

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PEDRO AUGUSTO PINTO BONNASSIS**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS  
ECTOMICORRÍZICOS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E NA  
COLONIZAÇÃO RADICULAR DE *Eucalyptus dunnii* Maiden**

Florianópolis, agosto de 2007

**PEDRO AUGUSTO PINTO BONNASSIS**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS  
ECTOMICORRÍZICOS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E NA  
COLONIZAÇÃO RADICULAR DE *Eucalyptus dunnii* Maiden**

**Dissertação de Mestrado apresentada como  
requisito parcial à obtenção de grau de Mestre.  
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de Santa Catarina.  
Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dra Vetúria Lopes de Oliveira  
e Prof. Dr. Germano Nunes Silva Filho**

Florianópolis, agosto de 2007

*A minha Avó Geni Kumm Pinto (in memoriam)*  
*“Estuda meu filho, estuda!”*

## AGRADECIMENTOS

- À professora Dra. Vetúria Lopes de Oliveira, pela orientação, apoio, amizade e por todo o aprendizado que obtive nos últimos 8 anos.
- Ao professor Dr. Germano Nunes Silva Filho pelo apoio e orientação.
- À professora Dra. Zaida Inês Antonioli, pela orientação e amizade.
- Aos colegas de laboratórios: Bianca Lucchesi, Carla Maísa, Everton Angioletto, Gisela Dalcin, Leyza Paloschi, Liz Cristina, Luciano Alves, Luiz Afonso, Márcio Rossi e Paulo Duarte por todo o apoio e pelos momentos agradáveis durante todo esse tempo de convivência.
- Aos colegas da Universidade Federal de Santa Maria, Manoeli Lupatini e Ricardo Steffan pela orientação, receptividade e companheirismo.
- Ao Engenheiro Agrônomo Luiz Afonso Borges de Souza, por todo o apoio, pela pessoa especial que é, e por ter se tornado um grande amigo.
- À minha filha Luiza, por quem meu coração bate mais forte, por toda a alegria que me proporciona a cada dia.
- Aos meus pais, João Batista Bonnassis Jr. e Sandra Pinto, pelo carinho, amor e toda a educação que recebi, sem os quais, nada seria possível.
- Aos meus irmãos, Renata e João Paulo, simplesmente por existirem, e à minha avó Geni (*in memoriam*) pelo constante incentivo. Amo vocês.
- À mãe de minha filha, Silvana, eterna parceira, por tudo que vivemos juntos e pela pessoa especial que é em minha vida.
- A todos os professores que passaram pela minha vida e que contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica.
- A todos os meus grandes amigos (Luis Ragga, Nélio Herzman, Alexandre Gobbo, Fábio Fúria, Guilherme Fialho, Luciano Moreira, Jerônimo Júnior, Juliana Bosa, Noam Wolter, Ney Zunino) pelos ótimos momentos vividos e pela ajuda na formação da minha personalidade.
- Aos meus irmãos da banda Faraway, Jera, Mércia, Anderson, Rodrigo, Felipe e Taísa pela compreensão e pela convivência agradável, em todo esse tempo.
- À Julie Philippe pelo apoio fantástico na reta “finalíssima”.
- Às demais pessoas que, mesmo não citadas, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
CAPÍTULO 2	
CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Eucalyptus dunnii</i> INOCULADAS COM ISOLADOS DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS, INDIVIDUALMENTE OU EM MISTURA, SOB CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO .....	13
2.1 INTRODUÇÃO.....	13
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
2.2.1 Isolados fúngicos utilizados.....	14
2.2.2 Produção do inóculo fúngico .....	14
2.2.3 Preparo do substrato de plantio .....	15
2.2.4 Germinação das sementes .....	15
2.2.5 Inoculação e condução do experimento.....	16
2.2.6 Avaliação dos resultados .....	17
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
2.4 CONCLUSÕES.....	40
CAPÍTULO 3	
MORFOTIPAGEM DE ECTOMICORRIZAS OBTIDAS ATRAVÉS DE SÍNTESE IN VITRO.....	41
3.1 INTRODUÇÃO.....	41
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
3.2.1 Isolados fúngicos utilizados.....	42
3.2.2 Obtenção das plântulas de <i>Eucalyptus dunnii</i> sob condições assépticas .....	43
3.2.3 Inoculação das plântulas.....	43
3.2.4 Avaliação dos resultados .....	44

