

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden NO ESTÍMULO À MICORRIZAÇÃO DE MUDAS DE SIBIPIRUNA (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.)**ESSENTIAL OIL OF *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden IN STIMULATING MYCORRHIZAL SIBIPIRUNA SEEDLINGS (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.)Ricardo Bemfica Steffen<sup>1</sup> Zaida Inês Antonioli<sup>2</sup>  
Gerusa Pauli Kist Steffen<sup>3</sup> Rodrigo Ferreira da Silva<sup>4</sup>**RESUMO**

Os metabólitos secundários extraídos de espécies florestais formadoras de ectomicorrizas podem estimular a simbiose entre fungos ectomicorrízicos e espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do óleo essencial de eucalipto na formação de associação ectomicorrízica e no crescimento de mudas de sibipiruna, em condições de casa de vegetação. Plântulas de sibipiruna foram submetidas a quatro tratamentos constituídos pela presença e ausência do inóculo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) e aplicação ou não do óleo essencial de eucalipto. O óleo essencial foi solubilizado e aplicado com pulverizador manual nos períodos de 0, 7 e 14 dias a contar da data de transplante das plântulas. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com sete repetições. Decorridos 90 dias de crescimento, as mudas foram coletadas e avaliou-se altura, diâmetro do colo, comprimento de raízes, massa seca da parte aérea e porcentagem de colonização micorrízica. A aplicação do óleo essencial de eucalipto favoreceu a ocorrência de associação ectomicorrízica, com *Pisolithus microcarpus* em mudas de sibipiruna, proporcionando aumento significativo no desenvolvimento da parte aérea das mudas.

**Palavras-chave:** plantas nativas; *Pisolithus microcarpus*; metabólitos secundários.

**ABSTRACT**

The secondary metabolites extracted from forest species forming ectomycorrhizal could stimulate the symbiosis between ectomycorrhizal fungi and natives forest species of Rio Grande do Sul state. The aim of this work was to evaluate ectomycorrhizal association and the seedlings growth of inoculated and non-inoculated Sibipiruna with *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) ectomycorrhizal fungus and submitted and not submitted to the application of the essential oil of *Eucalyptus grandis*, in greenhouse conditions. The essential oil was solubilized and applied with manual spray during periods of 0, 7 and 14 days from the date of seedlings transplanting. A randomized design with seven repetitions was used. After 90 days of plant growth, it was evaluated the seedling colonization degree, the height, the stem diameter, the root length and the dry mass of shoots. The eucalyptus essential oil stimulates the occurrence of ectomycorrhizal on Sibipiruna seedlings, thus providing high seedling development when inoculated with *Pisolithus microcarpus*.

**Keywords:** native plants; *Pisolithus microcarpus*; secondary metabolites.

1. Engenheiro Agrônomo, Doutor em Ciência do Solo, Pós-doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). Bolsista CAPES. bemfica\_steffen@yahoo.com.br
2. Bióloga, Dr<sup>a</sup>., Professora Associada do Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). Bolsista de produtividade do CNPq. zantonioli@gmail.com
3. Engenheira Agrônoma, MSc., Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). Bolsista CAPES. ge.pauli@yahoo.com.br
4. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Curso de Agronomia, Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Maria, Linha Sete de Setembro, s/n, BR 386, Km 40, CEP 98400-000, Frederico Westphalen (RS). rofesil@bol.com.br

Recebido para publicação em 16/06/2010 e aceito em 21/12/2010

## INTRODUÇÃO

Dentre as inter-relações biológicas estabelecidas no solo, a simbiose entre planta e micro-organismos heterotróficos, como o caso das micorrizas, destaca-se pelos benefícios proporcionados à produção vegetal. As micorrizas são consideradas a simbiose de maior expressão ecológica e econômica entre fungos do solo e raízes de plantas superiores (SMITH e READ, 2008), representando alternativa para o estabelecimento de mudas a campo e para a manutenção e estabilidade das florestas (OLIVEIRA et al., 2008). Os fungos ectomicorrízicos (fECM) são importantes agentes estruturadores de comunidades florestais, favorecendo a sucessão e resiliência, especialmente durante períodos de alterações climáticas (SMITH e READ, 2008). Estes micro-organismos interagem com espécies vegetais formando associação simbiótica mutualística, resultando em benefícios, como maior absorção de água e nutrientes e proteção das plantas a estresses bióticos e abióticos (KHAN, 2006; GRAZZIOTTI et al., 2001; FENG et al., 2002; SILVA et al., 2003a; PERA e PARLADÉ, 2005; ZEPPA et al., 2005; GÖHRE e PASZKOWSKI, 2006).

