAZZA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008; MELLO et al., 2009).

Observou-se diferença significativa na massa seca da parte aérea das mudas de sibipiruna nos tratamentos de inoculação e aplicação de óleo essencial em relação ao controle (Figura 7.4A). A altura das mudas e a massa seca da parte aérea são consideradas os parâmetros mais importantes em estudos relacionados à eficiência de tratamentos sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (SOUZA, 2003). Os fECM são capazes de produzir substâncias que auxiliam o crescimento da planta, como hormônios de crescimento vegetal e apresentam a capacidade de armazenar metabólitos e nutrientes, funcionando como sistema de reserva para situações de escassez nutricional ou crescimento ativo de ambos (KENDRICK, 2000; SMITH; READ, 2008).



**Figura 7.4** - Massa seca da parte aérea (A) e comprimento de raízes (B) de mudas de sibipiruna submetidas aos tratamentos: controle, inoculado, óleo e inoculado + óleo. \*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Massa seca da parte aérea (CV% 14,72), comprimento de raízes (CV% 9,25).

A massa seca da parte aérea no tratamento inoculado + óleo apresentou aumento significativo em relação aos tratamentos inoculado e óleo (Figura 7.4A),

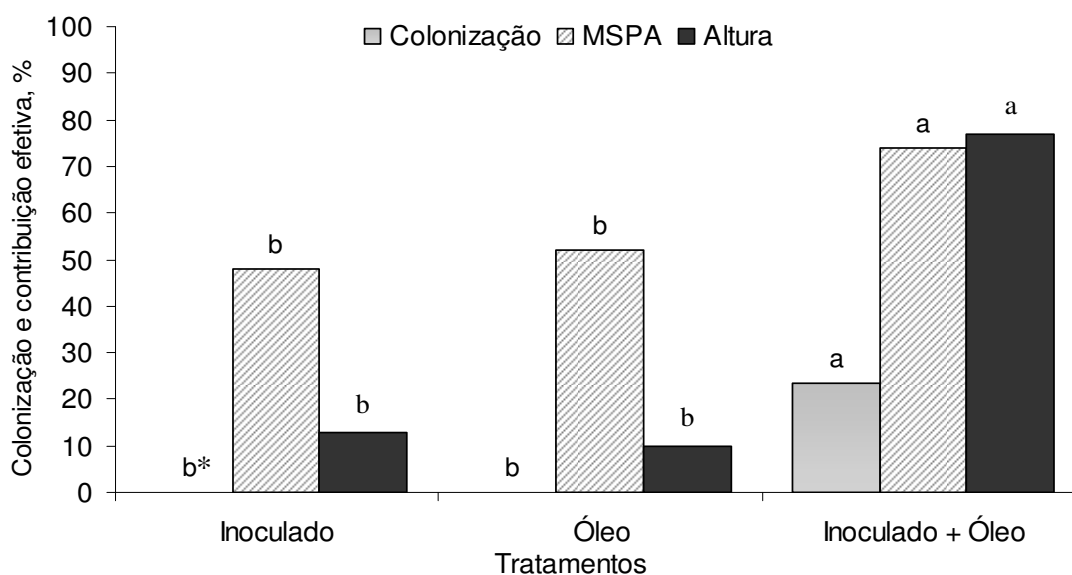
indicando a ocorrência de efeito sinérgico entre o fECM e o óleo essencial de eucalipto aplicado.

O maior valor de massa seca da parte aérea observado no tratamento óleo, em relação ao tratamento sem óleo (Figura 7.4A), pode ter ocorrido devido à introdução dos compostos fenólicos presentes no óleo, que sob condições favoráveis, podem promover direta ou indiretamente, o crescimento de plantas.

Alguns compostos vegetais são denominados de bioestimuladores, proporcionando maior produção vegetal e resistência a fatores externos (RUSSO; BERLYN, 1991). Mafia et al. (2007) e Bonaldo et al. (2007) descrevem que a aplicação de óleos essenciais sobre as plantas resulta na ativação de mecanismos de defesa latentes ou reguladores do crescimento, como fitoalexinas e citocininas. A ativação desses mecanismos pode resultar em maior desenvolvimento vegetal.

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto ao comprimento das raízes (Figura 7.4B). O maior crescimento das plantas micorrizadas se estabelece pela alongação das hifas fúngicas no solo, não sendo resultante de aumentos no comprimento radicular (SMITH; READ, 2008). Segundo estes autores, em muitos casos, plantas micorrizadas podem apresentar raízes menores em relação a plantas não micorrizadas.

Não foi observada a formação de estruturas características da associação ectomicorrízica nos tratamentos inoculado e óleo (Figura 7.5).



**Figura 7.5** - Porcentagem de colonização radicular e contribuição efetiva dos tratamentos inoculado, óleo e inoculado + óleo para a altura e massa seca da parte aérea (MSPA) das mudas de sibipiruna, em relação ao tratamento controle. \*Médias seguidas da mesma letra, nos diferentes parâmetros analisados, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Esses resultados corroboram com Oliveira et al. (2008) que consideram rara a ocorrência de associação de fECM com espécies florestais nativas do Brasil. Entretanto, no tratamento inoculado + óleo, a porcentagem de colonização radicular foi de 22% (Figura 7.5).

Essa colonização, embora possa ser classificada como baixa, conforme classificação proposta por Zangaro et al. (2002), indica a possibilidade da ocorrência de associação ectomicorrízica nas mudas de sibipiruna, quando a inoculação for condicionada por estímulos bioquímicos externos.

Nos tratamentos inoculado e óleo, as mudas de sibipiruna apresentaram contribuição efetiva de 48 e 52% na produção da massa seca da parte aérea e 13 e 10% na altura das mudas, em relação ao tratamento controle, respectivamente (Figura 7.5).

Provavelmente, esse resultado tenha sido influenciado pela adição dos metabólitos secundários, os quais podem favorecer o desenvolvimento vegetal, ou por interações entre microrganismos na rizosfera, que indiretamente, podem ter influenciado o maior desenvolvimento das mudas (BAREA et al., 2005; DUPONNOIS et al., 2008).

Contudo, no tratamento inoculado + óleo, a contribuição efetiva na massa seca da parte aérea foi de 74% e, na altura das mudas, de 77% superiores ao tratamento controle. Estes resultados reforçam a ocorrência de efeito benéfico da aplicação do óleo essencial de eucalipto sobre o estabelecimento da simbiose micorrízica e, conseqüentemente, no crescimento de mudas de sibipiruna.

Segundo Weathers et al. (2006) a pré-colonização entre o fungo micorrízico e a planta, induz no vegetal a formação e acúmulo do fosfato mycorradicin e blumenin, enzimas responsáveis pela simbiose fungo-planta. Segundo Weathers et al. (2006) e Zhi-Lin et al. (2007), tanto a mycorradicin e a blumenin, quanto os compostos fenólicos e terpenóides constituintes dos óleos essenciais, são gerados pela biossíntese do isopentenil difosfato. Desta forma, pressupõe-se que a utilização do óleo essencial extraído de planta conhecidamente micossimbionte com fECM possa influenciar na sinalização bioquímica entre os fungos micorrízicos e o sistema radicular das plantas simbiotes e das tradicionalmente não formadoras desta associação.

A observação da associação entre o fECM e o sistema radicular das plantas e sua conseqüente resposta em crescimento, evidencia a possibilidade de

micorrização de espécies florestais nativas, desde que fornecidos compostos ou soluções capazes de agir como sinalizadores bioquímicos ou fisiológicos atuantes no quimiotropismo fungo-planta. No entanto, outros trabalhos devem ser desenvolvidos a fim de elucidar os mecanismos fisiológicos e/ou bioquímicos, os quais culminaram na associação entre o fECM e o sistema radicular das mudas de sibipiruna.

## 7.5 Conclusões

A aplicação do óleo essencial de eucalipto, na concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ , estimula a ocorrência de associação ectomicorrízica em mudas de sibipiruna;

A utilização do óleo essencial de eucalipto conjuntamente com a inoculação do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* proporciona maior desenvolvimento da parte aérea de mudas de sibipiruna.

## 7.6 Referências bibliográficas

ALVES, M. da C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p.1083-1086, novembro 2004.

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. 51-59, dezembro 2004.

ANDREAZZA, R. et al. Ocorrência de associação micorrízica em seis essências florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 339-346, julho/setembro 2008.

BAPTISTA, M. J. et al. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, outubro 1999.

BAREA, J. M. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, July 2005.

BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, Melbourne, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, december 2008.

BONALDO, S. M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopatológica**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.

BONNASSIS, P. A. P. **Caracterização de isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção do crescimento e na colonização radicular de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Florianópolis, 2007, 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris – soil bioassays: some reflections. Pp.17-23. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology: Allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, 589p.



BRUNDRETT, M. et al. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Canberra, ACIAR, 1996. 374p.

CARRERA-NIEVA, A.; LÓPEZ-RÍOS, G. F. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. **Revista Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, Chapingo, v. 10, n. 2, p. 93-98, agosto 2004.

CHÁVEZ, D. M.; PEREIRA, G. C.; MACHUCA, Á. H. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. **Bosque**, Valdivia, v. 30, n. 1, p. 4-9, enero/abril 2009.

CRUZ, M. E. da S.; NOZAKI, M. de H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 15, p. 28-34, julho/agosto 2000.

DUPONNOIS, R.; GALIANA, A.; PRIN, Y. The mycorrhizosphere effect: a multitrophic interaction complex improves mycorrhizal symbioses and plant growth. In: SIDDIQUI, Z. A.; MOHD, S. A.; KAZUYOSHI, F. (Eds.) **Mycorrhizal: sustainable agriculture and forestry**. Springer Science + Business Media, Aligarh, 2008. 359p.

FABROWSKI, F. J. et al. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* R. T. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 95-106, June 2003.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, n. 12 (Edição Especial), p. 175-204, 2000.

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

FENG, G. et al. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 12, n. 4, p. 185–190, August 2002.

FEUGEY, L. et al. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. **New Phytologist**, Lancaster, v. 144, n. 3, p. 541-547, March 1999.