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
3.3.1 Aspecto das raízes colonizadas pelos diferentes isolados fúngicos ectomicorrízicos .....	46
3.4 CONCLUSÕES.....	52
CAPÍTULO 4	
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Chondrogaster angustisporus</i> , ISOLADO UFSC-Ch163.....	54
4.1 INTRODUÇÃO.....	54
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	55
4.2.1 Extração do DNA do isolado fúngico ectomicorrízico UFSC-Ch163, <i>Chondrogaster angustisporus</i> .....	55
4.2.2 Amplificação e seqüenciamento da região ITS do DNA de <i>Chondrogaster angustisporus</i> , isolado UFSC-Ch163 .....	57
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
4.3.1 Seqüenciamento da região ITS de <i>Chondrogaster angustisporus</i> , isolado UFSC-Ch163.....	58
4.4 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO 1	
PROTOCOLO DE PREPARO DE 1 L DA SOLUÇÃO P-B (MOLIBDATO DE AMÔNIO).....	70
ANEXO 2	
PROTOCOLO DE PREPARO DA SOLUÇÃO P-C (ÁCIDO 1-AMINO-2-NAFTOL-4-SULFÔNICO).....	71
ANEXO 3	
FICHA DE DESCRIÇÃO DE MORFOTIPOS DE ECTOMICORRIZAS .....	72
ANEXO 4	
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ECTOMICORRIZAS .....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1. Isolados de fungos ectomicorrízicos da coleção da UFSC utilizados nesse estudo .....	14
Quadro 2.2. Esquema dos diferentes tratamentos de inoculação de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> por fungos ectomicorrízicos .....	17
Quadro 3.1. Características morfológicas externas e internas das micorrizas .....	45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1. Altura média de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação.....21
- Tabela 2.2. Diâmetro de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação.....23
- Tabela 2.3. Matéria seca da parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação.....25
- Tabela 2.4. Matéria seca do sistema radicular de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação ...26
- Tabela 2.5. Matéria seca total de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação.....28
- Tabela 2.6. Comprimento radicular de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação.....30
- Tabela 2.7. Relação entre a matéria seca do sistema radicular e da parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação.....32



- Tabela 2.8. Acúmulo de fósforo (P) na parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação ...34
- Tabela 2.9. Teor (%) de fósforo (P) na parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação ...36
- Tabela 2.10. Comprimento radicular colonizado de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação ...37
- Tabela 2.11. Porcentagem de colonização radicular de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação ...39
- Tabela 4.1. Afinidade entre *Chondrogaster angustisporus*, isolado UFSC-Ch163, e os dez fungos mais estreitamente relacionados de acordo com a seqüência da região ITS do gene rRNA..... 60

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1. Altura das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].....20
- Figura 2.2. Diâmetro do caule das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].....22
- Figura 2.3. Matéria seca da parte aérea das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].....24
- Figura 2.4. Matéria seca radicular das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].....26
- Figura 2.5. Matéria seca total das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de

avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].	27
Figura 2.6. Comprimento radicular total das mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].	29
Figura 2.7. Relação entre a matéria seca do sistema radicular e da parte aérea de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].	31
Figura 2.8. Acúmulo de P total na parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].	33
Figura 2.9. Teor de P na parte aérea das mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições por tratamento [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].	35
Figura 3.1. Aspecto geral do dispositivo de síntese micorrízica in vitro, mostrando o micélio do fungo crescendo sobre raízes de <i>Eucalyptus dunnii</i> .	46

Figura 3.2. Raízes de *Eucalyptus dunnii* cultivadas sob condições axênicas. (a) raiz não colonizada coberta pelo micélio do isolado SA9 e (b) sua secção transversal. (c) Ectomicorriza formada pelo isolado UFSC-Pt132 e a respectiva (d) secção transversal. (e) Aspecto geral da ectomicorriza formada pelo isolado UFSC-Ch163 e (f) secção transversal da mesma micorriza. (g) Ectomicorriza formada pelo isolado UFSC-Pt188 e (h) sua secção transversal. **M** = Manto; **RH** = rede de Hartig.....47

Figura 3.3. Secções transversais de ectomicorizas de *Eucalyptus dunnii* em detalhes. (a) Raiz de *E. dunnii* inoculada com o isolado SA9 e não colonizada, sem manto e rede de Hartig aparentes e (b) com pêlos radiculares. (c) Detalhe do manto e (d) rede de Hartig formados pelo isolado UFSC-Pt132. (e) Manto, rede de Hartig, hifas extra-matriciais e (f) fíbulas de ectomicorriza formada pelo isolado UFSC-Ch163. (g) Manto e (g, e) rede de Hartig formados pelo isolado UFSC-Pt188. P = pêlos radiculares; M = manto; RH = rede de Hartig; HE = hifas extra-matriciais; F = fíbula .....50

Figura 4.1. Seqüência de nucleotídeos da região ITS do fungo ectomicorrízico *Chondrogaster angustisporus*, isolado UFSC-Ch163, gerada pelo software Seqman, DNASTAR. A região sublinhada representa a porção do gene rRNA que codifica para a subunidade 5,8S do RNA ribossômico. Região ITS1: 1 – 238; 5,8S: 239 – 399; região ITS2: 400 – 610..... 58

