

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR NORTE – RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-
AGRICULTURA E AMBIENTE**

***Pisolithus microcarpus* e óleo essencial em três espécies nativas em
solo contaminado com cobre**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alex Dellai

Frederico Westphalen, RS, Brasil.

2014

Pisolithus microcarpus e óleo essencial em três espécies nativas em
solo contaminado com cobre

Alex Dellai

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia- Agricultura e Ambiente, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ferreira da Silva

Frederico Westphalen, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dellai, Alex

Pisolithus microcarpus e óleo essencial em três espécies nativas em solo contaminado com cobre / Alex Dellai. - 2014.

63 p.; 30cm

Orientador: Rodrigo Ferreira da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, CESNORS-FW, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura e Ambiente, RS, 2014

1. Contaminação do solo 2. Ectomicorriza 3. Metal pesado I. Silva, Rodrigo Ferreira da II. Título.

© 2014

Todos os direitos reservados a Alex Dellai. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Linha Sete de Setembro, s/n – BR 386 km 40, Frederico Westphalen – RS. CEP 98400-000.

Email: Adellai2@yahoo.com.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR NORTE – RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-
AGRICULTURA E AMBIENTE

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

***Pisolithus microcarpus* e óleo essencial em três espécies nativas em
solo contaminado com cobre**

Elaborado por

Alex Dellai

Como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**

COMISSÃO EXAMINADORA



Rodrigo Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)

(Presidente/Orientador)



Zaida Inês Antonioli, Dr. (UFSM)



Clovis Orlando Da Ros, Dr. (UFSM)

Frederico Westphalen, Fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da existência.

Aos meus pais Jaime Dellai e Enoemia de Arruda Dellai pelo apoio e incentivo aos estudos.

Ao meu irmão Jacso Dellai pelo esforço em incentivar a buscar algo a mais.

A Adriana pela compreensão e aos momentos que passamos juntos.

Ao professor Antonio Luis Santi pela oportunidade de início na pesquisa científica.

Ao professor orientador Rodrigo Ferreira da Silva pela honra de ser seu orientado, pelas conversas, ensinamentos que serão levados por toda a vida e pela amizade durante o mestrado.

Aos professores Edison Rogerio Perrando e Clovis Orlando Da Ros pela orientação no trabalho.

Aos amigos Sidinei Weirich, Rudinei De Marco, Gilvan Bertollo, Ezequiel Koppe, Douglas Scheid, Fabricio Herpich pelas conversas, troca de idéias e aos momentos de descontração.

Aos colegas do grupo de pesquisa, Rudinei De Marco, Gilvan Bertollo, Douglas Scheid, André Grolli, Hazael de Almeida, Patricia Viel, Helena Trombeta, e outros pelo auxílio a realização dos trabalhos.

A Capes pelo auxílio da bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente/UFSM-FW, pelos ensinamentos, orientação e amizade.

A Universidade Federal de Santa Maria, campus de Frederico Westphalen – RS, pela área experimental, laboratórios, equipamentos, etc.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do mestrado.

MUITO OBRIGADO

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente

Universidade Federal de Santa Maria

Pisolithus microcarpus e óleo essencial em três espécies nativas em solo contaminado com cobre

AUTOR: ALEX DELLAI

ORIENTADOR: RODRIGO FERREIRA DA SILVA

Frederico Westphalen, RS, Fevereiro de 2014

Áreas de mineração e as que recebem constantemente adição de resíduos industriais estão sujeitas ao aumento dos teores de cobre no solo. O cobre quando em quantidades elevadas no solo pode interferir negativamente na produção vegetal. O objetivo desse trabalho foi possibilitar a formação de ectomicorriza e avaliar a sua influência no desenvolvimento de arbóreas nativas em solo contaminado com cobre. Nesse sentido, foi estabelecido um experimento para avaliar o comportamento de mudas de angico, bracatinga e grápia em solo contaminado por cobre. Na sequência foi conduzido outro experimento *IN VITRO* avaliando a influência de óleo essencial de eucalipto no estabelecimento de associação ectomicorrízica em mudas de bracatinga e grápia. E avaliou-se a influência do óleo essencial de eucalipto e da inoculação de *Pisolithus microcarpus* no crescimento de mudas de bracatinga em solo contaminado com cobre. Os resultados indicam que a grápia foi menos influenciada pelas doses crescentes de cobre aplicadas ao solo e o angico foi a espécie que teve menor translocação de cobre para a parte aérea. A bracatinga apresentou manto fúngico ao redor das raízes sem a adição de óleo essencial, no entanto, na presença do óleo, aumentou o percentual de pelos colonizados. A grápia necessitou de estímulo do óleo essencial de eucalipto para formar associação ectomicorrízica. Não foi observado efeito da inoculação de *Pisolithus microcarpus* no crescimento das mudas de bracatinga em solo contaminado com cobre, no entanto, observou-se maior altura na dose de 180 mg kg⁻¹ com a aplicação de 40 µL L⁻¹ de óleo essencial de eucalipto. Doses de cobre a partir de 180 mg kg⁻¹ inibem a formação de ectomicorriza nas mudas de bracatinga.

Palavras chaves: ectomicorriza, bracatinga, grápia.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post-Graduate Program in Agronomy: Agriculture and Environment

Federal University of Santa Maria

Pisolithus microcarpus and essential oil in there native species in soil contaminated wich copper

AUTHOR: ALEX DELLAI

ADVISOR: RODRIGO FERREIRA DA SILVA

Frederico Westphalen, RS, February, 2014

Mining areas and constantly receiving addition of industrial waste are subject to increased levels of copper in the soil. Copper when in high amounts in the soil can adversely affect vegetation preventing the cultivation of contaminated areas. The aim of this study was to allow the formation of ectomycorrhiza and assess their influence on the development of native tree in soil contaminated with copper. Accordingly, an experiment was established to evaluate the behavior of mimosa, grapia and bracatinga seedlings in copper contaminated soil. Following, another experiment was conducted to evaluate *in vitro* the influence of eucalyptus essential oil in the establishment of ectomycorrhizal association in bracatinga and grapia seedlings. We evaluated also the influence of eucalyptus essential oil and *Pisolithus microcarpus* inoculation on growth of bracatinga seedlings in soil contaminated with copper. The results indicate that grápia was less affected by increasing doses of copper applied to the soil and angico that showed lower translocation to leaf area. The bracatinga ectomycorrhizal association formed without the addition of essential oil, however, the presence of oil increased the percentage of ectomycorrhizal colonization, grápia required stimulus eucalyptus essential oil to form ectomycorrhizal association. No effect of inoculating *Pisolithus microcarpus* was observed in seedling growth bracatinga in soil contaminated with copper, however, we observed a higher altitude at a dose of 180 mg kg^{-1} with the application of 40 l L^{-1} essential oil eucalyptus . Copper doses from 180 mg kg^{-1} inhibit the formation of ectomycorrhiza on seedlings bracatinga .

Keywords: ectomycorrhiza, bracatinga, grápia.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Altura, diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca parte radicular (MSPR), comprimento raiz principal (CRP), área superficial específica (ASE), relação altura/diâmetro de colo (H/D) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de angico, bracatinga e grápia submetidas a doses de cobre.....27

Tabela 2 - Relação entre o teor de cobre da raiz e da parte aérea na dose zero (R/PA_0) e na dose máxima de cobre (R/PA_{120}) e o coeficiente de impacto no teor relativo de cobre (CITR) das mudas de angico, bracatinga e grápia.....32

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Presença/ausência de associação ectomicorrízica e percentual de pelos radiculares colonizados (%PRC) em bracatinga e grápia inoculadas com o isolado UFSC–Pt116, *in vitro*. Frederico Westphalen, RS, 2012.....40

Tabela 2 - Altura de planta, comprimento radicular (CR), massa fresca da parte aérea (MFA), número de folhas (NF), massa fresca radicular (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) de plântulas de bracatinga e grápia, Frederico Westphalen, RS, 2012.....43

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Altura, Diâmetro do colo, Relação altura diâmetro do colo (H/D), índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de bracatinga submetidas aos tratamentos: testemunha, óleo, fungo e óleo + fungo em solo contaminado com doses de cobre.....54

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** - Equações de regressão da altura (A), diâmetro do colo (B), massa seca da parte aérea – MSPA (C), massa seca parte radicular – MSPR (D), comprimento da raiz principal – CRP (E), área superficial específica – ASE (F), relação altura/diâmetro - H/D (G) e índice de qualidade de Dickson – IQD (H) das mudas de angico, bracatinga e grápia com as doses de cobre aplicadas no solo.....29
- Figura 2** - Análise multivariada da altura, diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA, massa seca parte radicular (MSPR), comprimento da raiz principal (CRP), área superficial específica (ASE), relação altura/diâmetro (H/D) e índice de qualidade de Dickson (IQD) das mudas de angico (A), bracatinga (B) e grápia (C) com aplicação de doses de cobre no solo. Frederico Westphalen, RS, 2013.....31

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Morfologia externa (A) e interna (B) de raízes não micorrizadas (Controle), morfologia externa (C) e interna (D) de raízes micorrizadas (Tratamento inoculado + óleo) de plântulas de bracatinga e grápia. (MF) manto fúngico, (RH) rede de Harting, inóculo *Pisolithus microcarpus*. Frederico Westphalen, 2012.....42
- Figura 2** - Contribuição efetiva dos tratamentos (CET %) óleo, inoculado e inoculado + óleo para a massa seca da parte aérea das plântulas de bracatinga e grápia.....44

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Percentual de colonização radicular de mudas de bracatinga obtida nos tratamentos fungo e óleo + fungo, submetida as dose de 0, 60, 120, 180 e 240 mg de Cu kg⁻¹ de solo.....53
- Figura 2** - Equações de regressão para altura (A), diâmetro do colo (B), Relação altura/diâmetro do colo (H/D) (C) e índice de qualidade de Dickson (IQD) (D) das mudas de bracatinga submetidas aos tratamentos: testemunha, óleo, fungo e óleo + fungo, em solo contaminado com doses de cobre.....55
- Figura 3** - Massa seca da parte aérea (MSPA) (A), massa seca da parte radicular (MSPR) (B), comprimento radicular (CR) (C), Área superficial específica (ASE) (D) das mudas de bracatinga submetidas aos tratamentos: testemunha, óleo, fungo e fungo + óleo, em solo contaminado com doses de cobre.....67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CARACTERÍSTICA E IMPORTÂNCIA DO COBRE.....	13
2.2 ÁREAS CONTAMINADAS COM COBRE.....	14
2.3 ECTOMICORRIZAS NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS EM SOLO CONTAMINADO	15
2.4 ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO COMO ESTIMULADOR DA FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZA	16
2.5 ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS USADAS EM ÁREAS CONTAMINADAS POR METAIS PESADOS.	16
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
3 CAPITULO I	23
3.1 RESUMO.....	23
3.2 ABSTRACT	23
3.3 INTRODUÇÃO	24
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.6 CONCLUSÕES	32
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
4 CAPITULO 2.....	36
4.1 RESUMO.....	36
4.2 ABSTRACT	36
4.3 INTRODUÇÃO	37
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.6 CONCLUSÃO	45
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
5 CAPITULO 3.....	48
5.1 RESUMO.....	48
5.2 ABSTRACT:	48
5.3 INTRODUÇÃO	49
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	50
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.6 CONCLUSÕES	58
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
6 DISCUSSÃO	61
6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação do solo por metais pesados vem aumentando no Brasil por ocasião das atividades antrópicas. Dentre as principais atividades que causam acúmulos de cobre no solo se destaca a mineração e o descarte de resíduos industriais. O cobre é um elemento essencial ao desenvolvimento das plantas por atuar na fotossíntese. Entretanto, quando presente em elevadas concentrações no solo pode se tornar tóxico e causar redução na produção de plantas, ser lixiviado e contaminar águas superficiais e subsuperficiais, além de poder circular na cadeia alimentar. Diante disso, torna-se necessário estudar alternativas que alterem a disponibilidade de cobre no solo, reduzindo a contaminação do solo.

O uso de plantas em áreas contaminadas acelera o processo de recuperação do solo, pois através do sistema radicular ocorre a liberação de substâncias quelatizantes de metais pesados. Algumas plantas apresentam capacidade de associação simbiótica com microrganismos do solo, como os fungos ectomicorrízicos. Esses fungos ao se associarem ao sistema radicular das plantas contribuem para o aumento da absorção de água e nutrientes. Nas raízes com associação ectomicorrízica ocorre a formação de manto fúngico, situado ao redor das raízes, o qual atua como uma barreira física e química a presença de metais pesados e poluentes presentes no solo, em troca de fotoassimilados produzidos pelas plantas.

No entanto, a formação da ectomicorriza depende da especificidade do fungo e da planta, havendo, portanto diferença na capacidade de estabelecimento desta associação. O início da associação é induzida por sinais bioquímicos emitidos pelo sistema radicular, desencadeando a fase pré-simbiótica. Nesse sentido, tem sido proposto o uso de óleo essencial de eucalipto como estimulante da fase pré-simbiótica em espécies que apresentam dificuldade na formação de ectomicorriza.

A maioria dos estudos relacionados à formação de ectomicorriza refere-se a espécies exóticas do gênero *Eucalyptus* e *Pinus*. Aliado a isso pouca ênfase tem se dado a formação deste tipo de associação em espécies nativas do Rio Grande do Sul, às quais apresentam poucos relatos científicos de associação e possuem potencial para serem indicadas para uso na de ambientes contaminados por metais pesados.

Contudo, é possível que algumas espécies arbóreas nativas possuam a capacidade de formação de ectomicorriza, e que essa associação promova maior crescimento das plantas. E ainda, que o óleo essencial de eucalipto possa atuar como precursor da formação de ectomicorriza, resultando em melhorias no crescimento de arbóreas nativas em solo

contaminado por cobre. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi estudar espécies arbóreas nativas tolerantes ao cobre, avaliar a formação de ectomicorriza e relacionar a sua influência no desenvolvimento de arbóreas nativas em solo contaminado com cobre.

Para atender as hipóteses e os objetivos propostos neste trabalho foram realizados três experimentos com espécies nativas arbóreas do Rio Grande do Sul. O primeiro experimento envolveu a análise do comportamento de mudas de Angico (*Parapiptadenia rígida*), bracatinga (*Mimosa scabrella Benth*) e grápia (*Apuleia leiocarpa*) submetida a doses de cobre aplicadas ao solo. O segundo trabalho avaliou o uso de óleo essencial de eucalipto como estimulante da formação de ectomicorriza em bracatinga e grápia *IN VITRO*. E o terceiro experimento avaliou a contribuição do óleo essencial de eucalipto e *Pisolithus microcarpus* no crescimento de bracatinga em solo contaminado com cobre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Característica e importância do cobre

O cobre é considerado um metal pesado por possuir densidade superior a 6 g cm^{-3} , mais especificamente $8,96 \text{ g cm}^{-3}$ (KING, 1996). O teor de cobre nos solos depende da rocha matriz e também da intensidade dos processos de formação (físico, químico e biológico) sobre a rocha (KING, 1996). As principais formas de cobre no solo são íons livres ou complexados na solução do solo, íons trocáveis no material orgânico, íons retidos aos complexos de troca, íons adsorvidos em óxidos precipitados, incorporados a microrganismos e retidos nas estruturas de minerais primários e secundários (MARTINS, 2005). No Brasil os teores críticos para o cobre em solos agrícolas é de 200 mg kg^{-1} (CETESB, 2005).

De acordo com Yruela, (2013) o cobre é um micronutriente essencial para as plantas, sendo um pré-requisito para seu crescimento e desenvolvimento. Esse metal é absorvido pelas plantas na forma de cátion ou quelato, em pequenas quantidades, sendo um elemento relativamente móvel em plantas bem nutridas, podendo ser translocado de folhas velhas para jovens e seus teores no tecido vegetal está em torno de 220 mg kg^{-1} de matéria seca (FLOSS, 2011).

Nas plantas o cobre atua como ativador de enzimas que participam de reações de oxirredução, participando de muitos processos fisiológicos, como fotossíntese, respiração, translocação de açúcares, fixação biológica do nitrogênio, redução do nitrato, metabolismo de proteínas, formação de parede celular, síntese de DNA e RNA, aumentando a resistência das plantas a moléstias (FLOSS, 2011; MARSCHNER, 2011). O cobre é também um componente estrutural essencial de enzimas e proteínas envolvida em reações de transferência de elétrons, como por exemplo, na enzima mitocondrial citocromo-oxidase e na proteína plastocianina dos cloroplastos das plantas (HOODA, 2010). A deficiência de cobre afeta folhas jovens, causando clorose e a redução da atividade fotossintética (YRUELA, 2013), além de reduzir a lignificação dos vasos do xilema, reduzindo o transporte de água e solutos (DECHEN e NACHTIGALL, 2006).