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

GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 43-50, janeiro/março 2004.

GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bonn, v. 223, n. 6, p. 1115-1122, may 2006.

GRAZZIOTTI, P. H. et al. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 839-848, julho/agosto 2001.

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

KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. Ontario: Mycologue Publications, 2000. 373p.

KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 7, n. 7, p. 503-514, july 2006.

MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 589-597, julho/agosto 2007.

MAIRESSE, L. A. da S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005, 340f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MARTINS, M. A.; GONÇALVES, G. F. de; SOARES, A. C. F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1465-1471, july 2000.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root

pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.

MELLO, A. H. de et al. Estabelecimento a campo de mudas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas com *Pisolithus microparcus* (UFSC Pt 116) em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 149-155, abril/junho 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ªEd. Editora UFLA. 2006. 729p.

OLIVEIRA, V. L. de.; ROSSI, M. J.; TARGHETTA, B. L. Avanços na aplicação de ectomicorrizas. In: FIGUEIREDO, M. do V. B. et al. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba:Agrolivros, 2008, 568p.

PERA, J.; PARLADÉ, J. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. **Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales**, Madrid, v. 14, n. 3, p. 419-433, 2005.

PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: NRC Research Press, 2004. 173p.

RUSSO, R. O.; BERLYN, G. P. The use of organica biostimulants to help low input sustainable agriculture. **Journal of Sustainable Agriculture**, Santa Cruz, v.1, n. 2, p. 19-42, january 1991.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.

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

SILVA, R. F. da et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 9-17, setembro/dezembro, 2003b.

SILVA, R. F. da. **Tolerância de espécies florestais Arbóreas e fungos ectomicorrízicos ao Cobre**. Santa Maria, 2007, 135p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3<sup>a</sup> ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787p.

SOUZA, L. A. B. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2003, 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SOUZA, V. C. de et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612–618, julho/setembro 2006.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

WEATHERS, P. J.; ELKHOLY, S.; WOBBE, K. K. Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Iowa, v. 42, n. 4, p. 309-317, July 2006.

ZANGARO, W. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Tibagi, Paraná. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 77-87, 2002.

ZEPPA, S. et al. *Tilia platyphyllos* Scop.-*Tuber brumale* Vittad. vs. *T. platyphyllos* Scop.- *T. borchii* Vittad. ectomycorrhizal systems: a comparison of structural and functional traits. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 7, p. 709-716, July 2005.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, June 2007.

## 8 Capítulo VI

### **Ação do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas e no crescimento de plantas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas em solo contaminado por cobre**

#### **8.1 Resumo**

A associação de fungos ectomicorrízicos com espécies florestais auxilia o estabelecimento destas em solo contaminado e representa uma alternativa para o estabelecimento vegetal em áreas onde naturalmente as plantas teriam dificuldades de crescimento ou até mesmo não se estabeleceriam devido ao potencial contaminante do cobre no solo. O trabalho teve por objetivo determinar a melhor forma de aplicação do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas de *Eucalyptus grandis* e sua influência no crescimento dessas mudas em solo contaminado por cobre. Primeiramente, avaliou-se o efeito do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas de *Eucalyptus grandis* em casa de vegetação, utilizado diretamente no substrato das mudas, no momento da formação do inóculo ectomicorrízico em laboratório, e adicionado no substrato durante o crescimento das mudas. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para solo contaminado por cobre, a fim de se avaliar o efeito dos diferentes tratamentos no crescimento das plantas em solo contaminado durante 150 dias em casa de vegetação, e 240 dias no campo. O óleo essencial de *E. grandis* favoreceu o crescimento de mudas de eucalipto micorrizadas, principalmente quando aplicado diretamente no substrato durante o crescimento das mesmas em casa de vegetação. A aplicação do óleo essencial de *E. grandis* nas mudas de eucalipto aumentou a colonização micorrízica. O óleo essencial de *E. grandis* aplicado em mudas de eucalipto micorrizadas favoreceu o crescimento e a sobrevivência das mudas em condições de casa de vegetação e campo.

**Palavras-chave:** metais pesados; metabólitos secundários, fungos ectomicorrízicos.

## 8.2 Introdução

O Brasil, devido às excelentes condições edafoclimáticas e ao avançado desenvolvimento na área de silvicultura, apresenta o maior programa de reflorestamento do mundo, onde utiliza, predominantemente, espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, que correspondem a 1,8 e 3 milhões de hectares plantados, respectivamente (ALVES et al., 2001; JUVENAL; MATTOS, 2002; SCARPINELLA, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008). Entretanto, devido à crescente preocupação com a questão do crescimento demográfico e ao conseqüente aumento no consumo de produtos florestais, a extração florestal resulta no desmatamento de áreas nativas, o que vem forçando a silvicultura brasileira a aumentar seus níveis de produção.

Nesse contexto, é alternativa o uso de locais degradados, tanto por produtos químicos ou devido ao excesso de metais pesados, para a implantação de programas de reflorestamento visando à exploração da madeira e de subprodutos. Dessa forma, a associação de espécies florestais com organismos que auxiliem o seu estabelecimento em solo contaminado passa a ser uma alternativa para o estabelecimento vegetal em áreas onde as plantas teriam dificuldades de estabelecimento ou até mesmo não se estabeleceriam devido ao potencial contaminante do solo (KHAN, 2006; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006).

Recentemente estudos estão sendo direcionados para a utilização de microrganismos na biorremediação de solos contaminados por metais, como alternativa para recuperação de áreas degradadas (GRAZZIOTTI et al., 2003; GADD, 2004; AMEZCUA-ALLIERI et al., 2005; KHAN, 2006; GÖHRE; PASZKOWSKI, 2006). Dentre os microrganismos capazes de auxiliar no estabelecimento de plantas em áreas degradadas, encontram-se os fungos que formam associações ectomicorrízicas com o sistema radicular de plantas, favorecendo a absorção, translocação e utilização de água e nutrientes do solo para a planta hospedeira (SMITH; READ, 2008). Os fungos ectomicorrízicos (fECM) representam um elo fundamental entre o solo e uma variedade de espécies florestais (KRANABETTER et al., 2009), possibilitando o aumento do volume de solo explorado pelas raízes e, conseqüentemente, da quantidade de nutrientes e de água absorvidos, visto que as hifas fúngicas são capazes de explorar locais fora do alcance das raízes (SMITH; READ, 2008).

A utilização de plantas do gênero *Eucalyptus* é recomendada para a revegetação de áreas contaminadas, devido à eficiência destas plantas quanto à absorção de nutrientes e produção de biomassa vegetal, possuindo elevada eficiência fotossintética (LIMA, 1996; MELLO et al., 2009) e atuando como facilitadoras da regeneração florestal (FEYERA et al., 2002; NÉRI et al., 2005). Segundo Bâ et al. (2010) o estabelecimento de essências florestais exóticas, como no caso do gênero *Eucalyptus*, somente é possível devido à associação das plantas com fECM capazes de proporcionar as condições necessárias para a manutenção das plantas no campo.

Para obter êxito na instalação de mudas de eucalipto micorrizadas em áreas contaminadas por metais, é necessário que estas apresentem crescimento satisfatório em casa de vegetação, proporcionando condições para que a colonização ocorra e permaneça após transplante, possibilitando seu estabelecimento a campo (SMITH; READ, 2008).

A inoculação de fECM em mudas utilizadas para revegetação de áreas contaminadas auxilia e acelera os processos de recuperação dos solos, ajudando no estabelecimento das mudas no campo e no restabelecimento da ciclagem de nutrientes (ANGELINI, 2008). Segundo estes autores, a inoculação ectomicorrízica influencia na sucessão vegetal, favorecendo o estabelecimento de espécies de plantas próprias de etapas sucessionais, resultando na recuperação da cobertura vegetal.

Em solos contaminados por metais pesados, os benefícios da inoculação das plantas com fECM deve-se à proteção das raízes pelo micélio fúngico, formando uma barreira físico-química ao íon metal, e a processos metabólicos como a precipitação extracelular, quelação intra e extracelular, complexação e compartimentalização dos metais pesados (KHAN et al., 2000; CUMMING et al., 2001; FOMINA et al., 2005; BELLION et al., 2006).

No setor florestal, alguns resultados de pesquisa demonstram que os metabólitos secundários ou óleos essenciais de plantas bioativas estão sendo utilizados como agentes biológicos no controle de crescimento de fungos simbiotes de interesse comercial (ZHI-LIN et al., 2007; LUDLEY et al., 2009). No entanto, os resultados existentes são escassos, sendo necessários estudos mais aprofundados com relação aos benefícios inerentes da utilização de óleos essenciais de plantas

bioativas na micorrização e no crescimento e desenvolvimento de essências florestais em solos contaminados.

Deste modo, o trabalho teve por objetivo determinar a melhor forma de aplicação do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas de *Eucalyptus grandis* e sua influência no crescimento dessas mudas em solo contaminado por cobre.



### 8.3 Material e métodos

O experimento foi realizado em duas etapas: primeiro, avaliou-se o efeito do modo de aplicação do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas de *Eucalyptus grandis* em casa de vegetação. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para solo naturalmente contaminado por cobre, para avaliar o crescimento das plantas nestas condições. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições para a avaliação da forma de utilização do óleo essencial na formação de mudas, e 20 repetições para a avaliação do efeito dos tratamentos na sobrevivência e no crescimento das mudas em solo contaminado por cobre.

#### 8.3.1 Efeito da forma de utilização do óleo essencial de eucalipto na formação de mudas de *E. grandis* micorrizadas

##### 8.3.1.1 Obtenção do óleo essencial de eucalipto

A extração do óleo essencial das folhas frescas de eucalipto foi realizada através da técnica de hidrodestilação (SERAFINI; CASSEL, 2001). Inicialmente, foram coletadas folhas de eucalipto, segundo a metodologia proposta por Vitti e Brito (2003). As folhas frescas foram cortadas em pedaços de 2 cm, pesadas e separadas em lotes individuais de 100 g. Posteriormente, as folhas foram colocadas em balão volumétrico no aparelho de Clevenger modificado (SERAFINI; CASSEL, 2001), mantendo-se água destilada em ebulição dentro do balão com aquecedor externo. Os componentes vegetais líquidos extraídos, após a passagem por um condensador, foram coletados e mantidos sob refrigeração a 4° C até sua utilização.