Apesar da consolidação do conhecimento sobre os benefícios decorrentes da associação micorrízica, poucos são os trabalhos de pesquisa relacionados à simbiose com espécies florestais nativas. Avaliando a simbiose ectomicorrízica *in vitro* de espécies florestais nativas, Silva (2007) observou associação de isolados ectomicorrízicos com as espécies canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert), angico-vermelho (*Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.). Estudando a ocorrência natural de associação micorrízica em espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul, Andreatza et al. (2008) observaram a presença de fungos micorrízicos arbusculares associados às raízes das espécies araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), timbaúva, canafístula, ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl.), ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Tol.) e grábia (*Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbride). Conforme estes autores, o conhecimento sobre a associação entre espécies florestais nativas no estado gaúcho e fungos ectomicorrízicos pode representar uma alternativa para o estabelecimento, sustentabilidade e desenvolvimento destas espécies arbóreas.

No entanto, os fECM parecem formar simbiose apenas com espécies florestais específicas, limitando a ocorrência dessa associação (SMITH e READ, 2008). Contudo, não há um consenso sobre a ocorrência de ectomicorrizas em espécies florestais nativas do Brasil, sendo considerada rara esta associação em condições naturais (OLIVEIRA et al., 2008). Esse comportamento resulta do fato de que muitas espécies, ou mesmo isolados de fECM, apresentam seletividade em relação a determinadas espécies vegetais (CARRERA-NIEVA e LÓPEZ-RÍOS, 2004; SMITH e READ, 2008), permitindo a dependência do fungo na presença de sinais bioquímicos específicos, produzidos pela planta hospedeira (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Essa relação ocorre em associações compatíveis (SOUZA et al., 2006), onde o sistema radicular das plantas sintetiza e disponibiliza metabólitos secundários preferenciais do fungo que atuam como sinais bioquímicos favoráveis ao quimiotropismo (BAPTISTA et al., 1999; FEUGEY et al., 1999). Assim, a utilização dos metabólitos produzidos por plantas simbiotes, como o eucalipto, pode ser uma alternativa tecnológica para estimular o estabelecimento dessa associação nas espécies florestais nativas do Brasil.

A utilização de metabólitos secundários na forma de óleos essenciais de plantas de eucalipto pode causar efeito antagônico a determinadas espécies de micro-organismos (BATISH et al., 2008) e alelopatia a determinadas espécies vegetais (CRUZ et al., 2000; FERREIRA e AQUILA, 2000; GOETZE e THOMÉ, 2004). No entanto, dependendo da concentração de determinados compostos, poderá ocorrer relações de sinergismo, proporcionando a indução do crescimento de micro-organismos ou plantas (BLUM, 1999; MAIRESSE, 2005). A partir desse efeito, alguns trabalhos têm mostrado a bioestimulação dos óleos essenciais no desenvolvimento microbiano (MARTINS et al., 2000; MUCCIARELLI et al., 2003; AKIYAMA et al., 2005) e em espécies vegetais (ALVES et al., 2004; BONALDO et al., 2007). Entretanto, não há relatos na literatura mostrando o efeito da aplicação do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. na bioestimulação da colonização ectomicorrízica de espécies florestais nativas.

Dentre as essências florestais nativas passíveis de utilização em áreas de reflorestamento, a sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.) também conhecida como falso pau-brasil é indicada devido às suas características fisiológicas

desejáveis, potencial madeireiro e fácil adaptação a diferentes tipos de solos (LORENZI, 2002; FERRAZ-GRANDE e TAKAKI, 2006; ARRUDA et al. 2009).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na estimulação da associação ectomicorrízica e no crescimento de mudas de sibipiruna.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e preparo das sementes

As sementes de sibipiruna foram obtidas na Estação Experimental de Silvicultura de Santa Maria – FEPAGRO. Para a desinfestação das sementes, as mesmas foram imersas em etanol (70%) durante 30 segundos, sob agitação. Posteriormente, foram imersas em hipoclorito de sódio (1%) durante 30 segundos e lavadas três vezes em água destilada estéril, para retirada do residual de hipoclorito. Após a assepsia, as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri contendo solução de germinação composta por ácido bórico (3  $\mu\text{M}$ ), glicose (2 g  $\text{L}^{-1}$ ), sulfato de cálcio (500  $\mu\text{M}$ ) e ágar (4 g  $\text{L}^{-1}$ ) a pH 5,7.