Porém em excesso no solo, o cobre causa sintomas de toxicidade e redução da fotossíntese (YRUELA, 2009). Assim é necessário que a homeostase do cobre seja coordenada e regulada precisamente (YRUELA, 2013). Conforme Yruela (2009), altas

quantidades de cobre no solo podem causar toxicidade extrema às plantas, apresentando sintomas de clorose, necrose, nanismo, inibição do crescimento das raízes e folhas e distúrbios na estrutura das proteínas. Dessa forma, a deficiência ou o excesso de cobre interferem em importantes processos fisiológicos da planta e ainda reduzem a absorção de fósforo (DECHEN e NACHTIGALL, 2006).

No entanto, as plantas apresentam mecanismos celulares de tolerância ao cobre como a redução da absorção através da ação de micorrizas ou exsudatos extracelulares, imobilização do excesso de cobre nas raízes e exclusão da parte aérea, estimulação do bombeamento do efluxo do metal na membrana plasmática, quelação do metal por fitoquelatinas, metalotioneínas e ácidos orgânicos e compartimentalização no vacúolo (HALL, 2002; KRÄMER e CLEMENS, 2006). Dessa forma, os mecanismos de tolerância podem contribuir para a produção de plantas em áreas que apresentam contaminação por cobre.

2.2 Áreas contaminadas com cobre

Estimativas indicam que somente no Estado de São Paulo possui 543 áreas contaminadas com metais pesados (CETESB, 2011). As áreas de contaminação por cobre também estão em expansão, sendo a mineração e o beneficiamento de seus produtos, a queima de combustíveis fósseis, aplicação de lodos de esgotos, águas residuais e de resíduos industriais as principais fontes de contaminação por cobre no solo (ANDREAZZA, 2009). Diante disso, o uso continuado de uma ou mais fontes de cobre para fins agrícolas podem causar o acúmulo do elemento no solo (MARTINS, 2005) e também o acúmulo desse elemento na cadeia alimentar (BALASSA et al., 2010).

Na produção suinícola, os resíduos gerados por essa atividade são utilizados como fertilizante em áreas cultivadas com culturas anuais e pastagem (BASSO et al., 2012). Entretanto, os dejetos de suínos possuem na sua constituição concentrações de metais pesados como Cu e Zn (MATTIAS et al., 2010). Dessa forma, o uso de dejetos líquidos de suínos, nas mesmas áreas, por vários anos, pode potencializar a toxidez às plantas e aos organismos do solo pelo acúmulo de metais pesados (GIROTO, 2010).

2.3 Ectomicorrizas no desenvolvimento de plantas em solo contaminado

O termo micorriza foi proposto por Albert Bernard Frank, palavra grega que significa *mykes* (fungo) e *rhiza* (raiz) (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Os benefícios da simbiose micorrízica no estabelecimento e crescimento das essências florestais a campo representa ainda uma alternativa de baixo impacto ambiental (OLIVEIRA e GIACHINI, 1999; SOUZA et al., 2006).

Alguns microrganismos do solo auxiliam no estabelecimento de plantas em áreas de difícil adaptação, destacando-se os fungos ectomicorrízicos, que ao associarem-se com as raízes das plantas desenvolvem estruturas que aumentam a absorção de água e nutrientes pelas plantas (SILVA et al., 2003a; 2003b; ANDREAZZA et al., 2004). O componente fúngico das ectomicorrizas localiza-se nos espaços intercelulares do córtex radicular, sem que ocorra penetração intercelular (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SMITH e READ, 2008). As modificações estruturais das raízes colonizadas pela presença de um manto fúngico, altera a interface solo-planta, formando uma barreira físico-química, protegendo as plantas da presença de metais pesados e outros poluentes tóxicos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Desse modo, essa associação poderá contribuir no estabelecimento de plantas em solos contaminado por cobre.

O efeito protetor das ectomicorrizas em relação aos metais tem sido explicado pela presença da hifa nas células corticais das raízes, as quais reduzem a absorção ou translocação dos metais para a parte aérea e impedem que atinjam concentrações tóxicas às plantas. Desse modo, a maior tolerância das plantas colonizadas se deve a capacidade do fungo ectomicorrízico em reduzir ou prevenir a translocação dos metais para a parte aérea, por reter os metais sobre ou dentro do micélio e não da maior absorção do metal pelas raízes (GRAZZIOTTI et al., 2003).

Os fungos ectomicorrízicos possuem capacidade de acumular metais (MEDVE e SAYRE, 1994). De acordo com Gadd (1993) existem mecanismos internos nas células dos fungos em que os metais podem ser compartimentalizados, complexados e volatilizados. Os fungos ectomicorrízicos produzem pigmentos como a melanina, que tem sido considerado o principal mecanismo de precipitação de metais pesados (BERTOLAZI et al., 2010).

A presença do fungo nas raízes pode atuar como barreira, podendo impedir os metais de entrarem no sistema radicular ou de atingirem sítios de ação (GRAZZIOTTI et al., 2003). Ruytinx et al. (2013) estudando o comportamento de *Suillus bovinus* em relação a concentrações crescentes de zinco, observaram tolerância, por meio de mecanismo de

exclusão do zinco, que pode reduzir a transferência para a parte aérea em plantas colonizadas. Silva et al. (2013) trabalhando com isolados de *Pisolithus sp.*, *Suillus sp.* e *Scleroderma sp.* em meio de cultura contaminado com cobre, encontrou isolados que produzem grande quantidade de pigmentos extracelulares que, conforme Gadd (1993), podem ser constituídos por melaninas, que possuem muitos sítios de adsorção e ligação de íons metálicos.

2.4 Óleo essencial de eucalipto como estimulador da formação de ectomicorriza

Os óleos essenciais, conhecidos também como óleos voláteis são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação, sendo líquido na temperatura ambiente e apresentam aparência oleosa (VITTI e BRITO, 2003). Esses óleos são produzidos por estruturas secretoras como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, conferindo características organolépticas (SIMÕES e SPITZER, 2004; BRIZZO et al., 2009). Os óleos das folhas de eucalipto são formados por uma complexa mistura de componentes, com até 100 compostos orgânicos voláteis, dentre os quais se destacam hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres (DORAN, 1991; VITTI e BRITO, 2003).

A germinação de esporos é a primeira etapa para a formação de ectomicorizas (SIQUEIRA et al., 2010), a qual pode estar associado a produção de compostos exsudados pelas raízes da planta hospedeira (CARVALHO et al., 1997), atuando como sinais bioquímicos que estimulam a associação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). De acordo com Steffen et al. (2012) a utilização de óleos essenciais de folhas de eucalipto pode ser uma alternativa para estimular o estabelecimento de ectomicorriza em espécies nativas do Brasil, em que o óleo essencial pode atuar como sinais bioquímicos.

Em seus trabalhos, Steffen et al. (2010) observaram que o óleo essencial de *Eucalyptus grandis*, utilizado em meio de cultura líquido, apresenta eficiência para o aumento da massa seca do micélio fúngico e na tolerância aos metais pesados como o cobre, zinco e níquel do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus*. Desse modo, o uso do óleo essencial de eucalipto pode facilitar o desenvolvimento dos fungos ectomicorrízicos, podendo proporcionar maior tolerância a metais pesados no solo.

2.5 Espécies arbóreas nativas usadas em áreas contaminadas por metais pesados.

Conforme Marques et al. (2011), o Brasil possui grande biodiversidade, favorecendo processos biológicos no tratamento das áreas contaminadas. Diante disso, observa-se a

necessidade da realização de pesquisas que envolvam o uso de organismos vivos na tentativa de reabilitação de áreas contaminadas.

Pesquisas têm indicado o potencial de espécies nativas do Brasil para o uso em ambientes contaminados por metais pesados. Pereira et al. (2012) estudando *Acacia angustissima* (Mill.)Ktze.; *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan; *Cordia africana* Lam.; *Mimosa caesalpineafolia* Benth. em solo reconstruído após sete anos, encontraram resultados indicando que as espécies *A. angustissima* e *C. africana* apresentaram maior diâmetro altura do peito e profundidade de raízes finas, que as outras espécies. As concentrações de Cu, Mn, Pb e Zn ficaram abaixo do normal para as plantas, enquanto que o Cd a concentração foi maior que a normal. As espécies apresentaram tolerância a áreas contaminadas com Cd, que se acumulou nas raízes das plantas, com exceção da *C. africana*.

Silva et al. (2011a) trabalhando com *Luehea divaricata* e *Schinus therebinthifolius* Raddi em solo contaminado com doses crescente de cobre evidenciaram que as mudas de *Schinus therebinthifolius* não apresentaram alteração na qualidade de mudas, enquanto que as mudas de *Luehea divaricata* apresentaram melhor qualidade com a aplicação de 64 mg kg⁻¹.

As espécies arbóreas nativas respondem de maneira diferenciada em solos contaminados com cobre. Mudanças de *Enterolobium contortisiliquum* e *Peltophorum dubium* apresentam maior armazenamento do cobre nas raízes, com baixa translocação para a parte aérea, tendo sua massa seca da parte aérea incrementada com pequenas doses do metal, enquanto que a massa seca de *Parapiptadenia rigida* não é afetada (SILVA et al., 2011b). Enquanto Caires et al. (2011) observaram em mudas de *Cedrela fissilis* que o aumento da concentração de cobre no solo promoveu maior crescimento das raízes em relação a parte aérea, e maior quantidade de cobre acumulada nas raízes, excluindo o metal da parte aérea.

No que se refere à plantas arbóreas nativas com potencial para serem utilizadas em solos degradados e contaminados por metais, a bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) da família das Fabaceas é uma espécie heliófita de rápido crescimento e pouco exigente quanto às condições físicas dos solos (REITZ et al. 1978). Devido a rápida cobertura do solo e ao acúmulo de nutrientes nas folhas, a bracatinga é recomendada para a implantação de florestas em solos alterados pela mineração do xisto (SIMÕES et al. 1978). A bracatinga é considerada uma espécie adequada para a recuperação de áreas degradadas, mantendo um crescimento razoável e com deposições expressivas de material orgânico rico em nitrogênio (CARPANEZZI et al., 1988), essa espécie apresenta índice de sobrevivência maior que 92% quando utilizada em áreas degradadas pela mineração da fração argila (REGENSBURGER et al., 2008)

A grápia (*Apuleia leiocarpa*) é uma espécie florestal pertencente a família das Fabaceas, possui madeira pesada, sem falhas e durável (MATTOS, 2002). O angico vermelho (*Parapiptadenia rigida*) é uma espécie florestal da família das Fabaceas, é uma espécie eficiente em acumular cobre no seu tecido, reduzindo a disponibilidade desse metal no solo (PEREIRA et al., 2012). Esta espécie é recomendada para reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente, podendo ser usada em associações secundárias mais evoluídas (LORENZI, 1992).

2.6 Referências Bibliográficas

ANDRADE, M. G. et al. Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo. I – fitoextração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p.1879-1888, 2009.

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, p.51-60, 2004.

BALASSA, G. C.; SOUZA, D. C.; LIMA, S. B. Evaluation of the potential of *Pontederia parviflora* Alexander in the absorption of copper (Cu) and its effects on tissues. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 32, p. 311-316, 2010.

BERTOLAZI, A. A. et al. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. **Natureza on line** v. 8, p. 24-31, 2010.

BASSO, C. J. et al.; Teores totais de metais pesados no solo após aplicação de dejetos líquidos de suínos. **Ciência Rural**, vol.42, p.653-659, 2012.

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

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

BRIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, 588-594, 2009.

CAIRES, S. M. et al. Desenvolvimento de mudas de cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. **Revista Árvore**, v. 35, p. 1181–1188, 2011.

CARPANEZZI, A.; A.; et.al. **Manual técnico da bracatinga (Mimosa scabrella Benth)**, Curitiba, 70p, 1988.

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, p. 1443-1452, 2001.

CARVALHO, D. et al. Produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra e interpopulacional para fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. **Cerne**, v.3, p.143-160, 1997.

CASALI, C. A. et al. Formas e dessorção de cobre em solos cultivados com videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p.1479-1487, 2008.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**.p. 1-4 ,2005.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo**. São Paulo, 2011, 11 p.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes. In: Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327-354.

DORAN, J.C. **Commercial sources, uses, formation, and biology**. In: BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A.P.N. Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: Inkata, 1991. p.11-28.

EMBRAPA. **Produção de vinho e mosto de uva em 2009**. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/produtos/vitivinicultura/producao/2005_2009_rs.html.html. Acesso em: jun. 2013.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê**. Passo Fundo. Universidade de Passo Fundo. 2011. 5 ed. 734p.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 145-156, 2005.

GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, p. 25–60, 1993.

GIROTTI, E. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas cultivadas em solos com acúmulo de cobre e zinco**. 1999. 152p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2010.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso de metais pesados. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 05, p. 55-105, 2003.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**. v.53, p.1-11, 2002.

HOODA, P. S. **Trace Elements in Soils**. Ed. 1. United Kingdom: Wiley-Blackwell. 2010. 616 p.

KRÄMER, U.; CLEMENS, S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: Tamás M, Martinoia E (eds) **Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification from Microbes to Man**. Berlin, Springer, 2006, p. 214-272.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. Ed 4. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2010. 548 p.

KING, L.D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ, V.H.; FONTES, L.E.T.; FONTES, M.P.F. (Eds.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, 1996, p.823-836.

KALIŠOVÁ-ŠPIROCHOVÁ, I. et al. Accumulation of heavymetals by in vitro cultures of plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 3, p. 269-276, 2003.

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

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier/Academic Press, 2011. 684p.

MARQUES, M.; AGUIAR, C. R. C. e JONATAS.; SILVA, J. L. S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, v.35, p. 1-11, 2011.

MARTINS, S. C. **Adsorção e dessorção de cobre em solos sob aplicação de lodo de esgoto e calda bordaleza**. 2005. 99p. (Tese Doutorado) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, 2005.

MATTOS, R.B. **Características qualitativas e possibilidade de ganho de fuste em espécies euxilóforas nativas da região central do Rio Grande do Sul**. 2002 91p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria - RS, 2002.

MATTIAS, J. L. et al. Copper, zinc and manganese in soils of two watersheds in Santa Catarina with intensive use of pig slurry. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 445-454, 2010.

MEDVE, R. J. & SAYRE, W. G. Heavy metals in red pines, basidiomycete sporocarps and soils on bituminous stripmine spoils. **J. Pennsylvania Acad. Sci.** v. 68, p. 131-135, 1994.

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

NACHIGALL, G. R et al. Formas de cobre em solos de vinhedos em função do pH e da adição de cama-de-frango. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 427-434, 2007.

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, 818p, 1999.

PEREIRA, A. C. C. et al. Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 641-647, 2012.

PIRES, F. R. et al. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de tebuthiuron. **Planta Daninha**, v. 21, p. 451-458, 2003.

PROCÓPIO, S. O. et al. Fitorremediação de solo contaminado com trifloxysulfuronosodium por mucuna-preta (*stizolobium aterrimum*). **Planta Daninha**, v. 23, p. 719-724, 2005.

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, p. 1289-1303, 2000.

REITZ, R.; KLEIN, R.M. e REIS, A. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Sellowia, Itajaí, (28/ 30):1-320, 1978.

REGENSBURGER, B.; COMIN, J. J.; AUMOND, J. J.) Integração de técnicas de solo, plantas e animais para recuperar áreas degradadas. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1773-1776, 2008.

RUYTINX, J. et al. Zinc export results in adaptive zinc tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus bovinus*. **Metallomics**, 2013.

SANTOS, C. H. et al. Utilização da mucuna preta (*Mucuna aterrima* Piper e Tracy) para a fitorremediação de solo contaminado por chumbo. **Revista Agro@mbiente**, v. 6, p. 215-221, 2012.

SANTOS, T. C. et al. Fitorremediação: avaliação do potencial de recuperação em solos contaminados com metais pesados. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, p.1-10, 2011.

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

SILVA, R.F.; et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. **Bioscience Journal**, v.19, p.9-17, 2003b.

SILVA, R. F. et al. Influência da contaminação do solo por cobre no crescimento e qualidade de mudas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. e Zucc.) e aroeira-vermelha (*Schinus therebinthifolius* Raddi). **Ciência Florestal**, v. 21, n. 1, 2011a.

SILVA, R. F. DA et al. Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, v. 21, p. 103–110, 2011b.

SILVA, R. F. et al. Copper resistance of different ectomycorrhizal fungi such as *Pisolithus microcarpus*, *Pisolithus* sp., *Scleroderma* sp. and *Suillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 613–622, 2013.

SIMÕES, J.W. et al. Implantação de espécies florestais em solo alterado pela exploração do xisto. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE ECOLOGIA, 1, Curitiba, **Anais**. v.5. Curitiba, Instituto de Terras e Cartografia, p.61-8, 1978.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A, PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. UFSC, 2004. 821p.

SIQUEIRA, J. O et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. UFLA-Lavras, 2010, 716 p.

SOUZA, V. C. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 612-618, 2006.

STEFFEN, R. B. **Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização e do estabelecimento de mudas de eucalipto e sibipiruna em solo contaminado com cobre**. 2010, 229 p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2010.

STEFFEN, R.B; ANTONIOLLI, Z. I.; SILVA, R. F. Óleo essencial de *Eucalyptus grandis* hill ex maiden no estímulo à micorrização de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, v. 22, p. 69-78, 2012.