##### 8.3.1.2 Sementes

As sementes de *E. grandis* foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO. Para a desinfestação das sementes, as mesmas foram imersas em etanol (70%) durante 30 segundos, sob agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada estéril para retirada do residual de etanol. Posteriormente, as sementes foram imersas em hipoclorito de

sódio (1%) durante 30 segundos, e lavadas três vezes em água destilada estéril para retirada do residual de hipoclorito.

Após a assepsia das sementes, estas foram pré-germinadas em placas de Petri contendo solução de germinação de ácido bórico ( $3 \mu\text{M}$ ), glicose ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ), sulfato de cálcio ( $500 \mu\text{M}$ ) e ágar ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ), a pH 5,7, conforme metodologia descrita por Bonnassis (2007).

### 8.3.1.3 Isolado ectomicorrízico

Utilizou-se o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus*, isolado UFSC Pt 116, fornecido pelo banco de fECM da Universidade Federal de Santa Catarina, o qual foi mantido em meio de cultura sólido Melin Norkrans modificado - MNM (MARX, 1969) em pH 5,8, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. O material foi mantido em estufa a  $26^\circ \text{C}$  e multiplicado através de repicagens para o meio de mesma composição, sob condições assépticas.

Para produção do inoculante vegetativo do fECM, foram utilizadas duas formas de multiplicação do isolado. Na primeira, o isolado foi multiplicado utilizando-se adaptação da técnica descrita por Chávez et al. (2009), sendo realizadas suspensões micelianas do isolado ectomicorrízico, em 50 mL de meio MNM líquido (MARX, 1969) em Erlenmeyers de 150 mL, a partir de discos de 10 mm de diâmetro obtidos das culturas em placa, seguindo-se de incubação a  $26^\circ \text{C}$ , durante 30 dias. Para a segunda forma de multiplicação, o isolado ectomicorrízico foi multiplicado segundo a metodologia descrita acima, porém, adicionando-se  $20 \mu \text{ L}^{-1}$  do óleo essencial de *E. grandis* ao meio de cultura líquido no momento da incubação.

Após o período de incubação, o conteúdo dos Erlenmeyers, referentes a ambos os métodos de crescimento miceliano, foi fragmentado em 200 mL de meio MNM líquido, em liquidificador, durante 10 segundos. Em seguida, foi misturado a 300 mL de turfa estéril, em bequer de 1000 mL. Após a fragmentação do micélio fúngico e sua homogeneização no substrato, este foi acondicionado em incubadora a  $26^\circ \text{C}$ , até o momento da utilização.

#### 8.3.1.4 Tratamentos

Para avaliação do efeito da utilização do óleo essencial de eucalipto sobre a inoculação ectomicorrízica de mudas de eucalipto, formularam-se seis tratamentos: 1) controle (sem inoculação do fECM e sem a adição do óleo essencial), 2) controle + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (sem inoculação do fECM mas com a adição do óleo essencial na concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), 3) UFSC Pt 116 (com a inoculação do fECM crescido em meio de cultura líquido normal e sem a adição do óleo essencial), 4) UFSC Pt 116 + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (com a inoculação do fECM crescido em meio de cultura líquido normal e com a adição do óleo essencial na concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), 5) UFSC Pt 116 (20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (com inoculação do fECM crescido em meio de cultura líquido contendo óleo essencial na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  e sem a adição do óleo essencial no tubete) e 6) UFSC Pt 116 (20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (com inoculação do fECM crescido em meio de cultura líquido contendo óleo essencial na concentração de 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  e com a adição do óleo essencial no substrato na concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ ).

#### 8.3.1.5 Preparo dos tubetes e produção das mudas de *E. grandis*

Para o preparo das mudas a serem transplantadas para o substrato, tubetes cônicos de PVC de 100  $\text{cm}^3$  foram dispostos sobre telado, em casa de vegetação, e preenchidos 90% do seu volume com substrato fornecido pela empresa Turfa Fértil S.A.. O substrato apresentou pH em água 5,8; cálcio 25,9  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ; magnésio 4,7  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ; H+Al 2,5  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ; CTC efetiva 31,1; matéria orgânica 12%; argila 9%; potássio 176  $\text{mg dm}^{-3}$  e fósforo 11,3  $\text{mg dm}^{-3}$ .

Após o preenchimento de 90% do volume dos tubetes com turfa, estes foram irrigados a fim de adensar o substrato no seu interior, chegando este a um volume aproximado de 80% do tubete. Após este processo, completou-se o restante do volume dos tubetes com o substrato inoculado e não inoculado com fECM, mantendo-o úmido até o momento do transplante das plântulas de eucalipto.

Após o transplante, os tubetes permaneceram sobre telado em casa de vegetação. A reposição da umidade foi realizada adicionando-se diariamente água destilada aos tubetes, sendo aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951), em intervalos de 20 dias.

Para a aplicação do óleo essencial nos tratamentos correspondentes, o óleo essencial de eucalipto foi solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003). 4 mL da solução contendo óleo essencial na concentração de  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  foram aplicados no substrato ao entorno das mudas, em intervalos de 7 dias a contar da data de transplante das mudas.

#### 8.3.1.6 Avaliações

Aos 90 dias após o transplante das plântulas avaliou-se a altura da muda (cm), diâmetro do colo (mm), massa da parte aérea fresca e seca (mg), volume radicular ( $\text{cm}^3$ ), massa das raízes secas (mg), porcentual de colonização ectomicorrízica (%) e o incremento no crescimento vegetal de cada tratamento em relação ao tratamento controle (%).

Para a determinação da massa da parte aérea fresca e seca, as plantas foram cortadas no nível do substrato. Em seguida, foi pesada a parte aérea, caracterizando a massa da parte aérea fresca. As raízes foram separadas do substrato, lavadas com água destilada e determinado o diâmetro do colo com auxílio de paquímetro universal. O volume radicular foi determinado através da densidade em água destilada.

Para a determinação da porcentagem de colonização radicular, empregou-se a técnica das intersecções de Giovanetti e Mosse (1980), modificado por Brundrett et al. (1996), onde as raízes, previamente separadas do substrato, foram lavadas cuidadosamente em água corrente. As raízes foram cortadas em pedaços de 2 cm e conservadas em solução de FAA (5% de formalina a 40%, 5% de ácido acético e 90% de álcool etílico a 50%), segundo Kormanik e McGrow (1982) até o momento da avaliação.

As amostras de raízes mantidas em FAA foram espalhadas aleatoriamente no interior de placas de Petri (diâmetro de 9 cm) apresentando a superfície inferior seccionada em quadrados de 1,27 cm de lado, para determinação do porcentual da colonização radicular. As raízes assim distribuídas foram observadas em lupa binocular (30x), registrando-se a presença ou ausência de colonização micorrízica nos pontos de intersecção entre as raízes e as linhas da placa, conforme Giovanetti e Mosse (1980).

Após, as raízes e a parte aérea das plantas foram colocadas em sacos de papel individuais devidamente identificados e levados à estufa a 65<sup>o</sup> C, onde permaneceram até atingir peso constante, efetuando-se a determinação da massa da parte aérea seca e a massa de raízes secas.

Para a determinação do incremento no crescimento vegetal, adaptou-se a metodologia apresentada por Ying Chu et al. (2001), utilizando-se a equação: [(massa seca da planta inteira no tratamento y – massa seca da planta inteira no tratamento controle) / massa seca da planta inteira no tratamento y]\*100, onde o tratamento “y” correspondeu ao tratamento avaliado em relação ao tratamento controle.

Os dados de altura da muda, diâmetro do colo, massa da parte aérea fresca e seca, volume radicular, massa das raízes secas, porcentual de colonização ectomicorrízica e índice de crescimento vegetal foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000), tomando-se como base os níveis de significância maiores que 95% (p≤0,05).

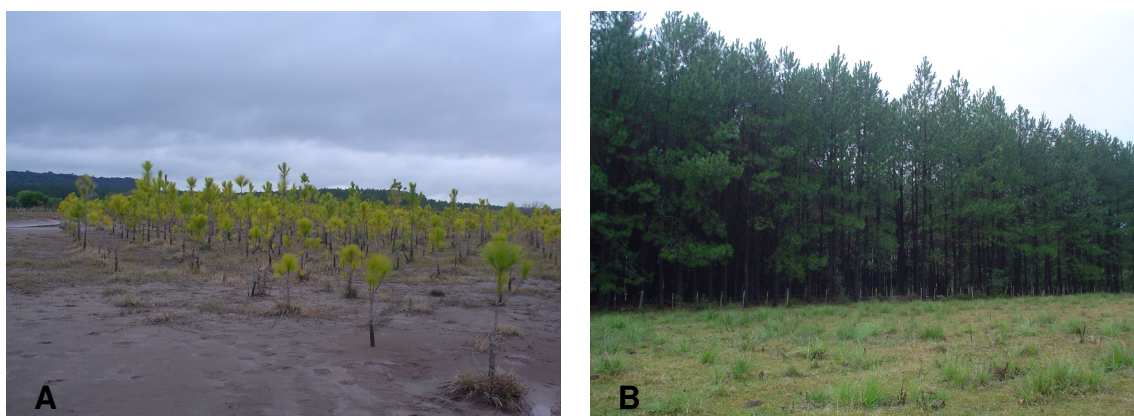
### 8.3.2 Avaliação da utilização do óleo essencial de eucalipto no crescimento de plantas de *E. grandis* micorrizadas em solo contaminado por cobre

Esta etapa do trabalho foi dividida em duas etapas. Primeiro avaliou-se o crescimento das mudas de *E. grandis* obtidas na etapa 8.3.1 em solo contaminado com cobre em condições de casa de vegetação. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para o campo, na área de rejeito das Minas do Camaquã, localizada no município de Caçapava do Sul, a fim de determinar a sobrevivência e o crescimento destas em condições naturais de contaminação.