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

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

### Preparo do inoculante vegetativo de fECM

Utilizou-se o fECM *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116), mantido em meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado, MNM (MARX, 1969) em pH 5,8, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, em estufa a 26°C.

Para produção do inoculante vegetativo de fECM, adaptou-se a técnica descrita por Chávez et al. (2009). Inicialmente, foram realizadas suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116, em

50 mL de meio MNM líquido, em *erlenmeyers* de 150 mL, a partir de discos de 10 mm de diâmetro obtidos de culturas puras, mantidas em meio sólido, seguindo-se de incubação a 26°C, durante 30 dias. Após esse período, o conteúdo dos *erlenmeyers* foi fragmentado em liquidificador, contendo 200 mL de meio MNM líquido, durante 10 segundos, e misturado a 300 mL de turfa estéril, em *bequer* de 1000 mL, sendo posteriormente acondicionado em incubadora a 26°C até o momento da utilização.

### Tratamentos

O efeito do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na estimulação da associação ectomicorrízica e no crescimento de mudas de sibipiruna foi avaliado nos tratamentos:

- a) sem inoculação e sem aplicação de óleo essencial (controle),
- b) sem inoculação/ com aplicação de óleo essencial (óleo),
- c) com inoculação/ sem aplicação de óleo essencial (inoculado),
- d) com inoculação/ com aplicação do óleo essencial (inoculado + óleo),

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com sete repetições. Para os tratamentos com inoculação, completou-se o volume restante dos vasos com o inoculante vegetativo, mantendo-se o substrato úmido até o momento do transplante das plântulas de eucalipto. Para os tratamentos sem inoculação, os vasos foram preenchidos somente com turfa esterilizada.

### Montagem e condução dos ensaios

Em casa de vegetação, foram utilizados vasos plásticos de cultivo com 1000  $\text{cm}^3$ , os quais tiveram 90% do seu volume preenchido com turfa. A mesma apresentava pH em água 5,8; cálcio 25,9  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ; magnésio 4,7  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ; H+Al 2,5  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ; CTC efetiva 31,1; matéria orgânica 12%; argila 9%; potássio 176  $\text{mg dm}^{-3}$  e fósforo 11,3  $\text{mg dm}^{-3}$ . O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C, durante 60 minutos, por duas vezes consecutivas.

Os vasos foram irrigados a fim de adensar a turfa no seu interior, chegando esta a um volume aproximado de 80% do vaso. Decorrido o período de germinação das sementes, transplantou-se uma plântula de sibipiruna com dois pares de folhas definitivas por vasos de cultivo. A reposição da umidade foi realizada adicionando-se diariamente

água destilada. Aplicou-se solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951) em intervalos de 25 dias.

O óleo essencial foi solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003). Sobre o substrato dos tratamentos correspondentes, foram aplicados, com pulverizador manual, 5 mL do óleo solubilizado na concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ , nos períodos de 0, 7 e 14 dias a contar da data de transplante das plântulas.

### Avaliações

As avaliações foram realizadas aos 90 dias após o transplante, sendo determinados e analisados os seguintes parâmetros: diâmetro do colo (mm), altura da muda (cm), massa seca da parte aérea (mg), comprimento de raízes (cm), porcentagem de colonização radicular e contribuição efetiva dos tratamentos para a altura e massa seca da parte aérea (MSPA) e formação de ectomicorrizas.

O diâmetro do colo foi determinado utilizando-se um paquímetro universal. A altura foi determinada com régua, sendo obtida pela distância do colo da planta até a extremidade das últimas axilas foliares. Posteriormente, as plantas foram cortadas rente ao substrato e colocadas, individualmente, em sacos de papel devidamente identificados e levados à estufa a 65°C, onde permaneceram até peso constante, efetuando-se a determinação da massa seca da parte aérea em balança analítica com precisão de 0,01 g. O comprimento das raízes foi determinado pela distância entre o colo da planta e o ápice da raiz.

Para a determinação da porcentagem de colonização radicular, empregou-se a técnica das intersecções de Giovanetti e Mosse (1980), modificado por Brundrett et al. (1996). A contribuição efetiva dos tratamentos (CET) expressa a contribuição porcentual dos tratamentos em relação ao tratamento controle, sendo calculada pela fórmula:  $\text{CET} (\%) = [(\text{PCT} - \text{PST}) / \text{PST}] * 100$ , onde P: parâmetro analisado (altura ou MSPA); CT: com tratamento (óleo, fungo, ou óleo + fungo) e ST: sem tratamento (controle).