SU, G. et al. Peanut as a potential crop for bioenergy production via Cd-phytoextraction: A life-cycle pot experiment. **Plant and Soil**, p. 1-9, 2013.

VAN SLYCKEN, S. et al. Safe use of metal-contaminated agricultural land by cultivation of energy maize (*Zea mays*). **Environmental Pollution**, v. 178, p. 375–380, 2013.

VITTI, A. M. S e BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Documentos Florestais, Nº 17, 2003, 26p.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1090-1109, 2013.

3 CAPITULO I

Produção de mudas de *Parapiptadenia rigida* (Benth.), *Mimosa scabrella* (Benth.(Brenan) e *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr.) em solo contaminado com cobre

3.1 Resumo

A revegetação pelo cultivo de espécies florestais pode ser uma alternativa para reduzir o impacto da contaminação de cobre no solo. O objetivo desse trabalho foi quantificar o crescimento e avaliar a qualidade de mudas de espécies florestais nativas em diferentes doses de cobre no solo. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete repetições, em arranjo fatorial (3x9), sendo três espécies nativas (angico, bracatinga e grápia) e nove doses de cobre aplicadas ao solo (0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 mg kg⁻¹). O experimento foi conduzido em casa de vegetação onde as mudas foram cultivadas durante 180 dias. As unidades experimentais foram tubetes de 125 cm³ preenchido com solo. Os resultados indicaram que as doses de cobre aplicadas ao solo reduziram com menor intensidade o crescimento e a qualidade das mudas de grápia em relação a bracatinga e ao angico. O angico em comparação com a bracatinga e a grápia foi a espécie florestal que contribuiu com menor translocação de cobre da raiz para a parte aérea.

Palavras chaves: Revegetação, espécies nativas, contaminação por cobre.

3.2 Abstract

Revegetation of copper contaminated sites using forest species may be an efficient alternative to reduce the negative impact. The aim of this study was to quantify the growth and evaluate the quality of seedlings of native species at different doses of copper in the soil. The experimental design was completely randomized, with seven replications in a factorial arrangement (3x9), using three indigenous species of plants (*Parapiptadenia rigida*, *Mimosa scabrella* and *Apuleia leiocarpa*) and nine doses of copper in the soil (0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 and 480 mg kg⁻¹). The experiment was carried out in a greenhouse which the seedlings were grown for 180 days. The experimental units were plastic pots of 125 cm³ filled with Oxisol. The results indicated that the levels of copper applied to the soil decreased the

quality of seedlings and growth of *Apuleia leiocarpa* to a lesser extent compared with *Mimosa scabrella* and *Parapiptadenia rigida*. *Parapiptadenia rigida* was the forest species that resulted in the lowest copper translocation from roots to shoots. In addition, the *Apuleia leiocarpa* exhibited high resistance and tolerance for copper in the soil and also, it is highlighted an ability for copper phytoremediation.

Keywords: Revegetation; native species; copper contamination.

3.3 Introdução

O cobre, embora seja um micronutriente essencial ao desenvolvimento de plantas, quando presente em concentrações elevadas no solo pode causar distúrbios bioquímicos e fisiológicos nas plantas, reduzindo o potencial de crescimento (PANOU-FILOTHEOU et al., 2001; MARSCHNER, 2011). Esta redução no crescimento das plantas foi evidenciada em cultivo de videira, quando se utiliza a calda bordalesa para controle de doenças fúngicas (GIOVANNINI, 1997; CHAIGNON e HINSINGER, 2003; NACHTIGALL et al., 2007) e nos plantios com espécies florestais em solo contaminado por cobre, podendo inibir o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Peltophorum dubium*, (ANTONIOLLI et al., 2010).

De modo geral, as espécies vegetais apresentam diferentes adaptações às concentrações de metais pesados no solo (SILVA et al., 2007). Brunner et al. (2008) destacam que as espécies arbóreas florestais podem ser uma alternativa para uso em solos contaminados por metais, pois apresentam alta capacidade de imobilizar metais no seu tecido, principalmente nas raízes, retardando o seu retorno ao solo (SOARES et al., 2000) e minimizando a contaminação de águas superficiais e subsuperficiais (CAIRES et al. 2011).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento e a qualidade de mudas de angico, bracatinga e grápia em diferentes doses de cobre no solo.

3.4 Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação do Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria, campus de Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (3 x 9), com sete repetições. Foram usadas três espécies nativas (Angico,

Bracatinga e Grápia e nove doses de cobre no solo (0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 mg kg⁻¹), na forma de sulfato cúprico (CuSO₄.5H₂O).

As unidades experimentais (UE) foram tubetes plásticos com volume de 125 cm³, preenchidos com solo classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (Embrapa, 2006), com as seguintes características químicas e físicas: pH_{água}: 4,9; Ca + Mg = 5,4 cmol_c kg⁻¹; Al = 4,3 cmol_c kg⁻¹; H+Al = 6,6 cmol_c Kg⁻¹; P = 6,6 mg dm⁻³; K = 111,0 mg dm⁻³; Zn = 1,6 mg dm⁻³; Cu = 15,1 mg dm⁻³; matéria orgânica = 24 g dm⁻³ e argila = 810 g dm⁻³.

Foram semeadas três sementes por UE e após 15 dias da emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por UE. As sementes foram fornecidas pela Estação de Pesquisas Florestais da FEPAGRO, unidade de Santa Maria, RS. As adubações químicas seguiram as recomendações propostas por Gonçalves e Benedetti (2005). Utilizaram-se três irrigações diárias, mantendo o solo em aproximadamente 80% da capacidade de campo.

Aos 180 dias da semeadura das espécies florestais foram quantificados: a) altura, obtida pela distância do colo até as últimas axilas foliares; b) diâmetro de colo (DC), mensurado com paquímetro digital; c) massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca parte radicular (MSPR), quantificadas após a separação da parte aérea da radicular na região do colo das mudas e secagem em estufa a 60°C, até massa constante; d) comprimento da raiz principal (CRP); e) área superficial específica das raízes (ASE), obtida pelo programa SAFIRA (Embrapa, 2010); f) teor de cobre na parte aérea, determinado conforme a metodologia da Embrapa (2009); g) relação entre o teor de cobre da raiz e da parte aérea na dose zero de cobre (R/PA₀) e na dose máxima de cobre (R/PA₁₂₀); h) coeficiente de impacto do teor relativo de cobre (CITR), calculado pela relação (R/PA₁₂₀)/(R/PA₀); i) índice de qualidade de mudas (H/D), calculado pela relação entre a altura de plantas e diâmetro do colo e; j) índice de qualidade de Dickson (Dickson et al., 1960), conforme a fórmula: IQD = (MSPA + MSPR) (g)/ [AP(cm)/DC(mm)] + [MSPA(g)/MSPR(g)].

Os dados foram submetidos a análise de variância a 5% de probabilidade de erro, pelo programa SISVAR Ferreira, (2011) e análise multivariada dos componentes principais com o auxílio do programa Infostat (Di Riezo et al., 2013). As médias do fator qualitativo (espécies) foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro e as médias do fator quantitativo (doses) foram submetidos a análise de regressão pelo programa SISVAR Ferreira (2011), com nível de 5 % de probabilidade de erro. Com base nas equações de regressão lineares foi estimada a dose de cobre necessária para causar 50% de injúria nas mudas (DR50).

3.5 Resultados e discussão

Os resultados evidenciaram interação significativa entre as espécies e as doses de cobre (Tabela 1 e Figura 1). A grápia foi a espécie que se destacou no crescimento, com maior altura e diâmetro do colo das mudas em relação ao angico e a bracatinga, independente da dose de cobre, exceção da dose de 480 mg kg⁻¹ de cobre que não diferiu do angico (Tabela 1). A massa seca da parte aérea, radicular e o comprimento da raiz principal também foram significativamente maiores na grápia, a partir da adição de 120 mg kg⁻¹ de cobre no solo. Resultados de trabalhos evidenciaram que a suscetibilidade a toxicidade de cobre varia entre as espécies de plantas (Guo et al., 2010) e, isso tem sido atribuído às plantas desenvolver mecanismos para se adaptar a toxicidade de metais (LEQUEUX et al., 2010).

A grápia apresentou relação altura/diâmetro do colo significativamente maior que as demais espécies estudadas a partir de 60 mg kg⁻¹ de cobre, com valores variando de 5,6 a 7,0 (Tabela 1). Enquanto que, doses superiores a 120 e 180 mg kg⁻¹ de cobre para o angico e bracatinga, respectivamente, possibilitaram valores da relação altura/diâmetro do colo abaixo de 5,4. Esta relação se refere ao estiolamento das mudas, sendo um importante critério utilizado por pesquisadores na avaliação da qualidade de mudas no viveiro (SOUZA et al., 2006, CARNEIRO et al., 2007). Os valores dessa relação para as mudas de grápia estão na faixa adequada proposta por Carneiro (1995), que indicou valores de 5,4 a 8,1. Desse modo, pequenas doses de cobre no solo contribuem para o crescimento da grápia sem a possível ocorrência de estiolamento e em doses maiores indica possuir algum mecanismo que possibilita a diminuição do efeito tóxico do cobre em comparação ao angico e a bracatinga.

A bracatinga apresentou maiores valores no IQD que as mudas de angico e a grápia, nos tratamentos testemunha e 60 mg kg⁻¹ (Tabela 1). Respostas diferentes neste índice em espécies arbóreas nativas também foram evidenciados por Ferraz e Engel (2011) em substrato Multiplant®, em que mudas de ipê amarelo apresentaram IQD maior que mudas de guarucaia e jatobá produzidas em tubetes com volume de 300 cm³. O IQD leva em consideração a produção de massa seca total (aérea e radicular), diâmetro do colo e altura de plantas (DICKSON et al., 1960), determinando a robustez e o equilíbrio da distribuição da fitomassa das mudas (FONSECA et al. 2002). Desse modo, o aumento na massa seca da parte aérea das mudas de bracatinga produzidas em doses de até 60 mg kg⁻¹ parece ter contribuído consideravelmente para o aumento do IQD.

Tabela 1 - Altura, diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca parte radicular (MSPR), comprimento raiz principal (CRP), aérea superficial específica (ASE), relação altura/diâmetro de colo (H/D) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de angico, bracatinga e grápia submetidas a doses de cobre.

Espécies	Doses de cobre (mg kg ⁻¹)								
	0	60	120	180	240	300	360	420	480
----- Altura (cm) -----									
Angico	14,2 b*	13,6 b	8,3 b	6,2 b	6,2 b	5,2 b	5,0 b	6,2 b	5,5 b
Bracatinga	11,1 c	12,2 b	9,0 b	3,7 c	3,0 c	2,8 c	2,4 c	2,4 c	2,3 c
Grápia	17,3 a	18,4 a	18,8 a	15,7 a	14,7 a	13,3 a	12,0 a	11,4 a	10,2 a
----- DC (mm) -----									
Angico	2,42 a	2,23 b	1,67 b	1,21 b	1,40 b	1,23 b	1,36 b	1,28 b	1,49 a
Bracatinga	1,89 b	2,06 b	1,68 b	1,22 b	0,96 c	0,97 b	0,99 c	0,89 c	0,96 b
Grápia	2,56 a	2,65 a	2,65 a	2,32 a	2,18 a	1,97 a	1,87 a	2,02 a	1,75 a
----- MSPA (g) -----									
Angico	0,490 a	0,370 b	0,150 c	0,076 b	0,066 b	0,054 b	0,064 b	0,064 b	0,062 b
Bracatinga	0,494 a	0,626 a	0,380 b	0,106 b	0,056 b	0,038 b	0,026 b	0,032 b	0,042 b
Grápia	0,522 a	0,544 a	0,624 a	0,374 a	0,326 a	0,252 a	0,230 a	0,182 a	0,156 a
----- MSPR (g) -----									
Angico	0,178 c	0,134 c	0,054 c	0,036 b	0,030 c	0,024 b	0,032 b	0,026 b	0,040 b
Bracatinga	0,652 a	0,860 a	0,250 b	0,206 b	0,106 b	0,058 b	0,030 b	0,038 b	0,040 b
Grápia	0,312 b	0,356 b	0,386 a	0,300 a	0,284 a	0,202 a	0,146 a	0,140 a	0,104 a
----- CRP (cm) -----									
Angico	13,1 b	13,9 b	13,8 b	13,4 b	13,9 b	9,8 b	8,2 b	7,1 b	5,0 c
Bracatinga	15,5 a	15,5 a	12,8 c	10,5 c	9,4 c	9,4 b	8,2 b	7,7 b	7,8 b
Grápia	15,5 a	15,5 a	15,5 a	15,5 a	15,5 a	15,5 a	12,0 a	11,1 a	10,8 a
----- ASE (cm ²) -----									
Angico	527,5 b	353,9 b	171,5 b	88,5 b	97,8 a	44,7 b	36,6 b	32,5 a	45,1 a
Bracatinga	981,2 a	1387,7 a	342,1 a	158,0 b	150,7 a	71,4 ab	62,1 ab	59,5 a	65,7 a
Grápia	245,7 c	316,2 b	323,6 a	286,6 a	163,1 a	135,0 a	108,0 a	85,0 a	63,6 a
----- H/D -----									
Angico	5,8 a	6,1 ab	4,9 b	5,2 b	4,5 b	4,2 b	3,7 b	4,8 a	3,8 b
Bracatinga	5,8 a	5,9 b	5,4 b	3,0 c	3,1 c	2,9 c	2,5 c	2,7 b	2,4 c
Grápia	6,7 a	6,9 a	7,0 a	6,7 a	6,7 a	6,8 a	6,4 a	5,6 a	5,9 a
----- IQD -----									
Angico	0,080 b	0,056 c	0,024 b	0,016 b	0,012 c	0,012 b	0,016 b	0,014 b	0,018 a
Bracatinga	0,174 a	0,224 a	0,092 a	0,088 a	0,044 b	0,026 b	0,016 b	0,018 b	0,020 a
Grápia	0,100 b	0,108 b	0,118 a	0,086 a	0,078 a	0,056 a	0,046 a	0,046 a	0,036 a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A altura de plantas, massa seca da parte aérea e diâmetro do colo das três espécies estudadas foram reduzidos com a adição das doses de cobre no solo (Figura 1). O angico e a grápia apresentaram reduções mais acentuadas, com menor altura nas doses de 350 e 406 mg

kg⁻¹ de cobre, respectivamente, em relação à grápia que teve redução linear, atingindo 50 % de injúria na dose de 569 mg kg⁻¹ (Figura 1A). De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001) o excesso de cobre reduz a taxa fotossintética por interferir na cadeia transportadora de elétrons do fotossistema I, diminuindo a produção de fotoassimilados pelas plantas, ocasionando redução no crescimento vegetal. Resultados semelhantes foram encontrados por Caires et al. (2011) em que a massa seca da parte aérea de cedro rosa foi significativamente reduzida por doses de cobre em mudas cultivadas em Latossolo Amarelo Distrófico com textura média.

A massa seca radicular das mudas de grápia também apresentou menor redução com o aumento das doses de cobre em relação ao angico e a bracatinga (Figura 1D). Conforme Kahle (1993) a toxidez por cobre no sistema radicular, induz a redução de raízes secundárias, diminuindo a capacidade das plantas em absorver nutrientes, ocasionando redução no crescimento da planta. De acordo com Taiz e Zeiger (2006) as plantas podem apresentar diferentes adaptações bioquímicas que permitem tolerar concentrações elevadas de cobre no solo. Desse modo, as mudas de grápia parecem possuir adaptações bioquímicas por apresentarem valores de MSPR maiores que o angico e a bracatinga em doses altas de cobre.

O comprimento da raiz principal foi reduzido com as doses testadas nas três espécies estudadas (Figura 1E). Resultados semelhantes foram encontrados por Soares et al. (2000) em que o aumento das concentrações de cobre na solução nutritiva reduziram o comprimento radicular de mudas de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla*. Desse modo, a presença de cobre no solo causou efeito negativo no CRP das espécies nativas estudadas.

A área superficial específica das raízes do angico e da bracatinga foram reduzidas até as dose de 355 e 408 mg kg⁻¹ de cobre, respectivamente, enquanto que a grápia manifestou aumento na área superficial até 145 mg kg⁻¹ de cobre (Figura 1F). Resultados semelhantes ao da grápia foram obtidos por Silva et al. (2011), em que doses de cobre de até 128 mg kg⁻¹ de solo estimularam a área superficial específica de mudas de timbaúva. O fato das mudas de grápia manifestarem estímulo para a área superficial nas menores doses de cobre pode ser atribuído ao excesso de cobre na rizosfera, ocasionado redução no crescimento longitudinal das raízes e formação de raízes secundárias (TAIZ e ZEIGER, 2006).