#### 8.3.2.1 Coleta do solo contaminado por cobre

O solo utilizado no experimento foi coletado na área de rejeito das Minas do Camaquã, pertencente à Companhia Brasileira do Cobre (CBC), no município de Caçapava do Sul. O solo foi coletado em área representativa do rejeito (Figura 8.1) a uma profundidade de 0 – 20 cm e acondicionado em sacos plásticos até o momento da utilização.

O solo apresentou as seguintes características físico-químicas: 27% das partículas correspondentes a fração argila; pH em água 6,8; cálcio  $3,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; magnésio  $0,4 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; H+Al  $0,6 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; CTC efetiva 3,8; CTC pH 7  $4,4 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; matéria orgânica 0,3 %; potássio  $28 \text{ mg dm}^{-3}$ , fósforo  $142,3 \text{ mg dm}^{-3}$ , manganês  $10,3 \text{ mg dm}^{-3}$  e cobre  $286,3 \text{ mg dm}^{-3}$ .



Fotos: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 8.1** - Área de rejeito das Minas do Camaquã, onde foram realizadas as coletas do solo contaminado por cobre (A) e área circundante ao local de coleta (B).

### 8.3.2.2 Transplante das mudas para o solo contaminado por cobre em condições de casa de vegetação

Decorrido o período de 90 dias de crescimento das mudas (Etapa 8.3.1), estas foram transplantadas para vasos de 10 L, contendo 8 L do solo naturalmente contaminado por cobre. No momento do transplante, as mudas foram retiradas dos tubetes e inseridas em uma cova no centro de cada vaso. Após o transplante, os vasos permaneceram em casa de vegetação por um período de 150 dias, sendo a reposição da umidade realizada diariamente, adicionando-se água destilada aos vasos.

### 8.3.2.3 Avaliações

As avaliações de altura das plantas e diâmetro do colo foram realizadas aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o transplante das mudas. A altura foi determinada com régua milimetrada, sendo obtida pela distância do colo da planta até a extremidade das últimas axilas foliares, e o diâmetro do colo obtido com auxílio de paquímetro.

Para a determinação do teor de cobre no tecido vegetal, coletaram-se seis folhas de cada planta, as quais foram secas em estufa com circulação de ar a 65° C até peso constante, pesadas e moídas em moinho tipo Willey equipado com peneira de malha de 0,38 mm. Em seguida, efetuou-se a digestão nítrico-perclórica do material seco e moído, obtendo-se extratos para determinação dos teores de cobre por espectrofotometria de absorção atômica, conforme metodologia descrita por Lawrence (1999).

Os dados de altura das mudas, diâmetro do colo e teor de cobre nas folhas foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000), tomando-se como base os níveis de significância maiores que 95% ( $p \leq 0,05$ ).

#### 8.3.2.4 Transplante das mudas para o solo contaminado por cobre em condições de campo

Decorrido o período de 150 dias de crescimento das plantas (Etapa 8.3.2.2), estas foram transplantadas para o campo, na área de rejeito das Minas do Camaquã. No momento do transplante, as plantas foram retiradas dos vasos e inseridas em uma cova, sem a adição de fertilizantes e corretivos. Após o transplante, as plantas permaneceram no campo por 240 dias, não sendo efetuado nenhum tipo de trato cultural, a fim de determinar as condições de sobrevivência das mesmas no ambiente em estudo.

#### 8.3.2.5 Avaliações

As avaliações de altura das plantas, diâmetro do colo e porcentual de sobrevivência foram realizadas aos 240 dias após o transplante das mudas. A altura foi determinada com régua milimetrada, sendo obtida pela distância do colo da planta até a extremidade das últimas axilas foliares, e o diâmetro do colo obtido com auxílio de paquímetro.

Os dados de altura das mudas e diâmetro do colo foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000), tomando-se como base os níveis de significância maiores que 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## 8.4 Resultados e discussão

Óleo essencial de eucalipto na formação de mudas de *E. grandis* micorrizadas

As mudas de eucalipto inoculadas com o fECM *P. microcarpus* (UFSC Pt 116) que receberam o óleo essencial de eucalipto tanto na formação do inóculo ectomicorrízico (tratamento UFSC Pt 116 (20  $\mu\text{L L}^{-1}$ )) como na aplicação direta no substrato em intervalos de sete dias (tratamento UFSC Pt 116 + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), apresentaram crescimento significativamente superior aos demais tratamentos (Tabela 8.1).

**Tabela 8.1** - Altura e diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus grandis* submetidas a diferentes formas de inoculação, 90 dias após o transplante para os substratos. Média de dez repetições (n = 10). Santa Maria, 2010.

Tratamento	Altura das mudas (cm)	Diâmetro do colo (mm)
Controle	16,25 d*	1,68 c*
Controle + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	17,46 d	1,70 c
UFSC Pt 116	23,93 b	2,45 b
UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	28,21 a	2,87 a
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ )	26,88 a	2,79 a
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	21,25 c	2,44 b
CV (%)**	7,74	6,01

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

\*\* Coeficiente de variação

Além dos benefícios que os fECM proporcionam às plantas, devido ao aumento na absorção de água e nutrientes, estes produzem fitormônios (ácido indol acético – AIA e alguns compostos derivados de auxinas) em resposta à liberação de compostos fenólicos pelas raízes da planta no momento da infecção (SMITH; READ, 2008). Estes fitormônios são excretados na micorrizosfera, ficando biodisponíveis para as plantas e apresentando efeito importante no crescimento vegetal. Este efeito foi evidenciado pelo maior crescimento, tanto na parte aérea como radicular das mudas inoculadas com o fECM (Tabelas 8.1, 8.2). Resultados demonstrando o efeito positivo da associação ectomicorrízica quanto ao crescimento das plantas têm sido constantemente relatados na literatura (SILVA et al., 2003; ANDREAZZA et al., 2004; MELLO et al., 2009). No entanto, observou-se que o crescimento das plantas foi superior quando a inoculação ectomicorrízica ocorreu concomitantemente à utilização do óleo essencial de eucalipto.



Neste trabalho, os resultados de diâmetro do colo correspondem aos resultados de altura de plantas (Tabela 8.1), sugerindo que os incrementos proporcionados pela inoculação dos isolados e utilização do óleo essencial ao desenvolvimento vegetativo das plantas foram significativos. Isto indica que não houve estiolamento das plantas e que os tratamentos que se destacaram realmente foram eficientes em promover o crescimento das mudas de eucalipto. Segundo Souza (2003), a massa seca de ramos e folhas é o parâmetro mais importante em estudos onde se busca verificar a eficiência de determinadas variáveis sobre o desenvolvimento e crescimento vegetal. Estes fatores representam a eficiência da planta na formação de tecidos. Com base nisso, os tratamentos onde a inoculação ectomicorrízica ocorreu concomitantemente à utilização do óleo essencial de eucalipto, representaram os tratamentos com maior efeito bioestimulatório em relação aos demais tratamentos avaliados (Tabela 8.2).

Com o aumento da parte aérea das plantas micorrizadas onde houve adição do óleo essencial, pressupõe-se que ocorreram aumentos na superfície de captação de luz, na assimilação de CO<sub>2</sub> e na produção de fotoassimilados. Esta maior produção de fotoassimilados atende às demandas do fungo ectomicorrízico e da planta hospedeira (BAGO et al., 2003). Esse tipo de benefício é resultante, provavelmente, do aumento na absorção de nutrientes pelos fungos e suas implicações nos níveis fisiológico e bioquímico, como o estímulo da síntese de hormônios, aminoácidos, proteínas e fotoassimilados (SMITH; READ, 2008).

**Tabela 8.2** - Massa fresca e seca da parte aérea de mudas de *Eucalyptus grandis* submetidas a diferentes formas de inoculação ectomicorrízica, 90 dias após o transplante para os substratos. Média de dez repetições (n = 10). Santa Maria, 2010.

<b>Tratamento</b>	<b>Massa fresca da parte aérea (mg)</b>	<b>Massa seca da parte aérea (mg)</b>
Controle	1020 d*	234 d*
Controle + 40 µL L <sup>-1</sup>	1150 d	385 d
UFSC Pt 116	2400 b	702 b
UFSC Pt 116 + 40 µL L <sup>-1</sup>	3030 a	949 a
UFSC Pt 116 (20 µL L <sup>-1</sup> )	2890 a	904 a
UFSC Pt 116 (20 µL L <sup>-1</sup> ) + 40 µL L <sup>-1</sup>	1870 c	598 c
CV (%)**	6,69	8,65

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

\*\* Coeficiente de variação

Segundo Barker et al. (1998) os fECM podem produzir hormônios que diminuem o crescimento das raízes e podem induzir à bifurcação das pontas e à formação de aglomerados de raízes, variando as estruturas conforme a espécie hospedeira e o fungo associado. No entanto, o efeito de diminuição do crescimento radicular não foi observado no presente trabalho, onde plantas colonizadas com o fungo *P. microcarpus* apresentaram valores de massa seca de raízes e volume radicular, significativamente superiores aos observados nas plantas que não formaram associação ectomicorrízica (Tabela 8.3).

**Tabela 8.3** - Massa seca de raízes e volume radicular de mudas de *Eucalyptus grandis* submetidas a diferentes formas de inoculação ectomicorrízica, 90 dias após o transplante para os substratos. Média de dez repetições (n = 10). Santa Maria, 2010.