A formação de ectomicorrizas foi avaliada por meio das características anatômicas das raízes, sendo realizados cortes histológicos transversais das raízes adventícias a mão livre com auxílio de lâmina de bisturi, corados com fucsina básica (ROESER, 1962) e posterior confecção de lâminas. 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).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando da significância dos efeitos apontados pela análise, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey pelo *software* SISVAR (FERREIRA, 2000), tomando-se como base os níveis de significância maiores que 95% ( $P \leq 0,05$ ).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas estruturas características da formação de ectomicorrizas nas raízes de sibipiruna não inoculadas com o fECM (vA) e nas raízes inoculadas mas que não receberam a aplicação do óleo essencial. Nas raízes das plantas inoculadas e submetidas à aplicação do óleo essencial de eucalipto, observaram-se alterações na morfologia interna pela presença da rede de Hartig e do manto fúngico recobrimdo a superfície das raízes (Figura 1B). Essas estruturas são típicas formações ectomicorrízicas e são responsáveis pelo armazenamento temporário de nutrientes e pelas trocas de nutrientes e carboidratos entre o fungo e o sistema radicular das plantas (BRUNDRETT et al., 1996; PETERSON et al., 2004).

Observou-se a penetração de hifas fúngicas através da lamela média, a presença de hifas enoveladas nas camadas externas da epiderme (Figuras 1B, 1C e 1D) e a ocorrência de hifas externas, perpendiculares à raiz, a partir do manto fúngico (Figuras 1C e 1D). A formação das ectomicorrizas inicia-se pela superfície das raízes e, posteriormente, pela penetração destas através das junções celulares na zona de colonização micorrízica (SOUZA et al., 2006).

A formação da associação entre o fECM e o sistema radicular no tratamento inoculado + óleo resultou em maior altura e diâmetro do colo das mudas de sibipiruna (vA, 2B). Esses resultados demonstram efeito positivo da aplicação do óleo essencial e da simbiose ectomicorrízica no crescimento em altura e diâmetro das mudas de sibipiruna, já que isoladamente o inóculo micorrízico e o óleo essencial não diferenciaram do controle. Resultados demonstrando o efeito positivo da associação ectomicorrízica quanto ao crescimento das plantas têm sido constantemente relatados na literatura (SILVA et al., 2003b; ANDREAZZA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008; MELLO et al., 2009).

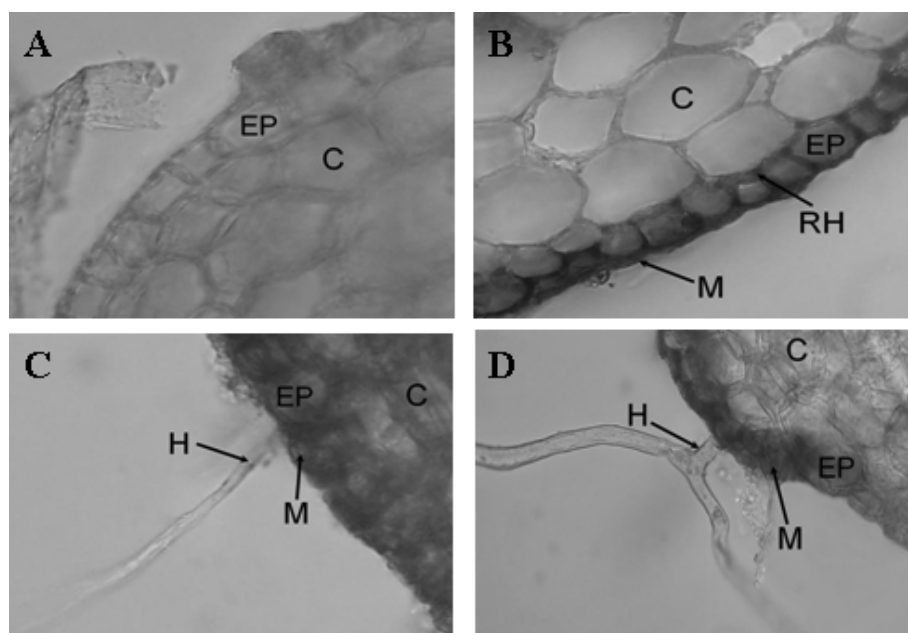


FIGURA 1: Cortes transversais de raízes de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) não inoculadas (A) e inoculadas com o fECM *Pisolithus microcarpus* e submetidas à aplicação do óleo essencial de eucalipto (B, C e D). (EP) células da epiderme, (C) células do córtex radicular, (RH) rede de Hartig, (M) manto fúngico, (H) hifa. Aumento de 200x.