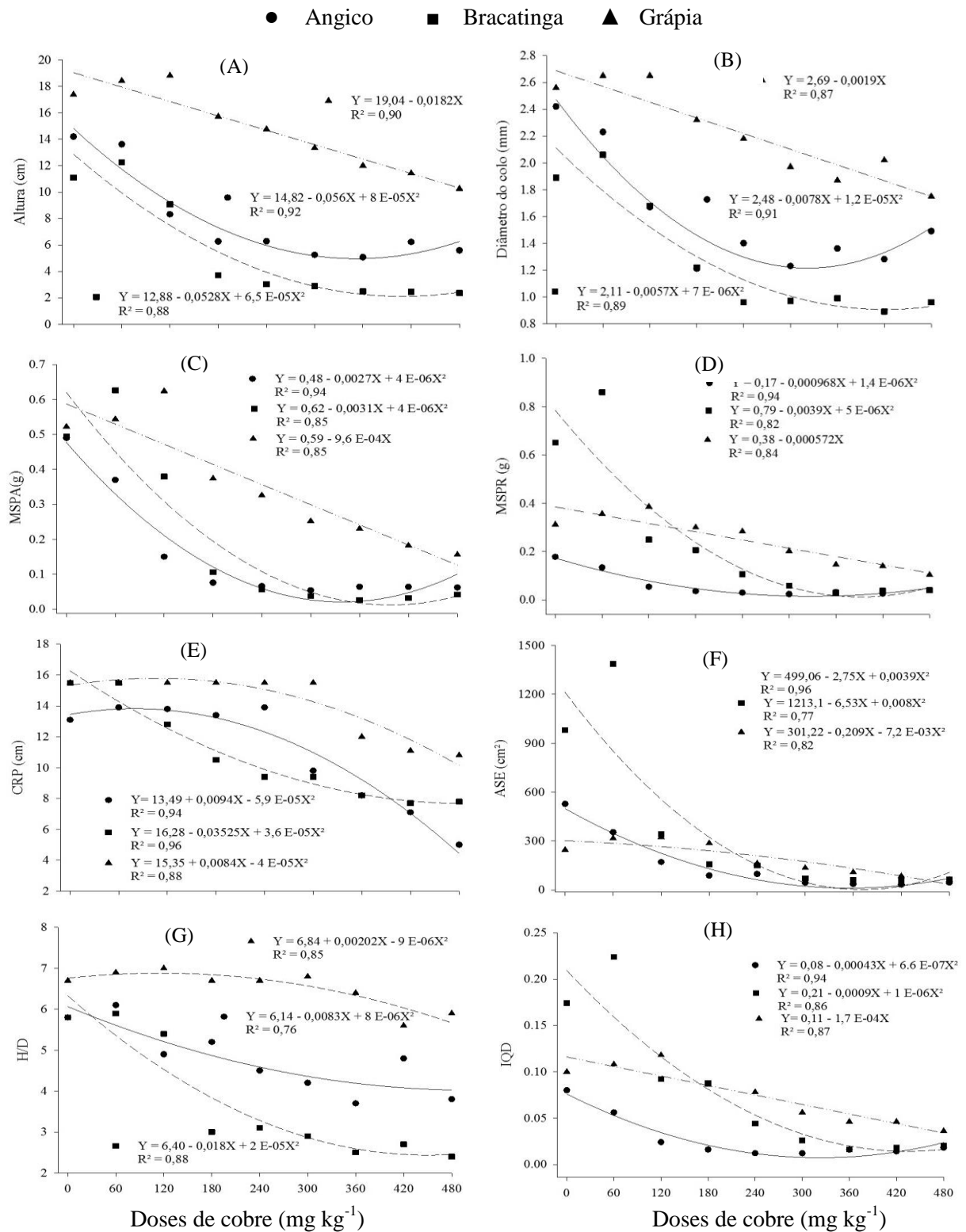


Figura 1 - Equações de regressão da altura (A), diâmetro do colo (B), massa seca da parte aérea – MSPA (C), massa seca parte radicular – MSPR (D), comprimento da raiz principal – CRP (E), área superficial específica – ASE (F), relação altura/diâmetro - H/D (G) e índice de qualidade de Dickson – IQD (H) das mudas de angico, bracatinga e grápia com as doses de cobre aplicadas no solo.

As mudas de grápia obtiveram incremento na relação H/D na dose 112,3 mg kg⁻¹, enquanto que para a bracatinga, essa relação é reduzida até 440,5 mg kg⁻¹ e o angico até 516 mg kg⁻¹ (Figura 1G). Resultados semelhantes também foram observados por Silva et al. (2012) em que mudas de dedaleiro apresentaram redução na relação H/D quando submetidas a doses de cobre no solo. Diante disso, as doses de cobre causaram maior redução na relação H/D nas mudas de angico e bracatinga do que nas mudas de grápia.

O índice de qualidade de Dickson (IQD) foi reduzido com as doses de cobre e apenas as mudas de bracatinga produzidas nas menores doses apresentaram índice superior a 0,2 (Figura 1H). Esse índice é um indicador de qualidade de mudas para o transplante, sendo que o valor mínimo preconizado por Dickson et al. (1960), Cruz et al. (2004) e Melo et al. (2008) é de 0,2. De acordo com Dechen e Nachtigall (2006) o cobre participa do metabolismo do nitrogênio, no entanto, quando em excesso pode causar distúrbio no metabolismo vegetal. Dessa forma, observa-se efeito negativo, mesmo em doses baixas de cobre no IQD das mudas de angico e grápia.

A análise multivariada dos dados indicou que as aplicações de cobre no solo causaram efeito tanto negativo como positivo nas mudas das espécies florestais nativas (Figura 2). No angico e na bracatinga as doses acima de 120 mg kg⁻¹ reduziram a altura das mudas, massa seca das raízes, diâmetro do colo, área superficial específica das raízes, comprimento da raiz principal, relação H/D e IQD (Figuras 2A e 2B). Nas mudas de grápia as doses acima de 240 mg kg⁻¹ influenciaram negativamente a altura das mudas, diâmetro de colo, massa seca da parte aérea e radicular, área superficial específica e IQD (Figura 2C).

O efeito positivo das doses de cobre foi observado com aplicação de 60 mg kg⁻¹, onde proporcionou aumento da altura, massa seca da parte aérea e das raízes, superficial específica e IQD das mudas de bracatinga (Figura 2B). Esses resultados indicam que pequenas doses de cobre adicionadas ao solo, por ser um micronutriente essencial ao desenvolvimento de plantas, repercutem positivamente no crescimento e na qualidade das mudas, mas depende da espécie vegetal. Em doses elevadas no solo reduzem o crescimento e interferem negativamente sobre a qualidade, independente da espécie de vegetal.

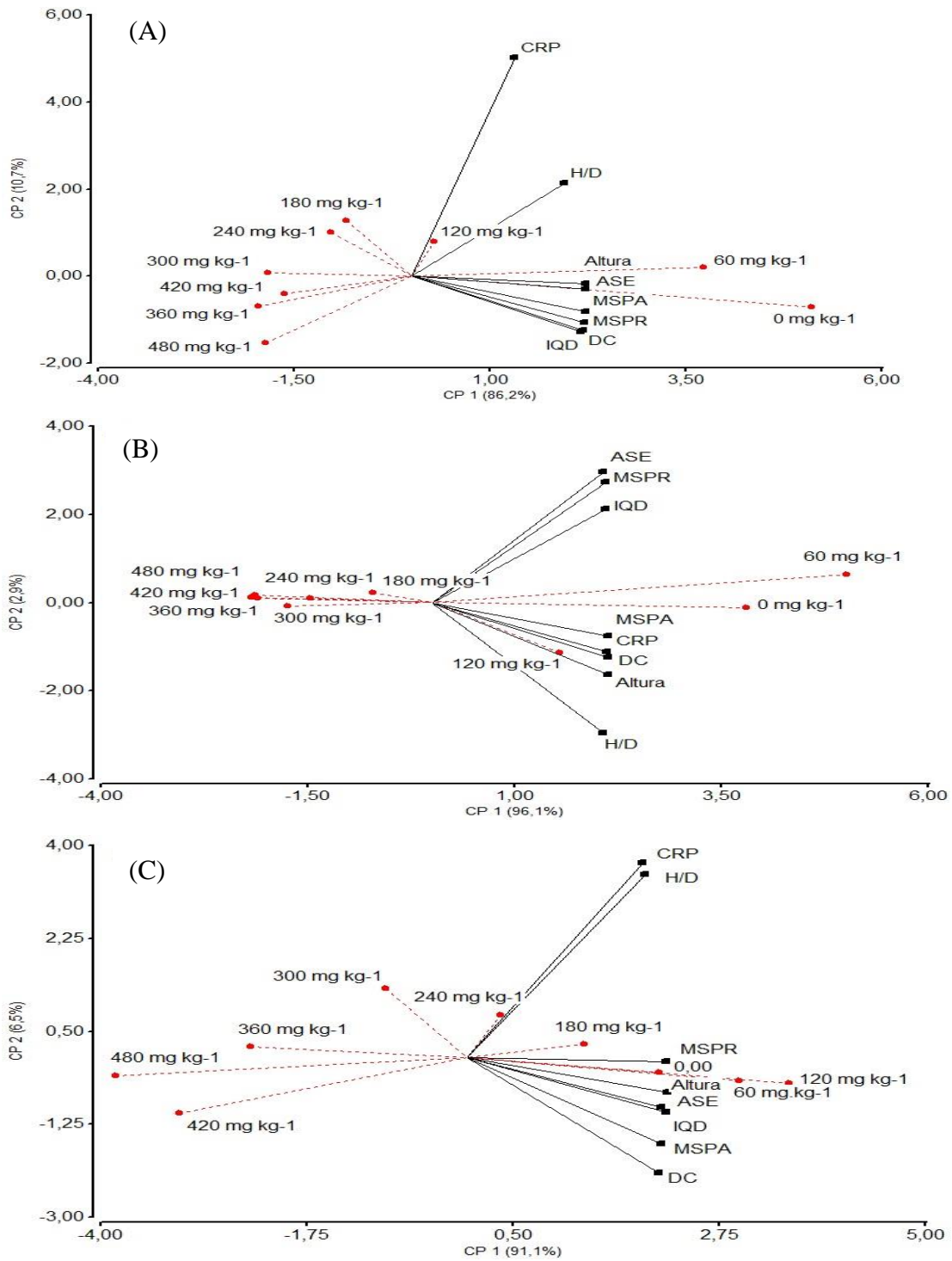


Figura 2 - Análise multivariada da altura, diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca parte radicular (MSPR), comprimento da raiz principal (CRP), área superficial específica (ASE), relação altura/diâmetro (H/D) e índice de qualidade de Dickson (IQD) das mudas de angico (A), bracatinga (B) e grápia (C) com aplicação de doses de cobre no solo. Frederico Wesphalen, RS, 2013.

O coeficiente de impacto no teor relativo de cobre (CITR) foi de 3,69 para a grápia, 2,32 para a bracatinga e 22,5 para o angico (Tabela 3). De acordo com Marques et al. (2000) esse coeficiente indica a capacidade das espécies em limitar a translocação dos elementos da raiz para a parte aérea e, quando o CTIR é maior que valores de uma unidade, indica maior teor proporcional de cobre nas raízes, do que na parte aérea. Resultados semelhantes também foram encontrados por Silva et al. (2011) em que o angico apresentou alta capacidade em acumular cobre no sistema radicular, reduzindo a translocação de cobre para a parte aérea das plantas. Desse modo, o angico possui maior capacidade em limitar a translocação do cobre para a parte aérea, seguida da bracatinga e grápia.

Tabela 2 - Relação entre o teor de cobre da raiz e da parte aérea na dose zero (R/PA_0) e na dose máxima de cobre (R/PA_{120}) e o coeficiente de impacto no teor relativo de cobre (CITR) das mudas de angico, bracatinga e grápia.

Espécies	(R/PA_0)	(R/PA_{120})	CITR ¹
Angico	0,34	7,65	22,5
Bracatinga	2,20	5,12	2,32
Grápia	2,68	9,89	3,69

¹ CITR = $(R/PA_{120})/(R/PA_0)$.

A bracatinga e a grápia apresentaram menor valor para o CTIR em relação ao angico, indicando que essas espécies possuem translocação maior de cobre para a parte aérea em relação ao angico (Tabela 3). A tolerância a toxidez ao cobre tem sido proposta na literatura e incluem mecanismos como a atividade de enzimas na desintoxicação de radicais livres, quelatização do cobre por compostos orgânicos e/ou compartimentalização no vacúolo (QIAN et al., 2005; ZANQUETA et al., 2011). Desse modo, os resultados desse trabalho indicam a possibilidade da bracatinga e a grápia possuírem mecanismos de tolerância ao cobre, permitindo maior crescimento que o angico em solo contaminado.

3.6 Conclusões

Aplicações de doses crescentes de cobre no solo afetam com menor intensidade o crescimento e a qualidade das mudas de grápia em relação ao angico e a bracatinga.

As mudas de bracatinga possuem qualidade de mudas superior ao angico e grápia em solo com pequenas doses de cobre.

As mudas de angico possibilitam maior acúmulo de cobre no sistema radicular em relação à parte aérea do que a bracatinga e a grápia.

3.7 Referências bibliográficas

ANTONIOLLI, Z. I. et al. Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo, na associação micorrízica e no cultivo de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, *Pinus elliottii* Engelm e *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Ciência Florestal**, v. 20, p. 419-428, 2010.

BRUNNER, I. et al. Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 559-568, 2008.

CAIRES, S. M. et al. Desenvolvimento de mudas de cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. **Revista Árvore**, v. 35, p.1181-1188, 2011.

CARNEIRO J. G. A.; BARROSO D. G.; SOARES, L. M. S. Crescimento de mudas em raiz nua de *Pinus taeda*, L. sob cinco espaçamentos no viveiro e seu desempenho no campo. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, p. 305-310, 2007.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451p.

CARPANEZZI, A. et al. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth)**, Curitiba, 1988, 70p.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA – CNPF, 1994, 640p.

CHAIGNON, V.; HINSINGER, P. A. Biotest for evaluating for bioavailability to plants in a contaminated soil. **Journal of environment quality**, v. 32, p. 834 -833, 2003.

CRUZ, C. A. F. Efeito de diferentes níveis de saturação por bases no desenvolvimento e qualidade de mudas de ipê-roxo (*Tebebuia impetiginosa* (Mart.) Standley). **Scientia Forestalis**, v.2, p.100-107, 2004.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R.; Micronutrientes. In: Fernandes, M. S. (ed.) **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 328-352, 2006.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F.; Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960.

EMBRAPA Software - **Análise Fibras e Raízes 2**. Manual. I. Silva, Daniel José da Cunha Bueno. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010. 29p.

EMBRAPA **Manual de análise químicas de solos, plantas e fertilizantes**, Editor Fábio Cesar Da Silva, 2º ed., 2009. 627p.

EMBRAPA Centro nacional de pesquisa de Solos (Rio de Janeiro) **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2º ed, 2006. 306p.

FERRAZ, A. V.; ENGEL, V. L. Efeito do tamanho de tubetes na qualidade de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L. VAR. *stilbocarpa* (HAYNE) LEE ET LANG.), ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (MART. EX DC.) SANDL.) e guarucaia (*Parapiptadenia rigida* (BENTH.) BRENNAN). **Revista Árvore**, v.35, n.3, p.413-423, 2011

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FONSECA, É. P. et al. Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume, produzidas sob diferentes períodos de sombreamento. **Revista Árvore**, v. 26, p. 515-523, 2002.

GIOVANNINI, E. Toxidez por cobre em vinhedos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 3, n. 2, p. 115-117, 1997.

GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e Fertilização Florestal**, Piracicaba – SP, IPEF, 2005. 427 p.

GUO, X. Y.; et al. Toxicity and accumulation of copper and nickel in maize plants cropped on calcareous and acidic field soils. **Plant Soil**, v. 333, p. 365–373, 2010.

DI RIENZO, J. A.; et al. **InfoStat**. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3.ed. Boca Raton, CRC Press, 2001, 315p.

KAHLE, H. Response of roots of trees to heavy metals. **Environmental and Experimental Botany**, v. 33: p. 99–119, 1993.

LEQUEUX, H. et al. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 673-682, 2010.

MARSCHNER, P. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier/Academic Press, 2011. 684p.

MARQUES T. C. L. L.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teores de metais em mudas de espécies arbóreas tropicais em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 121-132, 2000.

MATTOS, R. B. **Características qualitativas e possibilidade de ganho de fuste em espécies euxilóforas nativas da região central do Rio Grande do Sul**. 2002, 91p. (Dissertação Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2002.

MELO, R. R. et al. Crescimento inicial de mudas de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. sob diferentes níveis de Luminosidade. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, p.138-144, 2008.

NACHTIGALL, G. R. et al. Copper concentration of vineyard soils as a function of pH variation and addition of poultry litter. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 941-948, 2007.

PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effects of copper oxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Annals of Botany**, v. 88, p. 207-214, 2001.

PEREIRA, A. C. C. et al Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 641-647, 2012.

QIAN, M.; LI, X.; e SHEN, Z. Adaptative copper tolerance in *Elsholtzia haichowensis* involves the production of Cu-induced thiol peptides. **Plant Growth Regulation**, v. 47 p. 65-73, 2005.