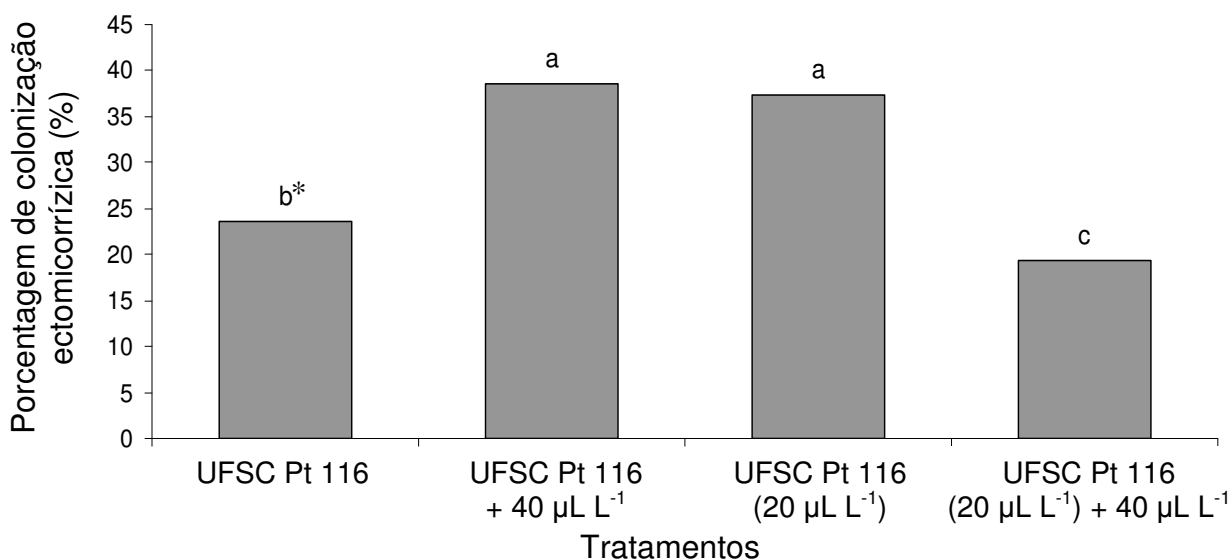
<b>Tratamento</b>	<b>Massa seca de raízes (mg)</b>	<b>Volume radicular (cm<sup>3</sup>)</b>
Controle	101 c*	0,864 d*
Controle + 40 µL L <sup>-1</sup>	131 c	1,012 d
UFSC Pt 116	168 b	1,170 bc
UFSC Pt 116 + 40 µL L <sup>-1</sup>	241 a	1,435 a
UFSC Pt 116 (20 µL L <sup>-1</sup> )	211 a	1,325 a
UFSC Pt 116 (20 µL L <sup>-1</sup> ) + 40 µL L <sup>-1</sup>	161 b	1,102 c
CV (%)**	8,13	9,30

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

\*\* Coeficiente de variação

A melhor resposta das mudas de eucalipto quanto à altura e ao diâmetro do colo (Tabela 8.1), massa seca da parte aérea e raízes (Tabela 8.2) e volume radicular (Tabela 8.3) ocorreu quando foi realizada inoculação das mudas com o fECM *P. microcarpus* (UFSC Pt 116), utilizando-se o óleo essencial de eucalipto na formação do inoculante ectomicorrízico ou via aplicações posteriores, evidenciando a eficiência do óleo essencial no estímulo ao desenvolvimento de mudas em condições de casa de vegetação.

Observou-se que a utilização do óleo essencial de eucalipto, tanto no inóculo inicial como via aplicações posteriores, estimulou a colonização ectomicorrízica (Figura 8.2). Este resultado pode estar associado aos sinais bioquímicos responsáveis pela simbiose fungo-planta. Desta maneira, a presença do óleo essencial estaria atuando de forma efetiva no quimiotropismo entre as hifas fúngicas e as células radiculares. Segundo Wong e Fortin (1990) e Weiss et al. (1997), os sinais bioquímicos de reconhecimento compõem a produção e o acúmulo de fenilpropanóides nas raízes, bem como a liberação pelo fungo de compostos indólicos que atuam na rizogênese, induzindo a adesão das hifas fúngicas, que são os passos iniciais da formação da simbiose ectomicorrízica.

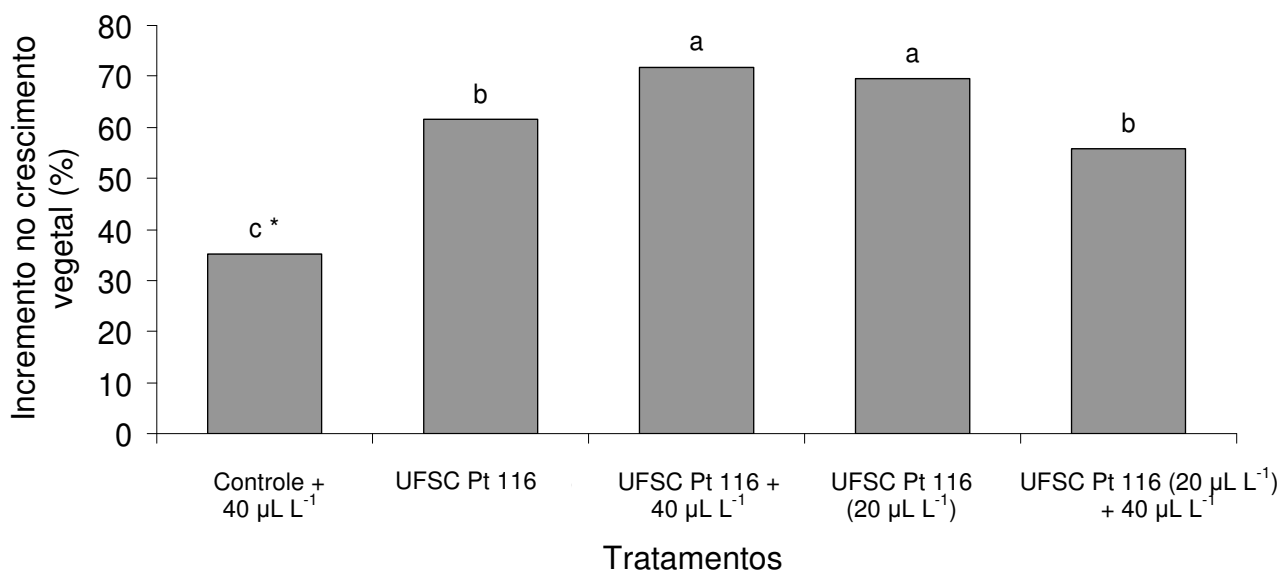


**Figura 8.2** - Porcentagem de colonização ectomicorrízica das raízes de *Eucalyptus grandis* aos 90 dias após o transplante para substratos com diferentes formas de inoculação. \* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) 7,25. Santa Maria, 2010.

Nos tratamentos onde houve inoculação das mudas com o fungo *P. microcarpus* e a utilização do óleo essencial de eucalipto, foram observadas porcentagens de colonização ectomicorrízica semelhantes, o que não foi observado nas plantas inoculadas com o mesmo fungo, porém sem a utilização do óleo essencial. Estes resultados demonstram o efeito estimulante do óleo sobre a simbiose ectomicorrízica. No entanto, observou-se que a aplicação do óleo essencial de eucalipto nas mudas onde o inóculo ectomicorrízico já apresentava o óleo essencial (UFSC Pt 16 (20 µL L<sup>-1</sup>) + 40 µL L<sup>-1</sup>) resultou em plantas significativamente menores em relação às plantas dos demais tratamentos que receberam o óleo

essencial na inoculação ou durante a formação das mudas (Tabelas 8.1, 8.2 e 8.3). Provavelmente, este efeito tenha ocorrido devido à alta concentração do óleo essencial, visto que a adição do óleo de eucalipto nas mudas inoculadas com o fECM crescido em meio de cultura contendo o óleo essencial pode ter ocasionado excesso destes compostos. Batish et al. (2008) descrevem que, dependendo da concentração, o óleo essencial de eucalipto pode passar de uma condição de estímulo para condição de limitação do crescimento vegetal, devido aos efeitos alelopáticos à planta.

A aplicação do óleo essencial de eucalipto sobre o substrato, resultou em plantas com crescimento 35% superior ao tratamento controle (Figura 8.3). Observou-se também que a inoculação das mudas com o fECM *P. microcarpus*, sem a adição do óleo essencial, proporcionou crescimento das plantas 59,6% superior ao observado nas plantas do tratamento controle (Figura 8.3). Estes dados corroboram com Diniz (2007), onde descreve que a simbiose não só aumenta a biomassa vegetal, como também influencia a proporção na qual esta se distribui entre a parte aérea e a raiz das plantas.



**Figura 8.3** – Incremento no crescimento vegetal (%) proporcionado pelos tratamentos em relação ao tratamento controle nas mudas de *Eucalyptus grandis* aos 90 dias após o transplante para os substratos. \* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) 9,17. Santa Maria, 2010.

Entretanto, quando as plantas foram inoculadas com o fECM e submetidas à utilização do óleo essencial de eucalipto, o incremento no crescimento vegetal foi de

71 e 68,7%, respectivamente, para os tratamentos onde a utilização do óleo essencial ocorreu via inoculação e via aplicações posteriores.

Óleo essencial de eucalipto no crescimento de plantas de *E. grandis* micorrizadas em solo contaminado por cobre

Quando as mudas foram transplantadas para o solo contendo elevado teor de cobre, o crescimento foi semelhante ao evidenciado durante a formação das mudas em condição de casa de vegetação, ou seja, as plantas inoculadas com o fECM e que receberam o óleo essencial continuaram apresentando crescimento significativamente maior em relação aos demais tratamentos (Tabelas 8.4 e 8.5). Provavelmente, este resultado no crescimento esteja relacionado a maior colonização ectomicorrízica observada nestes tratamentos, a qual, devido aos benefícios da simbiose ectomicorrízica, proporciona melhores condições de crescimento na presença de metais no solo.

**Tabela 8.4** - Altura das mudas de *Eucalyptus grandis* aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o transplante para o solo contaminado com cobre em condições de casa de vegetação. Média de 20 repetições (n = 20). Santa Maria, 2010.