FIGURE 1: Cross-sections of Sibipiruna seedling (*Caesalpinia peltophoroides*) roots non-inoculated (A) and inoculated with *Pisolithus microcarpus* fECM and submitted to the application of eucalyptus essential oil (B, C and D). (EP) epidermis cells, (C) root cortex cells (RH) Hartig net (M) fungal mantle, (H) hyphae. Magnification of 200x.

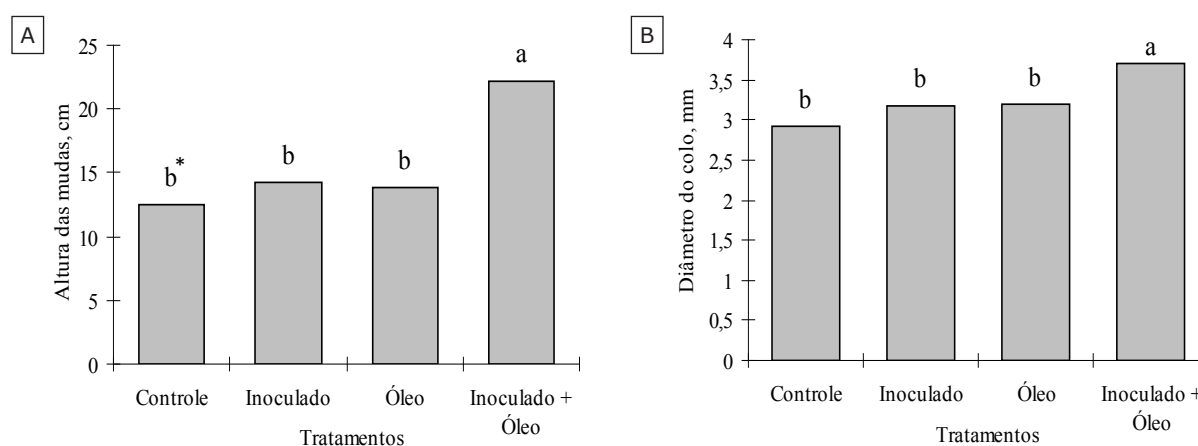


FIGURA 2: Altura (A) e diâmetro do colo (B) de mudas de sibipiruna submetidas aos tratamentos: controle, inoculado, óleo e inoculado mais óleo. \* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Altura das mudas (CV% 11,94), diâmetro do colo (CV% 12,31).

FIGURE 2: Height (A) and stem diameter (B) Sibipiruna seedlings inoculated with *Pisolithus microcarpus* fECM and submitted to the application of eucalyptus essential oil. \* Means followed by same letter do not differ by Tukey test at 5% probability. Height of seedlings (CV 11.94%), neck diameter (CV 12.31%).

Observou-se diferença significativa na massa seca da parte aérea das mudas de sibipiruna nos tratamentos de inoculação e aplicação de óleo essencial em relação ao controle (Figura 3A). A altura das mudas e a massa seca da parte aérea são consideradas os parâmetros mais importantes em estudos relacionados à eficiência de tratamentos sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (SOUZA, 2003). Os fECMs são capazes de produzir substâncias que auxiliam o crescimento da planta, como hormônios de crescimento vegetal e apresentam a capacidade de armazenar metabólitos e nutrientes, funcionando como sistema de reserva para situações de escassez nutricional ou crescimento ativo de ambos (KENDRICK, 2000; SMITH e READ, 2008). A massa seca da parte aérea no tratamento inoculado + óleo apresentou aumento significativo em relação aos tratamentos inoculado e óleo (Figura 3A), indicando a ocorrência de efeito sinérgico entre o fECM e o óleo essencial de eucalipto aplicado.

Alguns compostos vegetais são denominados de bioestimuladores, proporcionando maior produção vegetal e resistência a fatores externos (RUSSO e BERLYN, 1990). Mafia et al. (2007) e Bonaldo et al. (2007) descrevem que a aplicação de óleos essenciais sobre as plantas resulta na ativação de mecanismos de defesa latentes ou

reguladores do crescimento, como fitoalexinas e citocininas. A ativação desses mecanismos pode resultar em maior desenvolvimento vegetal.