SILVA, M. L. S.; VITTI, Z. C.; TREVISAM, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, p. 527-535, 2007.

SILVA, R. F. et al. Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, v. 21, p. 103-110, 2011.

SILVA, R. F. et al. Influência da contaminação do solo por cobre no crescimento e qualidade de mudas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. e Zucc.) e aroeira-vermelha (*Schinus therebinthifolius* Raddi). **Ciência Florestal**, v. 21, p. 111-118, 2011.

Silva, R. F et al. Crescimento e qualidade de mudas de Timbó e Dedaleiro cultivadas em solo contaminado por cobre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, p. 881-886, 2012.

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**, v. 12, p. 213-225, 2000.

SOUZA C. A. M. et al. Crescimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubação. **Ciência Florestal**, v.16, p.243-249, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. São Paulo: Makron Books, 2006, 705 p.

TENNANT, D. A test of a modified liwe intersect method of estimating root length. **Journal Ecology**, v.63, p.995-1001, 1975.

ZANCHETA, A. C. F. et al. Fitoextração de cobre por espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva. **Bragantia**, v.70, p.737-744, 2011.

4 CAPITULO 2

Associação ectomicorrízica em *Mimosa scabrella* e *Apuleia leiocarpa* com o uso de óleo essencial de *Eucalyptus grandis*

4.1 Resumo

O desenvolvimento lento de essências florestais nativas pode estar relacionado à dificuldade do estabelecimento de associação com fungos ectomicorrízicos em condições naturais. O objetivo do trabalho foi avaliar a associação ectomicorrízica em plântulas de bracatinga e grápia com o uso de óleo essencial de eucalipto. O isolado ectomicorrízico utilizado foi o UFSC–Pt116 (*Pisolithus microcarpus*). Em condições de laboratório, as plântulas foram submetidas a um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (somente planta (controle), planta + óleo essencial, planta + inoculo e planta + inoculo + óleo essencial). Avaliou-se a altura de planta, massa fresca da parte aérea e do sistema radicular, número de folhas, massa seca da parte aérea, comprimento radicular, presença/ausência e o percentual de colonização ectomicorrízica e a contribuição efetiva dos tratamentos. O uso de óleo essencial de eucalipto promoveu o estabelecimento de ectomicorriza nas plântulas de grápia, onde foi possível visualizar as estruturas manto fúngico e rede de Harting. As plântulas de bracatinga não necessitam de óleo essencial de eucalipto para formar ectomicorriza com o isolado UFSC-Pt116. A inoculação “*IN VITRO*” de *Pisolithus microcarpus* aumenta altura das plântulas de bracatinga e grápia e a massa seca da parte aérea da bracatinga.

Palavras chaves: Fungo ectomicorrízico, espécies nativas, bracatinga, grápia

4.2 Abstract

The slow development of native forest species may be related to the difficulty of establishing association with ectomycorrhizal fungi in natural conditions. This study aimed to evaluate the association in ectomycorrhizal bracatinga and grápia using eucalyptus essential oil. The isolated ectomycorrhizal was used UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*). Under laboratory conditions, the plants were subjected to a completely randomized design with four treatments (plant only (control), plant + essential oil, plant + inoculo and plant + inoculo + essential

oil). We evaluated the plant height, fresh weight of shoot and root, number of leaves, shoot dry weight, root length, presence and percentage of ectomycorrhizal colonization and the effective contribution of treatments. The use of eucalyptus essential oil promoted the establishment of ectomycorrhiza on seedlings grápia, where it was possible to visualize the structures as fungal mantle and network Harting. Seedlings of bracatinga not require eucalyptus essential oil to form ectomycorrhiza with isolated UFSC-Pt116. Inoculation "in vitro" *Pisolithus microcarpus* increases seedling height of bracatinga and grápia and shoot dry mass of bracatinga.

Keywords: Ectomycorrhizal fungi, native species, bracatinga, grápia

4.3 Introdução

As essências florestais nativas apresentam crescimento lento quando comparadas às espécies exóticas como o eucalipto, necessitando de intervenções para acelerar o seu desenvolvimento. Desse modo, novas estratégias devem ser estudadas para que essas espécies alcancem níveis satisfatórios de crescimento e produtividade. Diante disso, as ectomicorrizas representam uma alternativa para o estabelecimento de mudas e estabilidade das florestas plantadas (OLIVEIRA et al., 2008), podendo auxiliar no desenvolvimento de arbóreas nativas em diferentes condições de solo e ambiente.

As ectomicorrizas são fungos de solo que formam simbiose mutualística com certas plantas vasculares. Nessa associação, as mesmas desenvolvem estruturas próprias no sistema radicular do hospedeiro, como manto fúngico e rede de Hartig, responsáveis pelas trocas de nutrientes entre o fungo e planta (BRUNDRETT et al., 1996; GROSS et al., 2004; SMITH e READ, 2008). Essa associação resulta em aumento no crescimento de plantas e maior tolerância a fatores ambientais, isso indica que o estabelecimento de simbiose micorrízica pode ser uma estratégia para as plantas superarem estresses bióticos e abióticos que ocorrem no solo (CAMPOS et al., 2011), bem como na proteção das raízes à poluentes e metais pesados (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Dessa maneira, a associação com fungos ectomicorrizicos pode contribuir para aumentar o desenvolvimento de espécies florestais nativas, mesmo em ambientes desfavoráveis.

Entretanto, devido a dificuldades no estabelecimento de ectomicorrizas nas arbóreas nativas do Brasil, tem sido proposto o uso de óleo essencial como um bioestimulador da associação fungo - planta. Esses óleos são formados por uma complexa mistura de

componentes, envolvendo até 100 compostos orgânicos (DORAN, 1991), que podem ter similaridade com os exsudatos liberados pelas plantas para que ocorra a associação com os fungos. Pois, sabe-se que a associação se inicia através de sinais bioquímicos emitidos pelas plantas no sistema radicular, que estimulam a fase pré-simbiótica, desencadeando mudanças fisiológicas e morfológicas tanto no fungo quanto na planta (BÉCARD et al., 2004; AKIYAMA et al., 2005; ZHI-LIN et al., 2007). Assim, o uso de óleo essencial se torna uma opção para estimular a associação micorrízica em essências florestais nativas.

Na intenção de gerar informações sobre a micorrização em espécies arbóreas nativas do Brasil, este trabalho objetivou avaliar a associação ectomicorrízica em bracatinga e grápia com o uso de óleo essencial de eucalipto.

4.4 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* de Frederico Westphalen – RS, com as espécies florestais de bracatinga e a grápia.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições. Os tratamentos foram: T1: sem inoculação e sem aplicação de óleo essencial (testemunha); T2: sem inoculação e com aplicação de óleo essencial; T3: com inoculação e sem aplicação de óleo essencial e T4: com inoculação e com aplicação do óleo essencial. As unidades experimentais (UE) foram erlenmeyers de 250 mL contendo 60 mL de meio MNM sólido (Melin-Norkrans Modificado) (MARX, 1969). Durante o período do experimento as UE foram sorteados aleatoriamente em intervalos de dois dias para atender as exigências do delineamento experimental.

O fungo ectomicorrízico utilizado para inoculação foi o isolado *Pisolithus microcarpus* obtido na Universidade Federal de Santa Catarina. O fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio MNM sólido (Melin-Norkrans Modificado) (MARX, 1969) em BOD com temperatura de 25°C. Após a multiplicação foram colocados três discos de micélio fúngico com 10 mm de diâmetro em cada UE dos tratamentos com inoculação, permanecendo durante 28 dias em BOD a uma temperatura de 25 ± 1°C para se multiplicar.

O óleo essencial foi obtido através da técnica de hidrodestilação de folhas frescas de eucalipto seguindo a metodologia descrita por (VITTI e BRITO, 2003), em seguida foi solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia de Fabrowski et al. (2003) e mantido sob refrigeração a 4°C até o momento do uso. A concentração do óleo

essencial utilizado no experimento seguiram as indicadas por Steffen et al. (2011; 2012), que avaliaram doses de óleo essencial de eucalipto para estimular a micorrização mudas de *Eucalyptus grandis* e a dosagem de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ de água esterilizada em mudas de sibipiruna, sendo utilizado nesse experimento a concentração de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$. Foram aplicados 2 ml da solução de óleo essencial diluída em água nas UE no momento em que as plântulas foram transferidas.

As sementes de grápia e bracatinga, fornecidas pela Estação de Pesquisas Florestais da FEPAGRO, unidade de Santa Maria – RS, tiveram sua superfície desinfetada com hipoclorito de sódio a 2 % durante 10 min e álcool a 70% por mais 12 min. Após foram lavadas três vezes consecutivas com água esterilizada. As sementes foram germinadas em meio de germinação ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (500 μM), H_3BO_3 (3 μM), 7,5g/L de Ágar, 2g L^{-1} de glicose, pH 5,7), esterilizado em autoclave, permanecendo sete dias no escuro em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período as plântulas foram transferidas para as UE, permanecendo incubadas durante 42 dias em câmara com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

As variáveis analisadas foram altura de planta (AP), massa fresca da parte aérea (MFPA) e do sistema radicular (MFR), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento radicular (CR), presença de associação ectomicorrízica, percentual de pêlos radiculares colonizados (%PRC) e contribuição efetiva dos tratamentos (CET).

Para a avaliação da AP utilizou-se régua graduada de 30 cm de comprimento. Para a estimar a MFPA E MFR realizou-se uma secção transversal no colo da planta separando a parte aérea da radicular em seguida foram pesadas em balança analítica. A determinação da MSPA foi obtida após secagem em estufa a 65°C , até peso constante e pesadas em balança analítica.

A avaliação da colonização ectomicorrízica foi realizada por meio da observação visual da morfologia radicular externa das raízes em microscópio estereoscópico binocular com aumento de 60 vezes, visando detectar a presença ou ausência de alterações morfológicas, que possivelmente seriam resultado da colonização por fungos ectomicorrízicos (BRUNDRETT et al., 1996). Na sequência foram realizados cortes histológicos transversais nas raízes a mão livre com auxílio de lâmina de bisturi e posterior confecção de lâminas para observação em microscópio óptico. A avaliação da morfologia interna foi realizada através da análise de fotografias obtidas com máquina fotográfica digital marca Sony, acoplada ao microscópio óptico marca Olympus® modelo CX40 com aumento de 200x, detectando-se a presença de manto fúngico e rede de Hartig (BRUNDRETT et al., 1996).

O percentual de pelos radiculares colonizados foi obtido por meio da quantificação do número de pêlos colonizados e não colonizados, adaptando o método de determinação do percentual de colonização ectomicorrízica descrito por (BRUNDRETT et al., 1996). A contribuição efetiva dos tratamentos (CET) expressa a contribuição percentual dos tratamentos em relação ao tratamento controle, sendo calculada pela fórmula: $CET (\%) = [(PCT - PST) / PST] * 100$, onde P: parâmetro analisado (altura ou massa seca da parte aérea); CT: com tratamento (óleo, fungo ou óleo + fungo) e ST: sem tratamento (controle).

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2006).

4.5 Resultados e Discussão

Na avaliação de presença ou ausência de colonização ectomicorrízica, nota-se que a bracatinga tem capacidade de se associar ao isolado do *Pisolithus microcarpus* com e sem adição de óleo essencial de eucalipto (Tabela 1). A grápia não estabeleceu ectomicorriza utilizando somente o isolado *Pisolithus microcarpus*, sendo necessário o estímulo por meio do uso de óleo essencial (Tabela 1). Silva (2007) estudando a ocorrência de fungos ectomicorrizicos em treze espécies nativas na região central do Rio Grande do Sul não encontrou formação de ectomicorriza em condições naturais em árvores de grápia, atribuindo que a associação não depende somente da planta, mas também do ambiente e disponibilidade e inóculo. Portanto, os resultados do presente trabalho fornecem uma indicação da possibilidade da formação de ectomicorrizas em grápia e bracatinga *IN VITRO*.

Tabela 1 – Presença ou ausência de associação ectomicorrízica e percentual de pelos radiculares colonizados (%PRC) em bracatinga e grápia inoculadas com o isolado *Pisolithus microcarpus*, *IN VITRO*. UFSM, campus de Frederico Westphalen, RS, 2012.

Tratamentos	Presença (+) ou ausência (-) ¹		%PRC	
	Bracatinga	Grápia	Bracatinga	Grápia
Controle	-	-	0	0
Óleo	-	-	0	0
Inoculado	+	-	6	0
Inoculado + óleo	+	+	9	2

¹ Manto fúngico, rede de Harting e/ou pelotões de hifas.

As plântulas de bracatinga manifestaram 6% de pelos radiculares colonizados no tratamento inoculado e 9% no inoculado + óleo, enquanto que na de grápia verificou-se apenas 2% de colonização no tratamento inoculado + óleo (Tabela 1). Os percentuais de colonização obtido nesse trabalho são baixos de acordo com a classificação de Zangaro et al. (2003) e Steffen et al. (2012), que encontraram 22% de colonização radicular em mudas de sibipiruna inoculadas com o fungo *Pisolithus microcarpus* mais adição de óleo essencial de eucalipto, produzidas em condições de casa de vegetação e em turfa. Entretanto, por causa da pouca disponibilidade de raízes, o teste de colonização foi realizado em pelos radiculares e não em segmentos de 1 cm, evitando superestimar os resultados desse trabalho, que resultaria em 100% de colonização radicular. Desse modo, há indícios que a adição de óleo essencial de eucalipto pode contribuir para aumentar o percentual de pelos radiculares colonizados das plântulas de bracatinga e possibilitar a formação de ectomicorriza em grápia.

Nas plântulas de bracatinga foi possível observar a ocorrência de manto fúngico, onde as raízes apresentaram espessamento dos pelos radiculares no tratamento com inoculação de fungos ectomicorrizicos, porém, sem a confirmação da formação de rede de Hartig (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D), conforme Brundrett et al. (1996) e Costa (2002) essas alterações na morfologia das raízes podem indicar a ocorrência de colonização radicular. Pesquisas têm indicado efeitos benéficos das micorrizas arbusculares no crescimento de plantas de *Tabebuia roseo-alba* e *Tocoyena selloana* em casa de vegetação, e melhor desenvolvimento de plantas de milho em condições sob condições de estresse hídrico (OLIVEIRA et al., 2009; ZHU et al., 2012). Assim, a simbiose micorrízica aumenta a absorção de nutrientes do solo contribuindo para o desenvolvimento vegetal (SMITH e READ, 2008).

As plântulas de grápia apresentaram alterações na morfologia externa e interna do sistema radicular com a inoculação do isolado *Pisolithus microcarpus* e com a adição do óleo essencial, indicando formação de ectomicorriza (Figura 1). De acordo com Harborne (1991) os óleos essenciais possuem diversos constituintes que atuam no metabolismo vegetal, estando envolvidos nas interações entre plantas e microrganismos (SIMIONATO, 2004). Andrezza et al. (2011) trabalhando com ectomicorrização *IN VITRO* com vários isolados, evidenciaram que o fungo *Suillus sp* favoreceu o desenvolvimento de plântulas de grápia, porém, não detectou a formação de ectomicorriza pelo isolado *Pisolithus microcarpus*. Silva (2007) também verificou que as raízes de grápia tinham afinidade com o isolado *Pisolithus microcarpus*, contudo não foi possível afirmar que as modificações no sistema radicular foram decorrentes da colonização micorrízica. Os resultados encontrados nesse trabalho

indicam que o óleo essencial de eucalipto pode ser uma estratégia para o estabelecimento de ectomicorriza em plantas que tenham dificuldades em estabelecer essa associação.