Tratamento	Altura das mudas (cm)				
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Controle	14,66 d*	29,91 d	45,16 c	55,33 c	58,33 c
Controle + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	17,33 d	34,91 cd	47,00 c	60,66 b	64,25 b
UFSC Pt 116	24,41 b	38,41 bc	48,91 b	63,83 b	67,58 b
UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	28,05 ab	42,83 ab	49,91 b	66,50 a	71,83 a
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ )	30,83 a	45,83 a	54,75 a	65,83 a	69,16 a
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	22,41 c	38,75 bc	52,50 ab	57,83 c	66,55 b
CV (%)**	9,38	8,00	8,66	9,26	8,58

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

\*\* Coeficiente de variação

Mesmo as plantas de eucalipto não inoculadas com o fECM *P. microcarpus* apresentaram crescimento, embora limitado, no solo contaminado por cobre (Tabelas 8.4 e 8.5). Isto ocorreu porque plantas não micorrizadas, dependendo do estado fisiológico e nutricional, podem se desenvolver, embora com dificuldade, em solos contaminados por metais pesados, devido a mecanismos de captação e efluxo de metais pelo bombardeamento através da membrana plasmática, quelatação de metais no citosol, ação de fitoquelatinas e compartimentalização dos metais no vacúolo (HALL, 2002).

**Tabela 8.5** - Diâmetro do colo das mudas de *Eucalyptus grandis* aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o transplante para o solo contaminado com cobre em condição de casa de vegetação. Média de 20 repetições (n = 20). Santa Maria, 2010.

Tratamento	Diâmetro do colo (mm)				
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Controle	1,13 d*	1,65 c	2,21 c	4,71 c	6,60 c
Controle + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	1,33 c	1,98 c	2,50 c	5,28 bc	7,60 b
UFSC Pt 116	1,58 b	2,20 b	3,25 bc	5,85 b	8,00 ab
UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	1,75 a	2,46 a	3,68 b	6,71 a	8,20 a
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ )	1,72 a	2,57 a	3,73 a	6,42 a	8,20 a
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	1,57 b	2,21 b	3,18 bc	5,57 b	7,60 b
CV (%)**	8,54	9,02	8,66	8,98	9,14

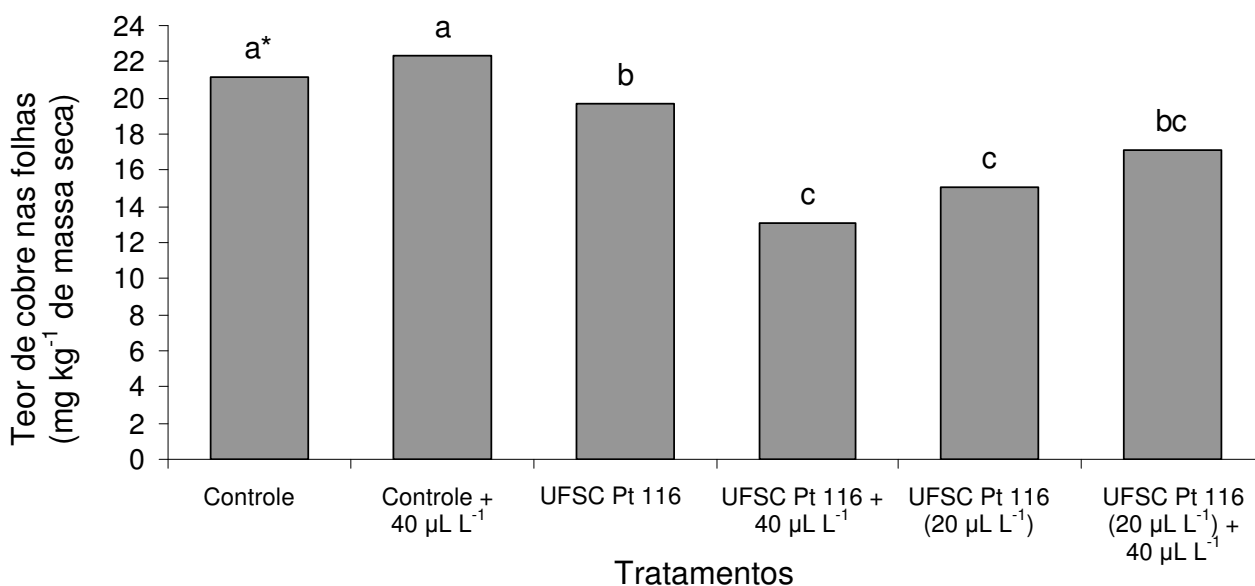
\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*\* Coeficiente de variação

Existem divergências quanto aos teores ideais de cobre em plantas de eucalipto. Silveira et al. (2005), em recomendação ao estado nutricional de plantas do gênero *Eucalyptus* apresentaram os valores de cobre de 6 mg kg<sup>-1</sup> como os ideais para as plantas de *E. grandis*, *E. myrcocoris*, *E. saligna* e os valores de 5 mg kg<sup>-1</sup> para o *E. resinifera* e *E. robusta* como a concentração ideal de cobre no tecido vegetal. Soares et al. (2000), observaram nível crítico de toxidez na matéria seca da parte aérea entre 12 e 13 mg kg<sup>-1</sup> para as *E. maculata* e *E. urophylla*. Os dados apresentados na figura 8.5 demonstram que o teor de cobre no tecido das plantas submetidas aos tratamentos onde houve a inoculação ectomicorrízica e a utilização do óleo essencial de eucalipto, foi significativamente inferior ao observado no tecido vegetal das plantas submetidas aos demais tratamentos.

Alguns estudos demonstram que a presença do manto fúngico sobre as raízes da planta hospedeira não altera o deslocamento dos metais presentes na solução do solo até a superfície das raízes, mas impede sua translocação para o interior das plantas. Outro fator fisiológico resultante da simbiose micorrízica está relacionado à diminuição ou ausência de proteínas extracelulares específicas produzidas pelo sistema radicular em resposta à presença de metais pesados. Em plantas não micorrizadas, estas proteínas desencadeiam estresses oxidativos prejudiciais à elongação radicular e ao crescimento vegetal (BELLION et al., 2006). No entanto, Baum et al. (2006) observaram que apesar dos fECM proporcionarem uma barreira físico-química à absorção de metais pesados pelas raízes, algumas

plantas, quando inoculadas com o fungo *Paxillus involutus* aumentaram a absorção de metais como cobre e zinco.



**Figura 8.6** – Teor de cobre nas folhas de *Eucalyptus grandis* submetidas aos diferentes tratamentos, 150 dias após o transplante para o solo contaminado. \* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) 7,62. Santa Maria, 2010.

Provavelmente, o menor teor de cobre encontrado na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos onde houve inoculação micorrízica e presença do óleo essencial, tanto no inóculo utilizado como na adição posterior (tratamentos UFSC Pt 116 (20 µL L<sup>-1</sup>) e UFSC Pt 116 + 40 µL L<sup>-1</sup>) (Figura 8.6) tenha resultado em menor fitotoxidez de cobre, visto que, quanto menor o teor de cobre translocado, menor será a interferência deste na absorção e translocação de elementos como o fósforo, potássio, cálcio e magnésio, nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal (SOARES et al., 2000).

Outra grande contribuição dos fECM ao estabelecimento de plantas em solos contendo grandes concentrações de metais pesados refere-se aos mecanismos de transporte, os quais facilitam a difusão catiônica do cobre, evitando sua absorção pelos tecidos radiculares das plantas. Quando o cobre é absorvido pelas raízes, provoca alterações no tecido radicular, interferindo na expansão do sistema radicular e na absorção dos nutrientes pelo mesmo (BELLION et al., 2006). Conseqüentemente, plantas com baixo volume radicular apresentam menor capacidade de exploração do solo para absorver os elementos essenciais ao

crescimento e desenvolvimento das plantas, gerando plantas com menor porte. Neste sentido, a presença de associações micorrízicas nas raízes de plantas presentes em áreas com elevadas concentrações de metais pesados, favorece o desenvolvimento do sistema radicular das plantas, permitindo que estas se desenvolvam de forma satisfatória e com reduzidos danos à sua estrutura.

A quelação extracelular está relacionada com a adsorção de elementos tóxicos (metais pesados) externamente à planta hospedeira, na parede celular do manto fúngico. Este processo ocorre devido à excreção, pelo fungo, de moléculas orgânicas, principalmente de ácidos di e tri-carboxílicos, os quais formam quelatos com os íons metálicos (BELLION et al., 2006). No entanto, este mecanismo não é o único responsável pela formação de uma barreira à entrada de metais nos tecidos das plantas hospedeiras. Outro mecanismo que apresenta relação direta com a quelação extracelular é a ligação de metais pesados por melaninas fúngicas, fenômeno este que explica o fato de fungos pigmentados apresentarem maior tolerância a metais pesados (GRAZZIOTTI et al., 2003). Segundo Hegedűs et al. (2007) os fECM quando expostos a concentrações elevadas de metais pesados, tendem a aumentar a concentração de glutathione no seu tecido, auxiliando na tolerância do fungo a determinado metal, acumulando este nas suas hifas.

Dentre os sintomas observados em plantas presentes em solos contaminados por cobre, o escurecimento e a diminuição das raízes são os mais comuns e, geralmente, acarretam limitação ou impedimento ao crescimento vegetal. Isto ocorre devido ao cobre se acumular nas raízes, comprometendo a permeabilidade das membranas (MALAVOLTA et al., 1997; FERNÁNDEZ et al., 2007). No entanto, observou-se que as plantas mantidas em casa de vegetação que foram submetidas à inoculação ectomicorrízica e que receberam a adição do óleo essencial (via inoculação ou aplicação posterior), não apresentavam os sintomas de redução e engrossamento radicular, escurecimento das folhas e retardo de crescimento (Figura 8.5). Já as plantas mantidas no campo, apresentaram limitações evidentes do crescimento, apresentando as folhas avermelhadas, sintoma característico da fitotoxidez causada pelo excesso de cobre no solo (RÖMHELD, 2001; PÄTSIKKÄ et al., 2002) (Figura 8.6).