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto ao comprimento das raízes (Figura 3B). O maior crescimento das plantas micorrizadas se estabelece pela alongação das hifas fúngicas no solo, não sendo resultante de aumentos no comprimento radicular (SMITH e READ, 2008). Segundo estes autores, em muitos casos, plantas micorrizadas podem apresentar raízes menores em relação a plantas não micorrizadas.

O maior valor de massa seca da parte aérea observado no tratamento óleo, em relação ao tratamento sem óleo (Figura 3A), pode ter ocorrido devido à introdução dos compostos fenólicos presentes no óleo que sob condições favoráveis, podem promover direta ou indiretamente, o crescimento de plantas (COLPAS et al., 2009).

Não foi observada a formação de estruturas características da associação ectomicorrízica nos tratamentos inoculado e óleo (Figura 4). Esses resultados corroboram com Oliveira et al. (2008), que consideram rara a ocorrência de associação de fECM com espécies florestais nativas do Brasil. Entretanto, no tratamento inoculado + óleo, a porcentagem de colonização radicular foi de 22% (Figura 4). Essa colonização, embora possa ser classificada como

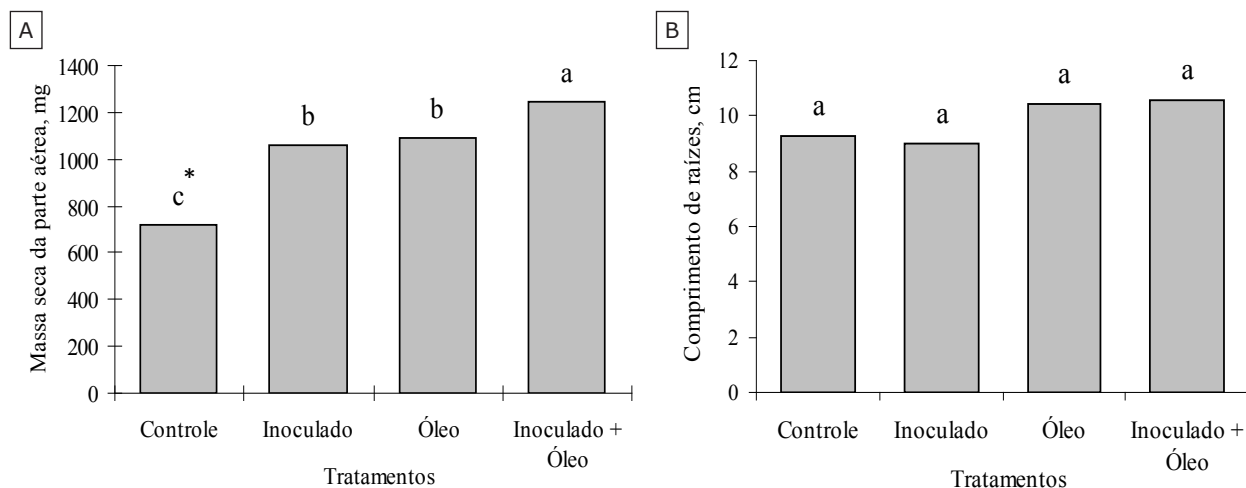


FIGURA 3: Massa seca da parte aérea (A) e comprimento de raízes (B) de mudas de sibipiruna submetidas aos tratamentos: controle, inoculado, óleo e inoculado + óleo. \* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Massa seca da parte aérea (CV% 14,72), comprimento de raízes (CV% 9,25).

FIGURE 3: Shoot dry mass (A) and root length (B) sibipiruna's seedlings inoculated with *Pisolithus microcarpus* fECM and submitted the application of eucalyptus essential oil. \* Means followed by the same letter do not differ from Tukey's test at 5% probability. Dry mass of shoot (CV 14.72%), root length (CV% 9.25).