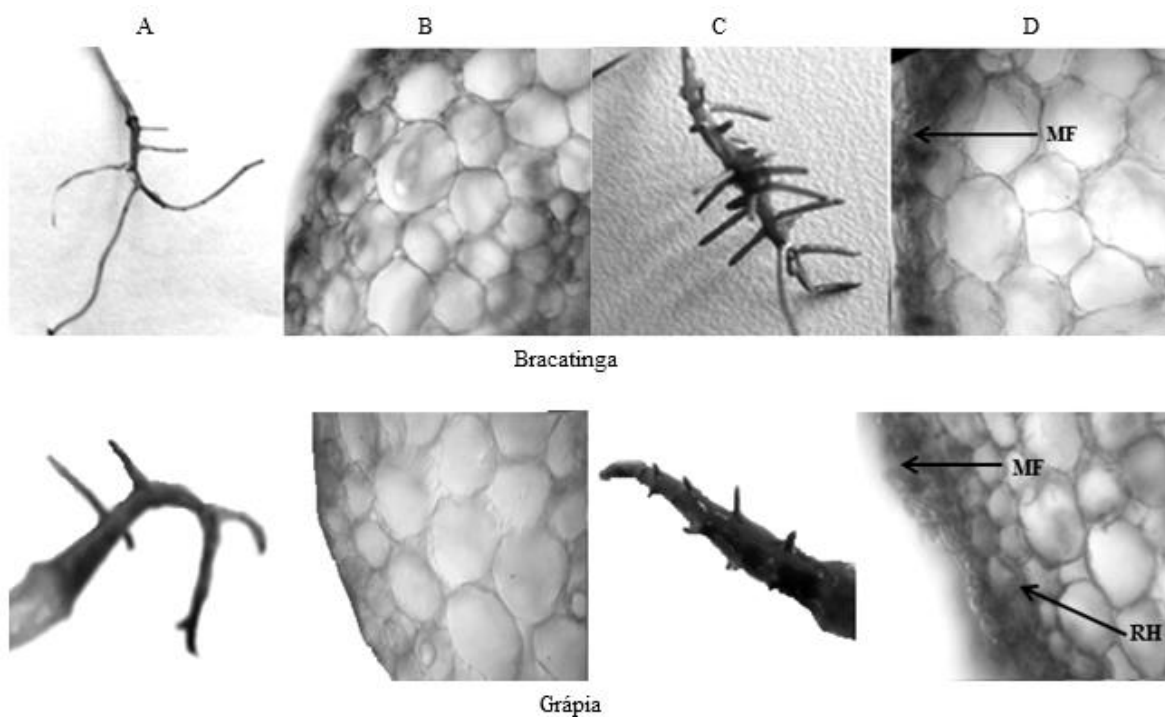


Figura 1 - Morfologia externa (A) e interna (B) de raízes não micorrizadas (controle), morfologia externa (C) e interna (D) de raízes micorrizadas com o inóculo *Pisolithus microcarpus* (tratamento inoculado + óleo) de plântulas de bracatinga e grápia. MF: manto fúngico, RH: rede de Hartig. UFSM, campus de Frederico Westphalen, 2012.

Observa-se que a inoculação com o isolado UFSC-Pt116 proporcionou os maiores valores para a altura, comprimento radicular, número de folhas, massa fresca radicular e massa seca aérea das plântulas de bracatinga quando comparados aos tratamentos sem inoculação (Tabela 2). Smith e Read (2008) relatam que a associação com fungos resulta em um aumento de absorção de água e nutrientes. Desse modo, a inoculação com fungo ectomicorrízico propiciou benefícios às plântulas de bracatinga. Resultados semelhantes também foram obtidos por Steffen (2012) o qual observou que o uso de óleo essencial e inoculação de *Pisolithus microcarpus* favoreceu o seu desenvolvimento de mudas de sibipiruna. O tratamento inoculado + óleo apresentou uma redução na MFR, não diferindo do

tratamento testemunha, essa redução em sua massa devido a associação com o fungo resulta em um aumento da área de absorção pela planta proporcionada pelas hifas do fungo (SMITH e READ, 2008). O número de folhas foi superior nos tratamentos com o isolado *Pisolithus microcarpus*, esse resultado indica que as plântulas inoculadas podem ter um aumento no desenvolvimento a campo por apresentarem maior área fotossintética.

Tabela 2 - Altura, comprimento radicular (CR), massa fresca da parte aérea (MFA), número de folhas (NF), massa fresca radicular (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) de plântulas de bracatinga e grápia. UFSM, campus de Frederico Westphalen, RS, 2012.

Tratamento	Altura	CR	NF	MFPA	MFR	MSPA
	----- cm-----	-----		----- mg planta ⁻¹ -----	-----	-----
----- Bracatinga -----						
Controle	5,25 b*	2,75 b	2,5 b	35 ^{ns}	18 b	4,00 b
Óleo	5,00 b	2,25 b	2,0 b	52	16 b	6,25 b
Inoculado	8,82 a	4,95 a	4,0 a	54	39 a	12,75 a
Inoculado + Óleo	9,22 a	3,42 ab	3,0 ab	40	20 b	9,75 a
CV %	11,17	21,01	17,39	42,18	28,99	19,34
----- Grápia -----						
Controle	8,5 b	1,25 ^{ns}	2,0 ^{ns}	214 ^{ns}	25 c	39,75 ^{ns}
Óleo	9,5 ab	1,66	2,0	269	32 bc	48,75
Inoculado	10,92 a	1,43	2,75	268	46 a	54,25
Inoculado + Óleo	10,72 a	1,30	2,5	210	38 ab	49,50
CV %	7,58	28,68	18,02	20,65	13,49	24,08

* Médias seguidas de mesma letra na coluna, dentro de cada planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os valores observados para a MFPA das plântulas de bracatinga não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, isso pode ser atribuído ao curto espaço de tempo da condução do experimento, não tendo tempo hábil para a bracatinga manifestar os benefícios da associação com o fungo ectomicorrízico.

Os tratamentos inoculado e inoculado + óleo aumentaram significativamente a MFR e altura das plântulas de grápia (Tabela 2). Smith e Read (2008) relataram redução na massa fresca radicular das plantas ao estabelecerem a micorriza. Diante disso, supõe-se que a causa para esse resultado possa ter sido o baixo percentual de pelos radiculares colonizados pelo fungo, ou efeito indireto da presença do fungo ectomicorrízico estimulando o crescimento da

planta, por meio da disponibilização de fitormônios (SMITH e READ, 2008). Contudo, resultados semelhantes foram obtidos por Andreazza et al. (2011), que encontraram aumento na altura das plântulas de grábia quando inoculadas com fungos ectomicorrízicos das espécies *Suillus sp*, *Pisolithus microcarpus* e *Scleroderma citrinum*.

Não foi observada diferença significativa no comprimento radicular, número de folhas, massa fresca aérea das plântulas de grábia (Tabela 2). A grábia é considerada uma espécie medianamente exigente em potássio e nitrogênio na fase inicial de crescimento, quando cultivada em Argissolo Vermelho Distrófico Arênico (NICOSOLO, 2001). Desse modo, o meio de cultura no qual o experimento foi conduzido, embora adequado ao desenvolvimento do fungo ectomicorrízico, pode ter suprido a necessidade de nutrientes para o desenvolvimento inicial dessa planta, não sendo possível detectar diferença nesses parâmetros. Assim, os resultados obtidos indicam que o óleo essencial de eucalipto, não causou efeito negativo nas plântulas de grábia e ainda contribui para que estas se associem ao fungo ectomicorrízico.

A contribuição efetiva dos tratamentos óleo, inoculado e inoculado + óleo foram de 56, 219 e 144 %, respectivamente para a massa seca da parte aérea das plântulas de bracatinga. Nas plântulas de grábia os tratamentos óleo, inoculado e inoculado + óleo foram 22, 37 e 25% superiores a testemunha, respectivamente (Figura 2). A contribuição desses tratamentos para as plântulas de grábia pode estar relacionada à presença de terpenos e compostos fenólicos nos óleos essenciais que estimulam o crescimento das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2006), bem como, a produção pelos fungos ectomicorrízicos, de fitormônios biodisponíveis como ácido indol acético e auxinas, responsáveis pelo crescimento da planta (SMITH e READ, 2008). Nesse caso, é possível que esses fitormônios fiquem disponíveis no meio de cultura e sejam absorvidos pelas plântulas, no entanto, essa hipótese poderá ser esclarecida em outros trabalhos.

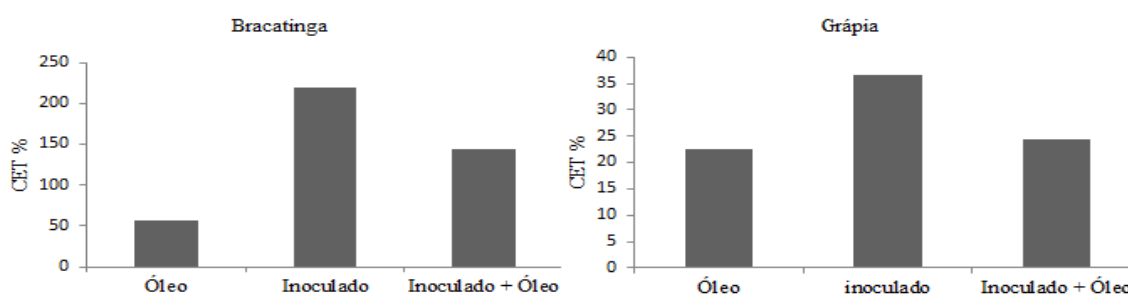


Figura 2 - Contribuição efetiva dos tratamentos (CET %) com óleo, inoculado e inoculado + óleo na massa seca da parte aérea das plântulas de bracatinga e grábia.

Esses resultados são importantes para o setor florestal, podendo contribuir para melhorias no desenvolvimento de arbóreas e programas de reflorestamento e revegetação de áreas degradadas. No entanto, novos estudos devem ser realizados com uso de óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização na produção de mudas de espécies nativas e seus efeitos para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas em condições de campo.

4.6 Conclusão

O uso de óleo essencial de eucalipto pode contribuir para o estabelecimento de associação de *Pisolithus microcarpus* nas raízes das plântulas de grápia.

A inoculação “IN VITRO” de *Pisolithus microcarpus* aumenta altura das plântulas de bracatinga e grápia e a massa seca da parte aérea da bracatinga.

3.7 Referências Bibliográficas

ANDREAZZA, R. et al. Ectomicorrizas em grápia [*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride] e canafístula [*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert] *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 21, p.727-734, 2011.

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

BRUNDRETT, M. et al **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996, 400 p.

BÉCARD, G. et al. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 1186-1197, 2004.

CAMPOS et al. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 35, p. 965-974, 2011.

CARPANEZZI, A. et al. **Manual técnico da bracatinga (Mimosa scabrella Benth)**, Curitiba, 1988,70p.

COSTA, M. D. et al. Physiology and genetics of ectomycorrhiza formation in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. In: ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (eds) **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2, 2002.143-193p.

DORAN, J. C. Commercial sources, uses, formation, and biology. In: BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. **Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: Inkata, p.11-28, 1991.

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**, v. 13, p. 95-106, 2003.

FERREIRA, D.F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. UFLA - SISVAR, Lavras, 2006, 145p.

GROSS, E.; CASAGRANDE, L. I. T.; CAETANO, F. H. Ultrastructural study of ectomycorrhizas on *Pinus caribaea* Morelet. var. hondurensis Barr. & Golf. seedlings. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 1-7, 2004.

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.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, v. 2, São Paulo, 2002. 368p.

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

MATTOS, R. B. **Características qualitativas e possibilidade de ganho de fuste em espécies euxilóforas nativas da região central do Rio Grande do Sul**. 91p, 2002. 91 f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria– Santa Maria - RS, 2002.

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

NICOLOSO, F. T. et al. Nutrição mineral de mudas de grápia em argissolo vermelho distrófico arênico: Efeito da adubação NPK no crescimento. **Ciência Rural**, v.31, p.991-998, 2001.

OLIVEIRA, V. L et al. 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.

OLIVEIRA, J. R et al. O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Botânica**. V. 32, p. 663-670, 2009.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. e REIS, A. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Sellowia, Itajaí, (28/ 30) p. 1-320, 1978.

SILVA, R. F. S. **Tolerância de espécies florestais arbóreas e fungos ectomicorrízicos ao cobre**. 2007. 134p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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. 193p. (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

STEFFEN, B. R. et al. Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização e do estabelecimento de mudas de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, p. 245-255, 2011.

STEFFEN, B. R. Óleo essencial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden no estímulo à micorrização de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, v. 22, p. 69-78, 2012.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4th. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 764p.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo: Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003. 26p.

ZANGARO, W. et al. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, p. 315-324, 2003.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1266-1271, 2007.

ZHU, X. C. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant Soil Environment**, v. 58, p. 186–191, 2012.

5 CAPITULO 3

Óleo essencial de eucalipto e *Pisolithus microcarpus* no crescimento de bracatinga em solo contaminado por cobre

5.1 Resumo

As áreas contaminadas com cobre podem apresentar elevados teores disponíveis desse nutriente no solo afetando o desenvolvimento vegetal. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de eucalipto na associação ectomicorrizica em bracatinga e o seu comportamento em solo contaminado por cobre. A essência florestal utilizada foi a bracatinga. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4 x 6), sendo quatro formas de inoculação (testemunha, óleo, fungo e óleo + fungo) e cinco doses de cobre (nível natural do solo, 60, 120, 180 e 240 mg de Cobre kg⁻¹ de solo), com cinco repetições. Avaliaram-se a altura de plantas, diâmetro do colo, massa seca da parte aérea e radicular, comprimento radicular, área superficial específica, relação altura/diâmetro do colo e índice de qualidade de Dickson. Verificou-se que a utilização de 40 µL L⁻¹ de óleo essencial de eucalipto aumenta a altura das mudas de bracatinga em solo contaminado com adição de 180 mg de Cobre kg⁻¹ de solo. Não há efeito da inoculação de *Pisolithus microcarpus* no crescimento das mudas de bracatinga em solo contaminado com cobre. As doses de cobre reduzem a massa seca da parte aérea e radicular das mudas de bracatinga.

Palavras-chave: ectomicorriza, arbórea nativa, metal pesado.

5.2 Abstract:

The copper mineration areas may have elevated levels of this nutrient available in the soil which may affect plant development. The aim of this study was to evaluate the effect of eucalyptus essential oil in ectomycorrhizal association in bracatinga and their behavior in a soil contaminated by copper. The essence forest used was bracatinga. The experiment was conducted in a completely randomized design in a factorial arrangement (4 x 6), four forms of inoculation (control, oil, yeast and fungi + oil) and five doses of copper (natural soil level , 60, 120, 180 and 240 mg Cu kg⁻¹ soil) with five replications. Evaluations of plant height, stem diameter, dry weight of shoot and root, root length, specific surface area, ratio of height /

diameter ratio and Dickson quality were carried out. It was found that the use of 40 $\mu\text{l L}^{-1}$ eucalyptus essential oil increases the height of the bracatinga seedlings in the dose of 180 mg of copper kg^{-1} in a contaminated soil. There is no effect of inoculation of *Pisolithus microcarpus* in seedling growth of bracatinga in soil contaminated with copper. Doses of copper reduce the dry mass of shoots and roots of seedlings bracatinga.

Key words: ectomycorrhizal, native tree, heavy metal.

5.3 Introdução

O cobre, quando em altas concentrações no solo, pode diminuir a produção de plantas e ainda se acumular na cadeia alimentar (SANTOS et al., 2010). Além disso, pode oferecer riscos de contaminação de águas superficiais e subsuperficiais (NOWACK et al., 2006). No Brasil, áreas contaminadas com cobre têm se tornado comum em vinhedos, decorrentes da aplicação de fungicidas a base de cobre Nachtigall et al. (2007), bem como em áreas de mineração desse elemento (REGENSBURGER et al., 2008). Diante disso, novas alternativas devem ser estudadas para diminuir a contaminação, tornando essas áreas novamente produtivas.

O uso de fungos ectomicorrízicos pode ser uma alternativa para melhorar o desenvolvimento de plantas em áreas contaminadas. Esses fungos formam associações simbióticas com plantas vasculares, aumentando a área explorada pelas raízes por meio de suas hifas no solo (BRUNDRETT et al., 1996; SMITH E READ, 2008). Pesquisas têm indicado o efeito benéfico da associação micorrízica no crescimento vegetal (SILVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011), bem como, demonstrado a eficiência dessa associação na tolerância das plantas a metais pesados (KABATA - PENDIAS, 2010).

De acordo com Smith e Read (2008) os fungos ectomicorrízicos formam simbiose com espécies florestais específicas. Entretanto, metabólitos essenciais extraídos de espécies que formam associação com fungos ectomicorrízicos, podem contribuir para a ocorrência da simbiose, em espécies nas quais, em condições naturais, não se tem detectado a ocorrência dessa associação (STEFFEN et al., 2012). Conforme Wenke et al. (2010) compostos exsudatos pelas raízes das plantas atuam como sinais bioquímicos essenciais. Esses sinais estimulam a fase pré-simbiótica entre as raízes das plantas e os fungos (STEFFEN et al., 2011). Doran (1991) relatou que o óleo extraído de folhas de eucalipto contém uma mistura complexa, envolvendo até 100 compostos orgânicos, que podem ter similaridade com

compostos exsudatos pelas raízes das plantas, atuando como sinal bioquímico para a ocorrência da associação simbiótica. Nesse caso, o óleo essencial de eucalipto poderá ser uma alternativa para estimular a ocorrência de associação ectomicorrízica em espécies nativas que apresentem dificuldade em associar - se com fungos ectomicorrízicos.

As espécies florestais acumulam metais pesados nas raízes e no caule, sendo importantes para recuperar ambientes contaminados por metais (MAGALHÃES et al., 2011). A bracatinga, por exemplo, é uma Fabaceae adequada para a recuperação de áreas degradadas, pois deposita quantidades expressivas de material orgânico rico em nitrogênio no solo (CARPANEZZI et al., 1988). Regensburger et al. (2008) verificaram 92% de índice de sobrevivência da bracatinga em áreas degradadas pela mineração de argila. Entretanto, não se têm evidenciado trabalhos sobre o comportamento de Fabaceas, como a bracatinga, em solo contaminado com cobre. Desse modo, a elaboração de estudos que contemplem o desenvolvimento dessa espécie florestal, em solo contaminado por cobre, poderá contribuir para o conhecimento sobre arbóreas nativas do Brasil em solo contaminado.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de eucalipto na associação ectomicorrízica em bracatinga e o seu comportamento em solo contaminado por cobre.