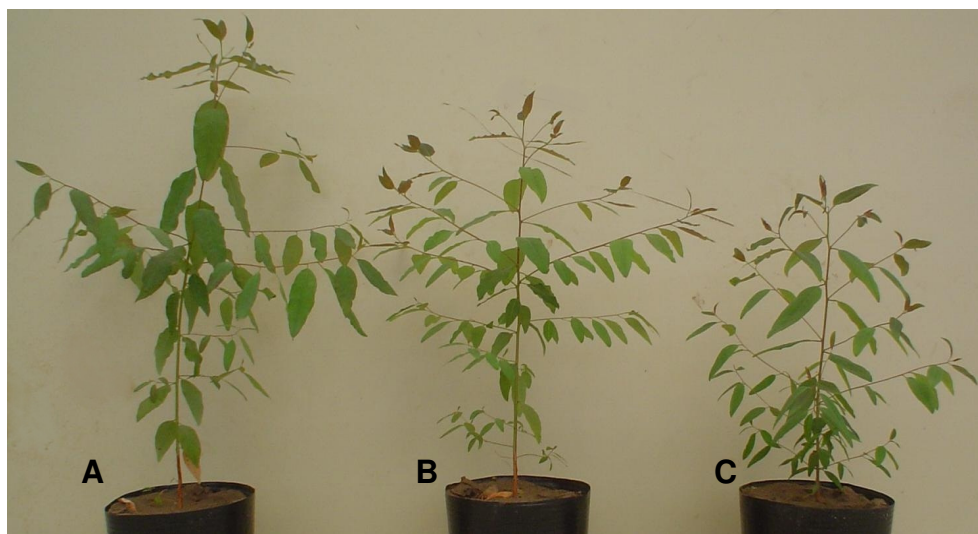


Foto: Ricardo Bemfica Steffen

**Figura 8.6** - Comparativo das mudas de *Eucalyptus grandis* submetidas aos tratamentos UFSC Pt 116 + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (A), UFSC Pt 116 (20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (B) e UFSC Pt 116 (C) aos 150 dias após o transplante para o solo contaminado por cobre em condições de casa de vegetação. Santa Maria, 2010.

No campo, o efeito dos tratamentos ficou evidente pela diferença observada quanto ao percentual de sobrevivência das plantas (Tabela 8.6). Embora após o período de formação das mudas em casa de vegetação, as plantas não tenham recebido nenhum tipo de tratamento, a maior colonização ectomicorrízica (Figura 8.2) e o incremento no crescimento das mudas inerente aos tratamentos (Figura 8.3) resultaram em plantas com maiores condições de permanência no solo contaminado.

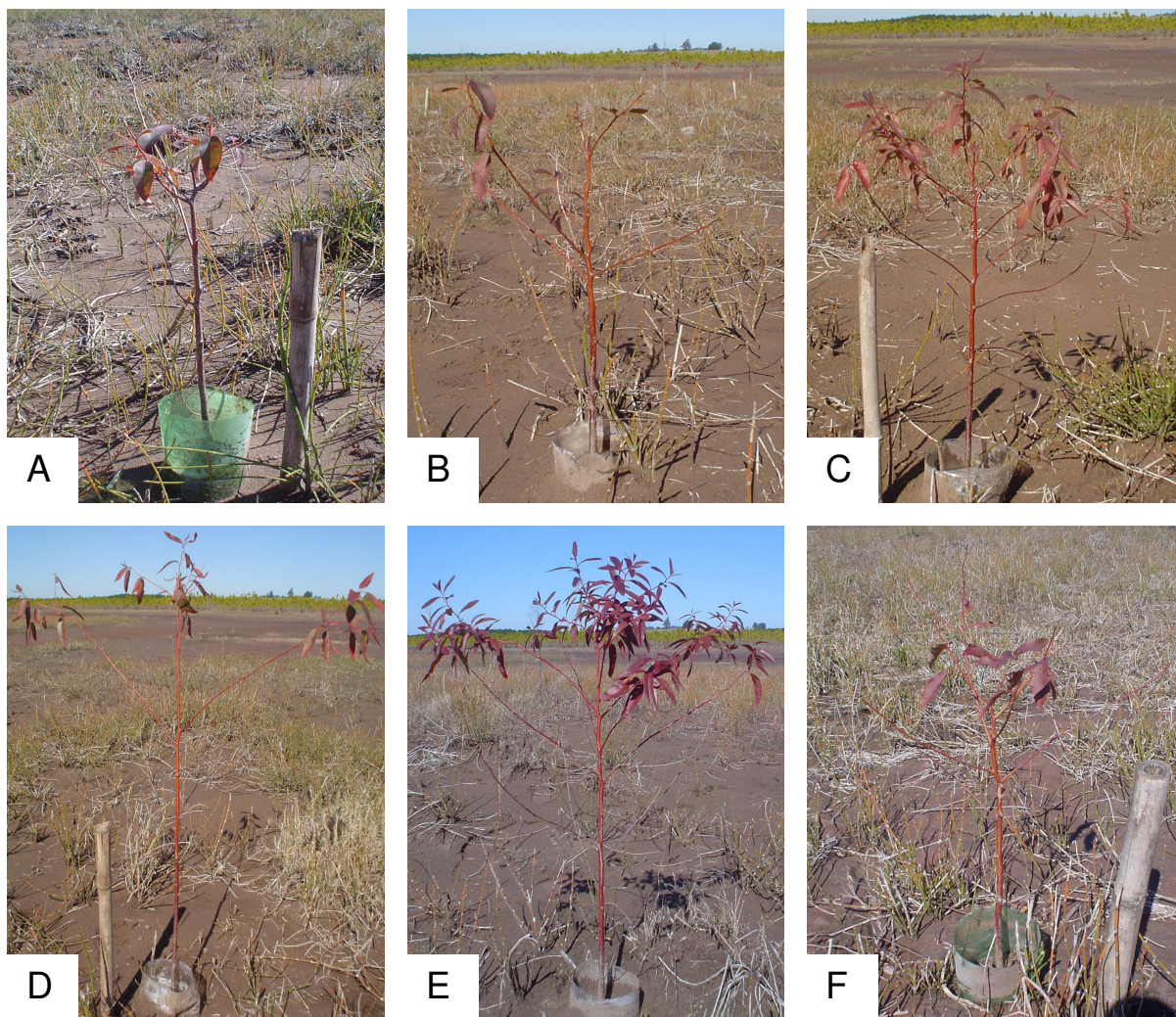
**Tabela 8.6** – Porcentagem de sobrevivência, altura e diâmetro do colo das plantas de *Eucalyptus grandis* aos 240 dias após o transplante para o solo contaminado com cobre em condições de campo. Santa Maria, 2010.

Tratamento	Plantas vivas (%)	Altura das plantas (cm)	Diâmetro do colo (mm)
Controle	15	63,45 d*	7,60 d
Controle + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	30	66,86 d	8,57 d
UFSC Pt 116	45	73,44 bc	11,40 b
UFSC Pt 116 + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	75	87,05 a	13,25 a
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ )	60	75,14 b	11,85 b
UFSC Pt 116 (20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) + 40 $\mu\text{L L}^{-1}$	40	70,09 c	10,00 cd
CV (%)**		10,54	13,14

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

\*\* Coeficiente de variação

As plantas inoculadas com fECM e que receberam a adição do óleo essencial de eucalipto na fase de formação das mudas, apresentaram valores de altura e diâmetro do colo significativamente superiores aos demais tratamentos (Tabela 8.5). No entanto, para todos os tratamentos, a fitotoxidez causada pelo cobre foi evidente, sendo que as plantas apresentaram folhas e ramos de coloração avermelhada (Figura 8.7).



**Figura 8.7** - Comparativo das plantas de *Eucalyptus grandis* submetidas aos tratamentos controle (A), controle + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (B), UFSC Pt 116 (C), UFSC Pt 116 + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (D), UFSC Pt 116 (20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (E) e UFSC Pt 116 (20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) + 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  (F), aos 240 dias após o transplante para o campo. Santa Maria, 2010.

É importante observar que o solo presente nas Minas do Camaquã é oriundo do rejeito do processo de mineração do cobre, ou seja, é a rocha moída, a qual após o processo físico-químico de extração do cobre, foi depositada sobre uma antiga zona de mineração, estando sujeita aos fatores climáticos e biológicos. Além disso,

no momento do transplante do *E. grandis* para o campo, não foram adotadas quaisquer tecnologias de amenização do efeito de metais pesados sobre o crescimento vegetal (VANGRONVELD et al., 1995; BADORA et al., 1998; GE et al., 2000; MULLIGAN et al., 2001; ACCIOLY et al., 2004; ACCIOLY et al., 2009), sendo as diferenças observadas no crescimento das plantas no campo inerentes aos tratamentos utilizados no momento da produção das mudas em condição de casa de vegetação (Etapa 8.3.1).

Cabe ressaltar que os efeitos dos fECM na proteção das plantas em solos com excesso de metais pesados não estão condicionados apenas ao isolado fúngico utilizado e à sua habilidade em se desenvolver nestes ambientes, mas também a fatores ambientais, comportamento e biodisponibilidade do metal no solo (GRAZZIOTTI et al., 2003).

Sabendo-se que este solo, ou substrato, apresenta teores de matéria orgânica muito baixos (0,3% m/v), provavelmente a complexação do cobre por compostos orgânicos seja limitada, devido à relação entre altos teores de cobre (286 mg dm<sup>-3</sup>) e baixos teores de matéria orgânica. Pelo fato do rejeito estar depositado nesta área há alguns anos e o incremento de material orgânico sobre este ser quase nulo, acredita-se que as reações de complexação estejam saturadas, não estando o cobre sujeito a estas ligações.

Por se tratar de um solo ou substrato de textura arenosa, apresentando 27% de sedimentos pertencentes à fração argila, o que resulta em baixos teores de argilominerais e óxidos, e com CTC efetiva de 3,8 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, a capacidade de adsorção deste metal às partículas minerais do solo é baixa, sendo boa parte do cobre presente no solo encontrado na forma de Cu<sup>2+</sup>. O elevado pH do rejeito (6,8) diminui a disponibilidade do cobre às plantas. No entanto, observa-se que este metal ainda apresenta-se como limitante ao desenvolvimento vegetal na área, conforme análise da situação da vegetação existente no local.