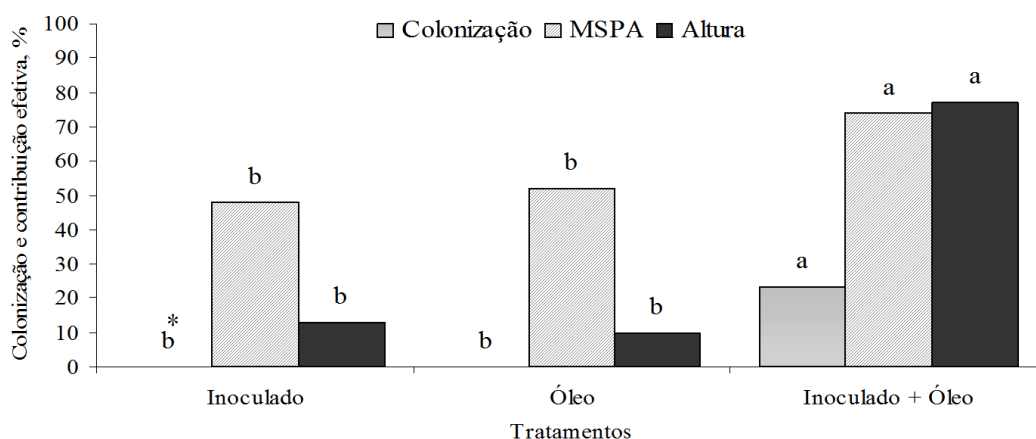


FIGURA 4: Porcentagem de colonização radicular e contribuição efetiva dos tratamentos inoculado, óleo e inoculado + óleo para a altura e massa seca da parte aérea (MSPA) das mudas de sibipiruna, em relação ao tratamento controle. \* Médias seguidas da mesma letra, nos diferentes parâmetros analisados, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

FIGURE 4: Percentage of root colonization and effective inoculated treatments, oil and inoculated + oil for height and dry mass of shoot (MSPA) sibipiruna's seedlings compared to the control. \* Means followed by the same letter in different parameters do not differ from Tukey's test at 5% probability.

baixa, conforme classificação proposta por Zangaro et al. (2002), indica a possibilidade da ocorrência de associação ectomicorrízica nas mudas de sibipiruna, quando a inoculação for condicionada por estímulos bioquímicos externos.

Nos tratamentos inoculado e óleo, as mudas de sibipiruna apresentaram contribuição efetiva de 48 e 52% na produção da massa seca da parte aérea e 13 e 10% na altura das mudas, em relação ao tratamento controle, respectivamente (Figura 4A). Provavelmente, esse resultado tenha sido influenciado pela adição dos metabólitos secundários, os quais podem favorecer o desenvolvimento vegetal, ou por interações entre micro-organismos na rizosfera, que indiretamente, podem ter influenciado o maior desenvolvimento das mudas (BAREA et al., 2005; DUPONNOIS et al., 2008).

Contudo, no tratamento inoculado + óleo, a contribuição efetiva na massa seca da parte aérea foi de 74% e, na altura das mudas, de 77% superiores ao tratamento controle. Estes resultados reforçam a ocorrência de efeito benéfico da aplicação do óleo essencial de eucalipto sobre o estabelecimento da simbiose micorrízica e, conseqüentemente, no crescimento de mudas de sibipiruna.

A observação da associação entre o fECM e o sistema radicular das plantas e sua conseqüente resposta em crescimento, evidencia a possibilidade de micorrização de espécies florestais nativas, desde

que fornecidos compostos ou soluções capazes de agir como sinalizadores bioquímicos ou fisiológicos atuantes no quimiotropismo fungo/planta. No entanto, outros trabalhos devem ser desenvolvidos a fim de elucidar os mecanismos fisiológicos e/ou bioquímicos, os quais culminaram na associação entre o fECM e o sistema radicular das mudas de sibipiruna.

## CONCLUSÃO

A aplicação do óleo essencial de eucalipto, na concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$ , estimula a ocorrência de associação ectomicorrízica em mudas de sibipiruna.

A aplicação do óleo essencial de eucalipto e de inóculo do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* proporciona maior desenvolvimento da parte aérea de mudas de sibipiruna.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, K. et al. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, London, v. 435, p. 824–827, June 2005.
- ALVES, M. da C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n. 11, p.1083-1086, nov. 2004.