5.4 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciências Agrônômicas e Ambientais da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* de Frederico Westphalen, RS. A espécie estudada foi a bracatinga, cujas sementes foram fornecidas pela Estação de Pesquisas Florestais da FEPAGRO, unidade de Santa Maria, RS. As sementes tiveram a superfície desinfetada com hipoclorito de sódio 2% durante 10 min e álcool 70% por mais 12 min e lavadas em água esterilizada, em seguida as sementes foram submetidas à quebra de dormência com escarificação mecânica.

O substrato utilizado foi um solo classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, com os seguintes atributos: $\text{pH}_{\text{água}} = 4,9$, $\text{Ca} + \text{mg} = 5,4 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, $\text{Al} = 4,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, $\text{H}+\text{A} = 6,6 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, $\text{P} = 6,6 \text{ mg dm}^{-3}$, $\text{K} = 111,0 \text{ mg dm}^{-3}$, $\text{Zn} = 1,6 \text{ mg dm}^{-3}$, $\text{Cu} = 15,1 \text{ mg dm}^{-3}$, matéria orgânica = 24 g dm^{-3} e argila = 810 g dm^{-3} . O solo foi esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C durante 60 min. As unidades experimentais (UE) foram tubetes com volume de 125 cm^3 , que receberam três sementes e após a emergência das plântulas foi realizado o desbaste deixando apenas uma plântula por UE.

O isolado ectomicorrízico utilizado foi o *Pisolithus microcarpus* pertencente ao banco de fungos da Universidade Federal de Santa Catarina. O fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo 20 mL meio MNM (Melin-Norkrans Modificado) Marx (1969), mantido em BOD a 28 °C com ausência de luz. O conteúdo da placa de Petri (Micélio fúngico e meio MNM) foi fragmentado em liquidificador com 200 mL de água esterilizada durante 10 segundos. Posteriormente, foi aplicado 2 mL dessa suspensão miceliana nas UE, sendo esse procedimento realizado cinco vezes durante o período de condução do experimento, em intervalos de 15 dias, partindo-se da semente. Nos tratamentos sem a inoculação de fungos foi aplicado somente o meio MNM, com o intuito de evitar influência do meio de multiplicação do fungo nos resultados obtidos.

O óleo essencial utilizado foi o de *Eucalyptus grandis* obtido através da metodologia descrita por (VITTI E BRITTO, 2003). A concentração do óleo essencial utilizado no experimento seguiram às indicadas por Steffen et al. (2011, 2012), que avaliaram doses de óleo essencial de eucalipto para estimular a micorrização de mudas de *Eucalyptus grandis* e de sibipiruna, sendo utilizado nesses experimentos à concentração de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$. Foram realizadas quatro aplicações, contendo 2 ml da solução de óleo essencial, sendo, a primeira, 12 dias após a emergência das plântulas e as demais em intervalos de 15 dias. As adubações de cobertura seguiram as recomendações propostas por (GONÇALVES E BENEDETTI, 2005).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4 x 5), qualitativo em A e quantitativo em D, sendo o fator A quatro formas de inoculação (sem fungo e óleo (testemunha); somente adição de óleo; semente adição de fungo e adição de óleo + fungo e o fator D cinco doses de cobre (teor natural do solo, 60, 120, 180 e 240 mg kg^{-1} de solo), com cinco repetições. O experimento permaneceu instalado durante 180 dias.

Os parâmetros avaliados foram altura de planta (AP), diâmetro do colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da parte radicular (MSPR), comprimento da raiz principal (CRP), porcentagem de colonização radicular (CM%), e área superficial específica de raízes (ASE) A altura de plantas foi obtida com régua graduada de 30 cm, sendo obtida pela distância do colo até as últimas axilas foliares. O diâmetro do colo foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital. Para a avaliação da MSPA e MSPR foi separado a parte aérea da radicular e secadas em estufa a temperatura de 65° C, até apresentarem peso constante, posteriormente ambas às partes foram pesadas em balança analítica.

Para obtenção da porcentagem de colonização radicular, as raízes foram submetidas ao procedimento de clareamento e coloração, que constou em deixar uma amostra de 0,1g de

raízes imersas em solução de KOH 10%, a 80 °C durante 1 h e 30 min. Após, lavou-se com água e, posteriormente, as raízes foram colocadas em HCl 0,1M durante 2 minutos. Lavou-se novamente com água e colocaram-nas em Trypan Blue (corante) a 80 °C por 30 min (BRUNDRETT et al., 1996). A quantificação da porcentagem de colonização radicular foi obtida pelo método da placa quadriculada (BRUNDRET et al., 1996). A área superficial específica foi obtida de acordo com metodologia proposta por Tennant (TENNANT, 1975).

Com base nos parâmetros morfológicos avaliados foram calculados os índices de qualidade de mudas: relação entre altura da parte aérea e diâmetro do coleto (H/DC) e o Índice de Qualidade de Dickson (IQD), Dickson et al. (1960):
$$IQD = \frac{PMST(g)}{[AP(cm)/DC(mm)]+[PMSPA(g)/PMSPR(g)]}$$

Os valores médios do comprimento radicular, massa seca da parte aérea, massa seca da parte radicular e índice de qualidade de Dickson foram ajustados pela equação ($x^{0.5}$). Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando apresentaram interação significativa entre A x D foram submetidos à análise de regressão e teste de comparação de média de Tukey, com nível de 5% de probabilidade de erro, pelo programa Sisvar (FERREIRA, 2011). Para os parâmetros sem interação significativa, foram desdobrados os efeitos simples com nível de 5% de probabilidade de erro. As doses que causaram 50% de redução (DR50) nos parâmetros foram calculadas com base nas equações de regressão.

5.5 Resultados e discussão

O percentual de colonização radicular da bracatinga apresentou interação significativa entre as doses de cobre e os tratamentos inoculados com fungos com e sem óleo (Figura 1). A formação de micorriza ocorreu nas doses 0, 60 e 120 mg kg⁻¹, nos tratamentos com fungo e óleo + fungo, sendo que na dose 60 mg kg⁻¹ o maior percentual de colonização radicular foi no tratamento óleo + fungo (Figura 1). Steffen et al. (2011) verificaram que o óleo essencial de eucalipto estimulou o percentual de colonização radicular em mudas de *Eucalyptus grandis*, atribuindo ao óleo essencial estar atuando de forma efetiva no quimiotropismo entre hifas do fungo e células radiculares. Entretanto, a porcentagem de colonização ectomicorrízica encontrada nesse trabalho foi inferior em 40 e 20 % aos de Steffen et al. (2011) em mudas de eucalipto e de STEFFEN et al. (2012) em sibipiruna, respectivamente, com aplicação de 40 µL L⁻¹ de óleo essencial de eucalipto em substrato comercial. As doses de cobre a partir de 180 mg kg⁻¹ inibiram a formação da associação ectomicorrízica nas mudas de bracatinga.

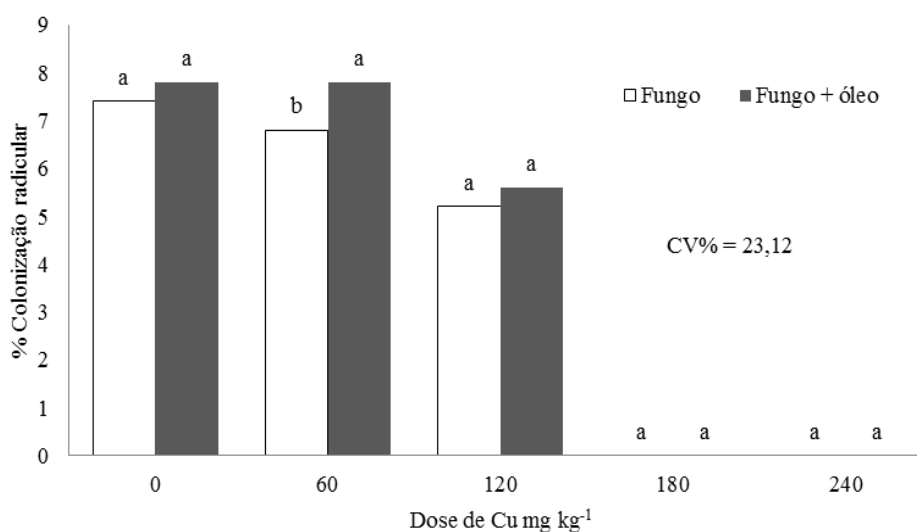


Figura 1 - Percentual de colonização radicular de mudas de bracatinga obtida nos tratamentos fungo e óleo + fungo, submetida as dose de 0, 60, 120, 180 e 240 mg de Cu kg⁻¹ de solo.

Os resultados também evidenciaram interação significativa entre doses de cobre e as formas de inoculação para a altura, diâmetro, relação H/D e índice de qualidade de Dickson. Na tabela 1 estão relacionadas as comparações de médias para as formas de inoculação e na figura 1 as equações de regressão para as doses de cobre.

Verifica-se que as doses de cobre causaram efeito negativo para a altura das mudas de bracatinga (Figura 2), no entanto, a utilização de óleo possibilitou maior altura na dose de 180 mg kg⁻¹ de cobre (Tabela 1). O uso de óleos essenciais sobre as plantas ativa mecanismos de defesa, ou reguladores de crescimento, como fitoalexinas e citocininas (BONALDO et al., 2007). A produção de citocininas pode resultar em maior desenvolvimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2013). Desse modo, a utilização de óleo essencial de eucalipto parece beneficiar a altura de mudas de bracatinga em solo com elevada concentração de cobre.

O diâmetro do colo foi menor no tratamento óleo em relação ao fungo sem aplicação de cobre no solo (Tabela1). No tratamento sem a aplicação de cobre os valores observados para o diâmetro do colo, nos tratamentos fungo e óleo + fungo foram significativamente superiores aos demais, incrementando em 16.6% e 4.9%, respectivamente, quando comparadas ao tratamento testemunha. Mello et al. (2009) também verificou maior diâmetro do colo, em mudas micorrizadas, no estabelecimento *Eucalyptus grandis* em solo arenoso. Esses resultados indicam que a inoculação do fungo *Pisolithus microcarpus* pode promover aumentos no diâmetro do colo das mudas de bracatinga em solo não contaminado.

Tabela 1 - Altura, diâmetro do colo, relação altura diâmetro do colo (H/D), índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de bracatinga submetidas a adição de óleo, fungo e óleo + fungo e doses de cobre.

Dose de Cu (mg kg ⁻¹)	Testemunha	Óleo	Fungo	Óleo + Fungo
----- Altura (cm) -----				
0	9,5 A*	8,9 A	8,7 A	9,2 A
60	8,7 A	9,0 A	9,4 A	9,5 A
120	8,4 AB	8,0 AB	7,68 B	9,0 A
180	7,7 B	9,4 A	8,44 AB	8,6 AB
240	8,2 A	8,9 A	8,32 A	8,8 A
CV%			7,57	
----- Diâmetro do colo (mm) -----				
0	1,02 AB	0,92 B	1,19 A	1,07 AB
60	0,95 A	0,92 A	0,89 A	0,97 A
120	0,93 A	0,83 A	0,82 A	0,84 A
180	0,79 AB	0,95 A	0,72 B	0,83 AB
240	0,85 A	0,92 A	0,82 A	0,78 A
CV%			14,79	
----- H/D -----				
0	9,6 AB	9,7 A	7,7 B	8,9 AB
60	9,3 A	10,0 A	10,5 A	10,0 A
120	9,0 A	9,7 A	9,3 A	10,7 A
180	9,7 B	9,8 AB	11,7 A	10,3 AB
240	9,6 A	9,8 A	10,2 A	11,4 A
CV%			12,03	
----- IQD -----				
0	0,016 A	0,015 A	0,022 A	0,017 A
60	0,018 A	0,015 A	0,013 A	0,022 A
120	0,013 A	0,010 A	0,011 A	0,010 A
180	0,010 B	0,024 A	0,006 B	0,009 B
240	0,009 A	0,012 A	0,011 A	0,007 A
CV%			24,45	

* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Observou-se que os tratamentos fungo e óleo + fungo possibilitaram valores menores para a relação H/D no tratamento sem aplicação de cobre (Tabela 1), e aumento na relação H/D com a adição das doses de cobre ao solo (Figura 2C). Entretanto, os valores observados em todos os tratamentos estão acima da faixa adequada para o transplante, que varia de 5,4 a 8,1, conforme (CARNEIRO, 1995). Isso indica que a inoculação de *Pisolithus microcarpus* embora contribua para o diâmetro do colo da bracatinga (Tabela 1), quando submetido à elevadas doses de cobre, poderá induzir ao estiolamento da muda de bracatinga.

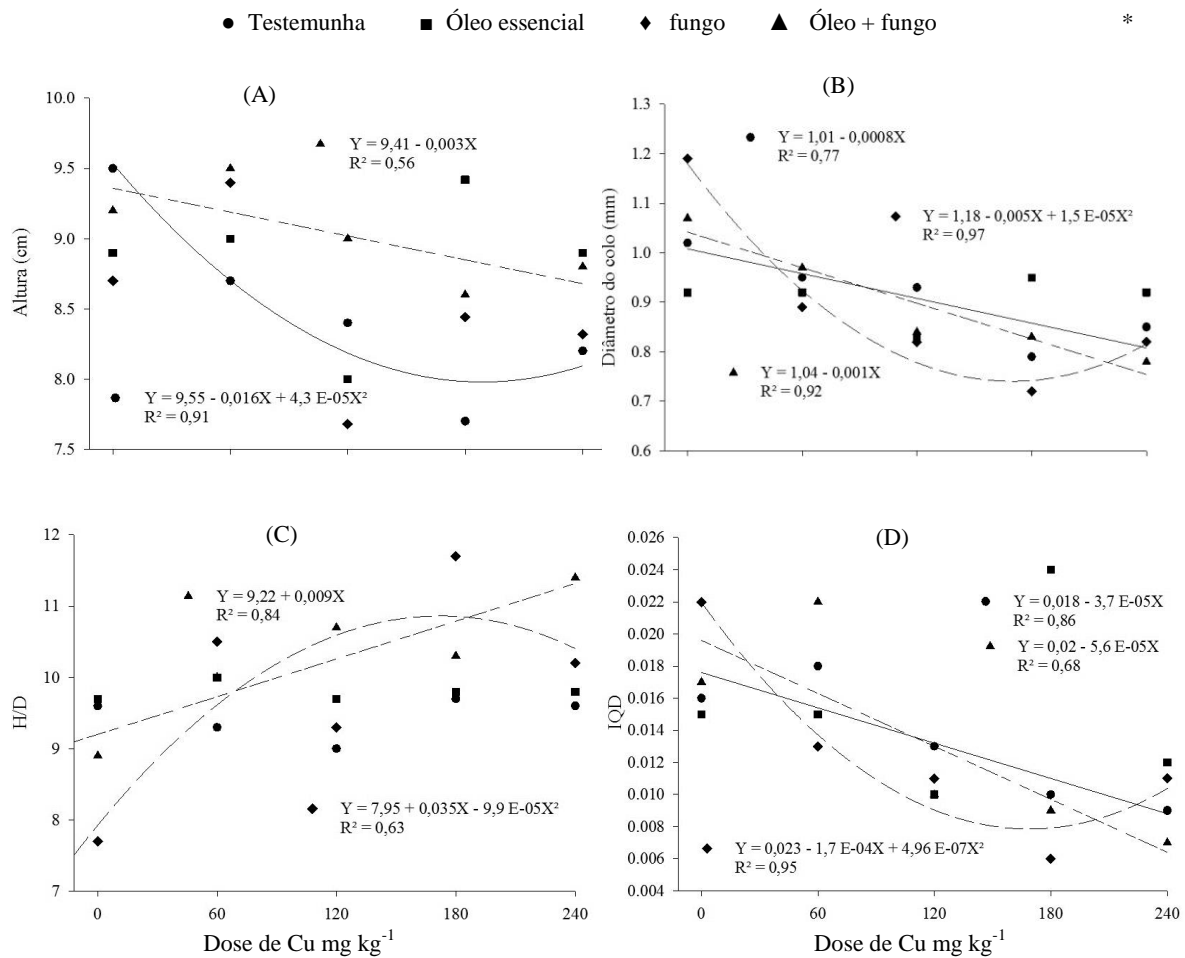


Figura 2 - Equações de regressão para altura (A), diâmetro do colo (B), relação altura/diâmetro do colo (H/D) (C) e índice de qualidade de Dickson (IQD) (D) das mudas de bracatinga submetidas a adição de óleo, fungo e óleo + fungo em função das doses de cobre. * equações de regressão com $R^2 < 0,55$ não foram ajustadas

O índice de qualidade de Dickson foi maior no tratamento óleo, em relação aos demais tratamentos qualitativos, na dose de 180 mg kg^{-1} (Tabela 1), sendo reduzido linearmente nos tratamentos testemunha e óleo + fungo e de forma quadrática negativa no tratamento fungo, com as doses de cobre (Figura 2D), essa redução no IQD nos tratamentos onde foi inoculado fungo pode estar relacionada a baixa colonização ectomicorrízica, e também pela ausência da rede de Hartig nas plântulas de bracatinga (Capítulo 2), o que pode não ter efetivado as trocas de nutrientes entre o fungo e planta. Os óleos essenciais podem atuar como indutores biológicos no crescimento vegetal contribuindo para melhorias na qualidade de mudas (STEFFEN et al., 2011). Para o cálculo do IQD são considerados atributos morfológicos que

expressam a robustez das mudas e, nesse caso, é possível que os valores baixos observados nesse trabalho, sejam efeito do maior crescimento em altura, ou menor produção de massa seca radicular das mudas. Esses resultados indicam que o uso de óleo essencial de eucalipto pode contribuir para o IQD das mudas de bracatinga em doses elevadas de cobre.