Sabendo-se que o cobre apresenta baixa mobilidade no solo e que o rejeito em questão apresenta baixos teores de frações sólidas reativas com o cobre no solo (matéria orgânica, argilominerais e óxidos de ferro e alumínio) e que o incremento de matéria orgânica provavelmente seja quase nulo, devido à baixa população de plantas presentes no local, acredita-se que a disponibilidade e os teores deste elemento no solo não serão alterados ao longo do tempo. Desta forma, além dos tratamentos utilizados no presente trabalho, outras medidas devem ser adotadas a

fim de fornecer condições de estabelecimento de essências florestais em ambientes contaminados por metais pesados, com ênfase ao cobre, visando a revegetação e, conseqüentemente, a exploração destas áreas.

## 8.5 Conclusões

A O óleo essencial de *Eucalyptus grandis* favorece o crescimento de mudas de eucalipto micorrizadas com o isolado UFSC Pt 116, quando aplicado diretamente no substrato durante o crescimento das mesmas em casa de vegetação;

As mudas de *E. grandis* que receberam aplicação do óleo essencial de eucalipto apresentaram maior porcentagem de colonização micorrízica;

O óleo essencial de *E. grandis* aplicado em mudas de eucalipto micorrizadas favorece o crescimento e a sobrevivência das plantas em solo contaminado por cobre.

## 8.6 Referências bibliográficas

ACCIOLY, A. M. A. et al. Amenização do calcário na toxidez de zinco e cádmio para mudas de *Eucalyptus camaldulensis* cultivadas em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 775-783, julho-agosto 2004.

ACCIOLY, A. M. A.; SOARES, S. C. R. F.; SIQUEIRA, J. O. Silicato de cálcio como amenizante da toxidez de metais pesados em mudas de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p.180-188, fevereiro 2009.

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

AMEZCUA-ALLIERI, M. A.; LEAD, J. R.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Impact of microbial activity on copper, lead and nickel mobilization during the bioremediation of soil PAHs. **Chemosphere**, Atlanta, v. 61, n. 4, p. 484–491, october 2005.

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. 51-59, dezembro 2004.

ANGELINI, G. A. R. **Seleção de fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos para simbioses eficientes com leguminosas arbóreas do gênero *Acácia***. 2008, 93f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BÂ, A. M. et al. Management of ectomycorrhizal symbionts associated to useful exotic tree species to improve reforestation performances in tropical Africa. **Annals of Forest Science**, Champenoux, v. 67, n. 3, p. 298-307, may 2010.

BADORA, A. et al. Immobilization of zinc and cadmium in polluted soils by polynuclear Al<sub>13</sub> and Al-Montmorillonite. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, Michigan, v. 7, n. 5, p. 573-588, september-october 1998.

BAGO, B. et al. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. **Plant Physiology**, Urbana, v.131, n.3, p. 1496-1507, march 2003.

BARKER, S. J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, Urbana, v. 116, n. 4, p. 1201-1207, april 1998.

BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, Melbourne, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, december 2008.

BAUM, C. et al. Heavy metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix x dasyclados*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 169, n. 4, p. 516-522, august 2006.

BELLION, M. et al. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 254, n. 2, p. 173-181, january 2006.

BONNASSIS, P. A. P. **Caracterização de isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção do crescimento e na colonização radicular de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2007, 69f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. Canberra, ACIAR, 1996. 374p.

CHÁVEZ, D. M.; PEREIRA, G. C.; MACHUCA, Á. H. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. **Bosque**, Valdivia, v. 30, n. 1, p. 4-9, enero/abril 2009.

CUMMING, J. R. et al. Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum in vitro. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 31, n. 4, p. 703-710, april 2001.

DINIZ, P. F. A. **Influência do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*) sobre características biofísicas, nutricionais, metabólicas e anatômicas em plantas jovens de seringueira**. 2007, 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

FABROWSKI, F. J. et al. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* R. T. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 95-106, june 2003.

FERNÁNDEZ, M. et al. Efeito do revestimento em cobre de contentores de viveiro sobre o crescimento e morfologia radicular de plantas provenientes de estacas e sementes de *Eucalyptus globulus* Labill. **Silva Lusitana**, Lisboa, v.15, n.2, p. 215-227, dezembro 2007.

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

FEYERA, S.; BECK, E.; LÜTTGE, U. Exotic trees as nurse-trees for the regeneration of natural tropical forests, **Trees – Structure and Function**, Darmstadt, v. 16, n. 4-5, p. 245-249, may 2002.

FOMINA, M. et al. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Jena, v. 71, n. 1, p. 371-381, january 2005.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, Tucson, v. 112, n. 2-4, p. 109-119, october 2004.

GE, Y.; MURRAY, P.; HENDERSHOT, W. H. Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. **Environmental Pollution**, Amherst, v. 107, n. 1, p. 137-144, january 2000.

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

GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bonn, v. 223, n. 6, p. 1115-1122, may 2006.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso de metais pesados. In: CURI, N. et al. (Eds.) **Tópicos em Ciência do Solo**. v. I, Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. 430p.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, n. 366, p. 1-11, january 2002.

HEGEDŰS, N. et al. Effect of heavy metals on the glutathione status in different ectomycorrhizal *Paxillus involutus* strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, n. 9, p. 1339-1343, september 2007.



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

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 3-30, setembro 2002.

KHAN, A. G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, Atlanta, v. 41, n. 1-2, p. 197-207, July 2000.

KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 7, n. 7, p. 503-514, July 2006.

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

KRANABETTER, J. M.; DURALL, D. M.; MACKENZIE, W. H. Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 19, n. 2, p. 99-111, February 2009.

LANDERWEERT, R. et al. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. **Trends in Ecology & Evolution**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 248-254, May 2001.

LAWRENSE, H. K. **Sampling and analysis methods**. New York: Lewis Publishers, 1999. 1697p.

LIMA, W. P. **Impacto ambiental do eucalipto**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo. 1996. 301p.

LUDLEY, K. E. et al. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forest is revealed by novel experimental system. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 41, n. 1, p. 117-124, January 2009.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba. 2<sup>a</sup> ed. 1997. 139p.

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

MELLO, A. H. de et al. Estabelecimento a campo de mudas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas com *Pisolithus microparcus* (UFSC Pt 116) em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 149-155, abril/junho 2009.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering Geology**, Milano, v. 60, n. 1-4, p. 193-207, June 2001.

NERI, A. V. et al. Regeneração de espécies nativas lenhosas sob plantio de *Eucalyptus* em área de Cerrado na Floresta Nacional de Paraopeba, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 369-376, abril/junho 2005.

PACHLEWSKI, R.; PACHLEWSKA, J. Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure culture on agar. **Forest Research Institute**, Warsaw, Poland, 1974, 228p.

PÄTSIKKÄ, E. et al. Excess copper predisposes Photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. **Plant Physiology**, Urbana, v. 129, n. 3, p. 1359-1367, July 2002.

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. 2001, 55f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

RÖMHELD, V. Aspectos fisiológicos dos sintomas de deficiência e toxicidade de micronutrientes e elementos tóxicos em plantas superiores. In: FERREIRA, M. E. et al. (Eds.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. 600p.

SCARPINELLA, G. D`A. **Reflorestamento no Brasil e o protocolo de Quioto**. 2002, 182f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F.; KRUGNER, T. L. Utilização de fontes de carbono e caracterização esterásica de fungos ectomicorrízicos. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 237-241, 2003.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p.333-377.

SILVA, R. F. da et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 9-17, setembro/dezembro, 2003.

SILVEIRA, R. L. V. de A. et al. Avaliação do estado nutricional do *Eucalyptus*: diagnose visual, foliar e suas interpretações. In: GONÇALVES, J. L. de M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005. 427p.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3ª ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787p.

SOARES, C. R. F. S. et al. Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 12, n. 3, p. 213-225, dezembro 2000.

SOUZA, L. A. B. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2003, 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

TAYLOR, A. F. S.; ALEXANDER, I. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. **Mycologist**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 102-112, august 2005.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

VANGRONSVELD, J.; ASSCHE, F. V.; CLIJSTERS, H. Reclamation of a bare industrial area contaminated by nonferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. **Environment Pollution**, Amherst, v. 87, n. 1, p. 51-59, 1995.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O.; Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

WEISS, M. et al. Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. **Plant Physiology**, Urbana, v. 114, n. 1, p. 15-27, may 1997.

WONG, K. K. Y.; FORTIN, J. A. Root colonization and intraspecific mycobiont variation in ectomycorrhiza. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 8, n. 3, p. 197-231, 1990.

YING CHU, E.; MÖLLER, M. de R. F.; CARVALHO, J. G. de. Efeitos da inoculação micorrízica em mudas de gravioleira em solo fumigado e não fumigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 4, p. 671-680, abril 2001.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, june 2007.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho, evidenciou-se que o óleo essencial extraído de folhas de *Eucalyptus grandis*, essência florestal conhecidamente micossimbionte, apresenta influência sobre o crescimento e desenvolvimento de isolados ectomicorrízicos.

Da mesma forma, a aplicação do óleo essencial nas mudas de eucalipto resultou em maior crescimento destas, provavelmente devido a alterações fisiológicas nas plantas, decorrentes da presença dos compostos constituintes dos metabólitos secundários do eucalipto e aos benefícios da colonização ectomicorrízica, a qual também foi favorecida pela presença destes compostos.

Embora o trabalho tenha demonstrado a influência dos compostos presentes no óleo essencial sobre crescimento dos fECM e das plantas de eucalipto e sibipiruna, ainda não foram identificados os compostos responsáveis pelas alterações morfo-fisiológicas tanto nos fungos como nas plantas. Desta forma, o conhecimento dos compostos envolvidos no estímulo ao crescimento destes organismos, possibilitaria a elaboração de aditivos, naturais ou sintéticos, os quais poderiam ser utilizados como bioestimuladores tanto do crescimento fúngico como da micorrização de essências florestais, micossimbiontes ou não, visando a otimização de programas de micorrização controlada.