- ANDREAZZA, R. et al. Espécies de *Pisolithus* sp. na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 51-59, dez. 2004.
- ANDREAZZA, R. et al. Ocorrência de associação micorrízica em seis essências florestais nativas do estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 339-346, jul./set. 2008.
- ARRUDA, R. et al. Composição e fenologia de espécies herbáceas nativas em reflorestamento heterogêneo. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 3, p. 525-533, jul./set. 2009.
- BAPTISTA, M. J. et al. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* in vitro. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 309-315, out. 1999.
- BAREA, J. M. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1761-1778, July 2005.
- BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, Melbourne, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, Dec. 2008.
- BONALDO, S. M. et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 383-387, jul. 2007.
- BLUM, U. Designing laboratory plant debris – soil bioassays: some reflections. In: INDERJIT, DAKHINI, K. M. N.; FOY, C. L.; eds. **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, p.17-23.
- BRUNDRETT, M. et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra, ACIAR, 1996. 374 p.
- CARRERA-NIEVA, A.; LÓPEZ-RÍOS, G. F. Manejo y evaluación de ectomicorrizas em espécies forestales. **Revista Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, Chapingo, v. 10, n. 2, p. 93-98, ago. 2004.
- CHÁVEZ, D. M. et al. Efecto de tipos de inoculo de três espécies fúngicas em la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. **Bosque**, Valdivia, v. 30, n. 1, p. 4-9, enero/abril 2009.
- COLPAS, F. T. et al. Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopatológica**, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 191-195, jul./set. 2009.
- CRUZ, M. E. da S. et al. Plantas medicinais e alelopatia. **Biociência**, Brasília, n. 15, p. 28-34, jul./ago. 2000.
- DUPONNOIS, R. et al. The mycorrhizosphere effect: a multitrophic interaction complex improves mycorrhizal symbioses and plant growth. In: SIDDIQUI, Z. A.; MOHD, S. A.; KAZUYOSHI, F. (ed.) **Mycorrhizal: sustainable agriculture and forestry**. Aligarh: Springer Science Business Media, 2008, 359 p.
- FABROWSKI, F. J. et al. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* r.t. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 95-106, jun. 2003.
- FERRAZ-GRANDE, F. G. A.; TAKAKI, M. Efeitos da luz, temperatura e estresse de água na germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (CAESALPINOIDEAE). **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 37-42, jan. 2006.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, n. 12, p. 175-204, nov. 2000.
- FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.
- FENG, G. et al. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 12, p. 185–190, Aug. 2002.
- FEUGEY, L. et al. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. **New Phytologist**, New York, v. 144, n. 3, p. 541-547, Mar. 1999.
- GIOVANETTI, M. G.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, n.3, p.489-500, Mar. 1980.
- GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 43-50, jan./mai. 2004.
- GÖHRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bonn, v. 223, p. 1115-1122, May 2006.
- GRAZZIOTTI, P. H. et al. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 839-848, jul./ago. 2001.



- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkely, CA: University of California, (California Agricultura Experiment Station). Circular, 1951. 347 p.
- KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom**. Ontario: Mycologue Publications, 2000. 373 p.
- KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 7. n. 7, p. 503-514, July 2006.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Platarum, 2002. 352 p.
- MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p.589-597, jul./ago. 2007.
- MAIRESSE, L. A. da S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005. 340 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- MARTINS, M. A. et al. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1465-1471, jul. 2000.
- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.
- MELLO, A. H. de. et al. Estabelecimento a campo de mudas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas com *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 149-155, abr./jun. 2009.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Ed. UFLA. 2006. 729 p.
- MUCCIARELLI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, Lancaster, v. 158, n. 3, p. 579-591, June 2003.
- OLIVEIRA, V. L. de. et al. Avanços na aplicação de ectomicorrizas. In: FIGUEIREDO, M. do V. B. et all. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008, 568 p.
- PERA, J.; PARLADÉ, J. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. **Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales**, Madrid, v. 14, n. 3, p.419-433, enero 2005.
- PETERSON, R. L. et al. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: NRC Research Press, 2004. 173 p.
- ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzklefer-Massenprodukt und Kunstwert der Natur. **Mikrokosmos**, Wichita, v. 61, p. 33-36, 1962.
- RUSSO, R. O.; BERLYN, G. P. The use of organica biostimulants to help low input sustainable agriculture. **Journal of Sustainable Agriculture**, Binghamton, v.1, n.2, p. 19-42, Jan. 1990.
- SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.
- SILVA, R. F. da. et al. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 33-42, jun. 2003a.
- SILVA, R. F. da. et al. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden seedling development. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.19, n.3, p.9-17, set./dez. 2003b.
- SILVA, R. F. da. **Tolerância de espécies florestais Arbóreas e fungos ectomicorrízicos ao Cobre**. 2007. 135 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd ed., San Diego, Academic Press, 2008, 787 p.
- SOUZA, L. A. B. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunni* Maiden**. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- SOUZA, V. C. de. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612-618, jul./set. 2006.
- 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. 26 f. (Documentos,17).

ZANGARO, W. et al. Micorriza arbuscular em  
espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Tibagi,  
Paraná. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 77–87, ago./  
set. 2002.

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