Para os parâmetros sem interação significativa verificou-se que a massa seca da parte aérea e radicular, comprimento e área superficial específica foram afetados significativamente com as doses de cobre (Figura 3). A massa seca da parte aérea foi reduzida linearmente com as doses de cobre, sendo 58% menor com 240 mg de cobre kg^{-1} de solo e DL50 em 230,5 mg kg^{-1} de cobre (Figura 3A). De acordo com Grassi Filho (2013) plantas submetidas a doses elevadas de cobre podem apresentar desfolhamento precoce e também redução no crescimento da parte aérea. Esse resultado corrobora com os de Silva et al. (2011) que também encontraram redução na massa seca da parte aérea de arbóreas nativas como a *Peltophorum dubium* em doses elevadas de cobre no solo.

A massa seca da parte radicular também foi reduzida linearmente, sendo 72% menor na dose 240 mg kg^{-1} , quando comparado às mudas produzidas no tratamento sem aplicação de cobre (Figura 3B). Resultados semelhantes foram observados por Silva et al. (2012) para mudas de dedaleiro produzidas em solo contaminado com cobre. Entretanto, embora a produção da massa seca da parte radicular das mudas de bracatinga tenha sido reduzida pela aplicação das doses de cobre, a DL50 estimada foi de 364,4 mg kg^{-1} de cobre (Figura 3B), indicando que o cobre influencia primeiramente a parte aérea das mudas de bracatinga.

O comprimento radicular (Figura 3C) e a área superficial específica (Figura 3D) das raízes da bracatinga apresentaram ponto de máxima na dose de 88 e 97 mg kg^{-1} , respectivamente. Silva et al. (2011) também observaram que, a partir de determinada dose, a contaminação com cobre reduziu o comprimento radicular em mudas de aroeira vermelha. Conforme Bellion et al. (2006) o cobre quando absorvido no sistema radicular interfere na expansão celular, atuando diretamente na redução das raízes (PANOU-FILOTHEU et al., 2001). Desse modo, o cobre em altas concentrações no solo pode causar efeitos negativos no sistema radicular de mudas de bracatinga.

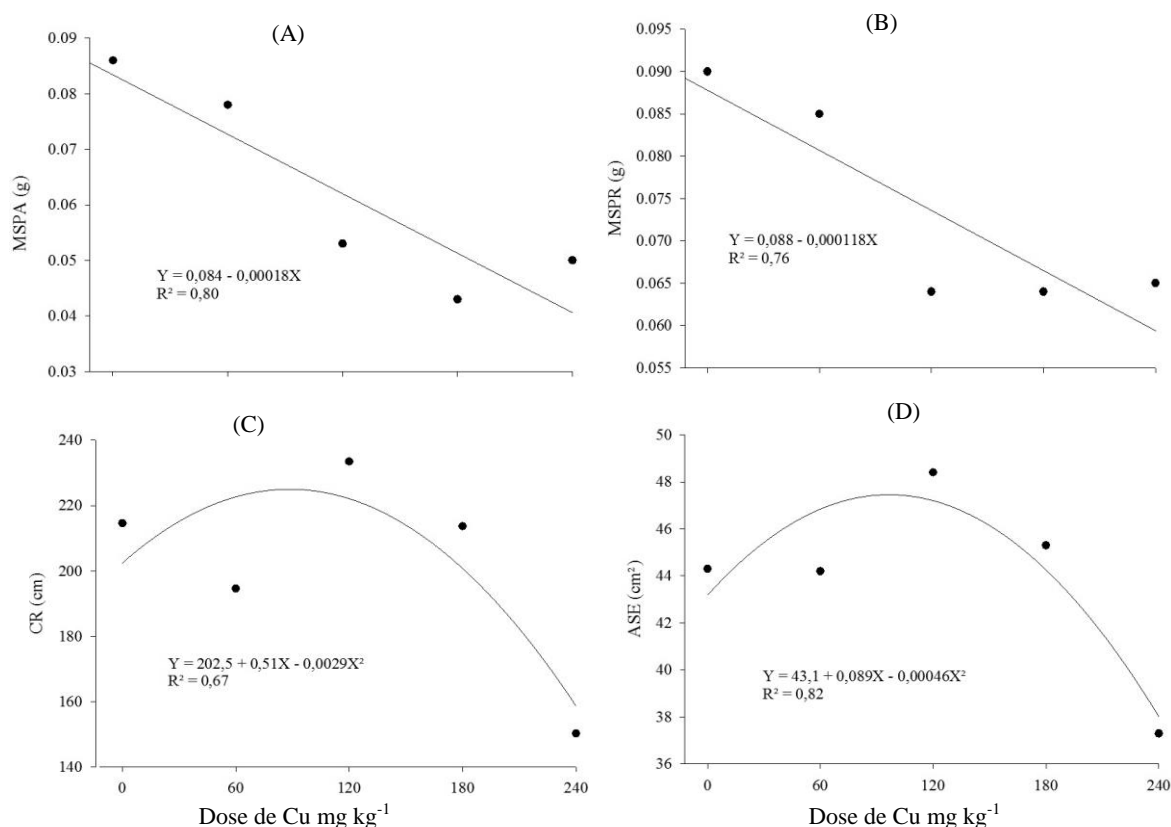


Figura 3 - Massa seca da parte aérea (MSPA) (A), massa seca da parte radicular (MSPR) (B), comprimento radicular (CR) (C) e área superficial específica (ASE) (D) das mudas de bracatinga em função das doses de cobre. Médias dos tratamentos: testemunha, óleo, fungo e fungo + óleo.

Não foi verificado efeito significativo dos tratamentos qualitativos nos valores de massa seca da parte aérea, massa seca da parte radicular, comprimento radicular e área superficial específica radicular. Trabalhos de pesquisa tem demonstrado o efeito positivo da adição do óleo essencial de eucalipto em espécies florestais (STEFFEN et al., 2012), bem como da inoculação com fungo ectomicorrízico na massa seca da parte aérea de mudas de espécies arbóreas nativas do Brasil, como *Acacia mangium* e *Sesbania virgata* (SCHIAVO et al., 2010). Entretanto, mesmo ocorrendo colonização, ainda é possível que a simbiose não seja funcional, ou que o fungo atue como parasita da planta em situação de estresse (SMITH e READ, 2008). Dessa forma, embora tenha ocorrido à formação de ectomicorriza nas menores doses de cobre (Figura 1), não foi possível evidenciar efeito dos tratamentos qualitativos na

massa seca da parte aérea e radicular, comprimento e área superficial específica radicular das mudas de bracatinga.

5.6 Conclusões

Não há efeito da inoculação de *Pisolithus microcarpus* no crescimento das mudas de bracatinga em solo contaminado com cobre.

As doses de cobre reduzem a massa seca da parte aérea e radicular das mudas de bracatinga.

5.7 Referências Bibliográficas

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

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

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B. **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400p.

Carpanezzi, A. et al. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella Benth*)**, EMBRAPA – CNPF. Colombo, 1988. 70p. Documentos, 20.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451p.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, v.36, p.10-13, 1960.

DORAN, J. C. Commercial sources, uses, formation, and biology. In: Boland, D. J.; Brophy, J. J.; House, A. P. N. ***Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: Inkata, p.11-28, 1991.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

GONÇALVES, J. L. M, BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005. 427p.

GRASSI FILHO, H. **Cobre na planta**. 2005. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS. <<http://www.ciencialivre.pro.br/media/5d14138ca192e610ffff81e2fffd523.pdf>>. 15 Mai 2013.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. ed.4. New York: Boca Raton, 2010. 548p.

MAGALHÃES, M. O. L. et al. Potencial de duas espécies de eucalipto na fitoestabilização de solo contaminado com zinco. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p.805-812, 2011.

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

MELLO, A. H. et al. Estabelecimento a campo de mudas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas com *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116) em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v.19, p.149-155, 2009.

NACHTIGALL, G. R. et al. Copper concentration of vineyard soils as a function of pH variation and addition of poultry litter. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 941-948, 2007.

NOWACK, B.; SCHULIN, R.; ROBINSON, B. H. Critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 5525-5532, 2006.

PANOU-FILOTHEU, H. BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*). **Annals of Botany**, v.88, p. 207-214, 2001.

REGENSBURGER, B.; COMIN, J. J.; AUMOND, J. J.; Integração de técnicas de solo, plantas e animais para recuperar áreas degradadas. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1773-1776, 2008.

SANTOS, G. C. G.; RODELLA, A. A.; ABREU, C. A.; COSCIONE, A. R. . Vegetable species for phytoextraction of boron, copper, lead, manganese and zinc from contaminated soil. **Scientia Agricola**, v. 67, p. 713-719, 2010.

SCHIAVO, J. A.; MARTINS, M. A.; RODRIGUES, L. A.; Crescimento de mudas de *Acacia mangium*, *Sesbania virgata* e *Eucalyptus camaldulensis*, inoculadas com fungos micorrízicos, em casa-de-vegetação e em cava-de-extração de argila. **Acta Scientiarum**, v. 32, p. 171-178, 2010.

SILVA, R. F. S. et al. Influência da contaminação do solo por cobre no crescimento e qualidade de mudas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. Zucc.) e aroeira-vermelha (*Schinus therebinthifolius* Raddi). **Ciência Florestal**, v. 21, p. 111-118, 2011.

SILVA, R. F. et al. Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) taub.) inoculada com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. **Ciência Florestal**, v. 20, p.147-156, 2010.

SILVA, R. F. et al. Crescimento e qualidade de mudas de timbó e dedaleiro cultivadas em solo contaminado por cobre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 881-886, 2012.

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

STEFFEN, B. R. et al. Ação do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no estabelecimento de mudas de *Eucalyptus grandis* em solo contaminado por cobre. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, p. 245-255, 2011.

STEFFEN, R. B. et al. Óleo essencial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden no estímulo à micorrização de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, v. 22, p. 69-78, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed, Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

Tennant, D. A test of a modified liwe intersect method of estimating root length. **Journal Ecology**, v.63, p.995-1001, 1975.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. São Paulo: ESALQ/USP, 2003. 26p.

WENKE, K.; KAI, M.; PIETHULLA, B. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. **Planta**, v. 231, p. 499-506, 2010.

6 DISCUSSÃO

A contaminação do solo por metais pesados como o cobre está vinculada a áreas de mineração, aplicação de resíduos industriais, interferindo de maneira negativa no desenvolvimento das plantas, as quais apresentam comportamento diferenciado em relação a presença de cobre no solo. Porém, pouco sabe-se sobre o comportamento de espécies florestais como o angico, bracatinga e grápia em solo contaminado por cobre e o efeito da aplicação de ectomicorriza no crescimento de mudas em solo contaminado por cobre.

O desenvolvimento das mudas de angico, bracatinga e grápia em solo contaminado por cobre apresentou resultados distintos sobre o efeito do cobre nos parâmetros avaliados. As mudas de angico, a bracatinga e a grápia apresentam redução na altura de plantas, diâmetro do colo, massa seca da parte aérea, área superficial específica de raízes e índice de qualidade de Dickson com o incremento das doses de cobre aplicadas ao solo, no entanto a grápia foi a espécie que apresentou maior desenvolvimento da altura e do diâmetro nas doses de cobre testadas, exceto na dose 480 mg kg^{-1} de cobre que não diferiu do angico. O coeficiente de impacto no teor relativo de cobre foi menor na grápia, indicando a possibilidade dessa espécie possuir mecanismos de destoxicação do cobre como, por exemplo, a compartimentalização no vacúolo (QIAN ET AL., 2005; ZANQUETA ET AL., 2011).

No que se refere ao uso de ectomicorizas em espécies utilizadas para revegetação de áreas contaminadas, pode ser uma alternativa para auxiliar o desenvolvimento de plantas em solos contaminados por metais pesados. Os resultados obtidos nesse estudo indicaram que o uso de óleo essencial de eucalipto na dose de $40 \mu\text{L L}^{-1}$ favoreceu o estabelecimento de associação ectomicorrízica em mudas de bracatinga e grápia, indicando o potencial de seu uso quando se refere à estratégias para formação de ectomicorizas em espécies nativas. O efeito positivo do óleo essencial de eucalipto na micorrização possivelmente ocorra pelo estímulo da fase pré-simbiótica entre fungo e planta (BÉCARD et al., 2004; AKIYAMA et al., 2005; ZHILIN et al., 2007). As plântulas de bracatinga apresentaram 6% de colonização ectomicorrízica com a inoculação de *Pisolithus microcarpus* enquanto que na presença de óleo essencial de eucalipto e inoculação de *Pisolithus microcarpus* a colonização foi de 9%.

Observou-se que as doses de cobre acima de 180 mg kg^{-1} inibiram a associação ectomicorrízica nas mudas de bracatinga não sendo possível a observação de efeito benéfico dos fungos ectomicorrízicos no crescimento das mudas de bracatinga em solo contaminado

por cobre. As doses de cobre reduziram a massa seca da parte aérea e radicular. Observou-se maior índice de qualidade de mudas com a aplicação de óleo essencial de eucalipto na dose de 180 mg kg⁻¹. Esse resultado pode ser atribuído ao óleo essencial atuar como indutor biológico no crescimento vegetal, melhorando o índice de qualidade de mudas de bracatinga (STEFFEN et al., 2011).

Com base nos resultados obtidos nos experimentos novos estudos que contemplem associação micorrízica e uso de óleo essencial de eucalipto em espécies nativas do Rio grande do Sul merecem atenção, devido ao grande número de espécies nativas encontradas na região as quais se desconhece seu potencial em amenizar os efeitos do excesso de cobre no solo.

6.1 Referências bibliográficas

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

BÉCARD, G. et al. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 1186-1197, 2004..

KALIŠOVÁ-ŠPIROCHOVÁ, I. et al. Accumulation of heavymetals by in vitro cultures of plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 3, p. 269-276, 2003.

QIAN, M.; LI, X.; E SHEN, Z. Adaptative copper tolerance in *Elsholtzia haichowensis* involves the production of Cu-induced thiol peptides. **Plant Growth Regulation**, v.47 p.65-73, 2005.

STEFFEN, B. R. et al. Ação do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no estabelecimento de mudas de *Eucalyptus grandis* em solo contaminado por cobre. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, p. 245-255, 2011.

ZANCHETA, A. C. F. et al. Fitoextração de cobre por espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva. **Bragantia**, v. 70 p. 737-744, 2011.

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, 2007.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos indicam que as maiores doses de cobre aplicadas ao solo causaram efeitos negativos nos parâmetros de crescimento nas mudas de angico, bracatinga e grápia, no entanto os efeitos do cobre são menores nas mudas de grápia em relação ao angico e bracatinga. No que se refere a translocação de cobre para a parte aérea, o angico apresenta menor translocação de cobre para a parte aérea, sendo que esse elemento permanece em maior quantidade no sistema radicular das mudas de angico, indicando que as espécies nativas estudadas apresentam comportamento diferente quando produzidas em solo contaminado com cobre.

O óleo essencial de eucalipto pode contribuir para o estabelecimento de associação ectomicorrízica em mudas de bracatinga e grápia. Embora não tenha sido possível a visualização da estrutura interna da ectomicorriza (rede de Hartig) nas plântulas de bracatinga, no entanto, observou-se que a inoculação com o isolado UFSC-Pt116 proporciona os maiores valores para a altura, comprimento radicular, número de folhas, massa fresca radicular e massa seca aérea das plântulas de bracatinga quando comparados aos tratamentos sem inoculação.

A inoculação de *Pisolithus microcarpus* possibilita a associação do fungo com as raízes das mudas de bracatinga. Entretanto, não há influência positiva da ectomicorriza no desenvolvimento das mudas de bracatinga produzidas em solo contaminado por cobre. O óleo essencial de eucalipto promove aumento no percentual de associação ectomicorrízica das mudas de bracatinga, e ainda aumenta a altura das mudas de bracatinga na dose de 180 mg kg⁻¹.

As informações sobre a formação de ectomicorrizas em espécies nativas do Brasil ainda possui poucos relatos. Diante disso, novos estudos avaliando a formação de ectomicorrizas em arbóreas nativas torna - se necessário, visto que as mesmas possuem potencial para serem utilizadas na recuperação de ambientes contaminados por metais pesados, especialmente o cobre