Figura 4.2. Dendrograma baseado na seqüência da região ITS de *Chondrogaster angustisporus* isolado UFSC-Ch163 obtido com o programa Clustal DNASTAR. As seqüências de outras espécies foram obtidas junto ao GenBank - National Center of Biotechnology Information (NCBI). .....59

## RESUMO

Inúmeros estudos já foram desenvolvidos para selecionar fungos ectomicorrízicos (fECM) eficientes para inoculação de plantas de interesse silvicultural. A maioria deles analisou o efeito da inoculação individual dos fungos sobre o crescimento das plantas. Embora importantes para o desenvolvimento de inoculantes e técnicas de inoculação, estes não reproduzem fielmente as condições naturais. Sabe-se que a ocorrência simultânea de vários fECM na mesma planta pode contribuir para maiores benefícios através de diferentes mecanismos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de testar o efeito da inoculação de diferentes fECM, individualmente ou em combinações, na absorção de fósforo e promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus dunnii*. Para isso, foram conduzidos estudos envolvendo os seguintes aspectos: efeito da inoculação de isolados de fECM, aplicados individualmente e em mistura, no crescimento de *E. dunnii* sob condições de casa de vegetação; caracterização anatômica e morfológica (morfotipagem) das micorrizas formadas axenicamente por cada isolado nas raízes dessa planta; e seqüenciamento da região ITS do gene rRNA do isolado de *Chondrogaster angustisporus*, UFSC-Ch163. Em casa de vegetação, utilizando-se substrato esterilizado, verificou-se que a inoculação das plantas com maior número de isolados de fECM promoveu maior absorção de P e maior crescimento do que o tratamento sem inoculação e aqueles envolvendo apenas um isolado, notando-se maior eficiência nas combinações que envolviam o isolado UFSC-Pt188, *Pisolithus microcarpus*. A inoculação individual das mudas com o isolado UFSC-Pt132 não teve efeito sobre as variáveis analisadas. Na síntese micorrízica *in vitro*, apenas três isolados formaram micorrizas: UFSC-Pt132, UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188. O isolado SA9 (*Scleroderma flavidum*) não formou micorrizas detectáveis. As micorrizas dos isolados UFSC-Pt132 e UFSC-Pt188, da espécie *Pisolithus microcarpus*, apresentaram as mesmas características morfológicas e anatômicas, não sendo possível a distinção entre eles através da morfotipagem. As micorrizas formadas pelo isolado UFSC-Ch163 (*Chondrogaster angustisporus*), porém, foram bastante distintas. Quando a seqüência da região ITS do gene rRNA de *C. angustisporus* UFSC-Ch163 foi analisada em conjunto com as dez mais similares obtidas no NCBI Genbank, esse isolado formou um agrupamento separado com um fECM não identificado e não cultivado, oriundo do arquipélago das Seychelles. A porcentagem de similaridade entre a seqüência de *C. angustisporus* e as dos dez fungos ectomicorrízicos mais similares, disponíveis no NCBI, variou de 82 a 100 %, demonstrando uma afinidade significativa com espécies dos gêneros *Gloeocantharellus*, *Ramaria*, *Gautieria*, *Gomphus*, *Hysterangium* e *Sphaerobolus*, reforçando a recente proposta que classifica o gênero *Chondrogaster* na subclasse Phallomycetidae, formada pelo agrupamento das ordens Gomphales e Phallales, com base nas seqüências dos genes nuc-LSU-rRNA e mt-SSU-rRNA e de proteínas.

**Palavras-chave:** Competitividade, Eficiência, Morfotipagem, Seqüenciamento, ITS

## ABSTRACT

Several studies have been performed to select efficient ectomycorrhizal fungi (ECMf) to be employed on inoculation programmes in forest nurseries. The majority of them has analyzed the effect of single isolates on plant growth. Although these studies have been very important for developing techniques of inoculum production and of inoculation, they do not represent the real situation found in natural conditions where roots are simultaneously colonized by different fungi and may take advantage of several beneficial mechanisms. In this context, the main objective of this work was to evaluate the effect of the inoculation of *Eucalyptus dunnii* seedlings with different ectomycorrhizal isolates, applied individually or in combination, on phosphorus (P) uptake and plant growth. Studies were then performed involving the following aspects: effect of the inoculation of plants with ECM isolates, applied individually and in mixture on growth of *E. dunnii* seedlings growing in a sterilized substrate in greenhouse conditions; morphotyping of ectomycorrhizas formed by these isolates on roots of *E. dunnii* under aseptical conditions in growth chamber; and sequencing of the ITS region of the rRNA gene of the isolate UFSC-Ch163 (*Chondrogaster angustisporus*). In greenhouse, it was observed that the plants inoculated with several isolates presented a higher content of P in their shoots, higher height and higher dry matter content than plants inoculated with single isolates and the uninoculated plants. This was particularly the case when the inoculum contained the isolate UFSC-Pt188, *Pisolithus microcarpus*. On the other hand, the single inoculation of seedlings with the isolate UFSC-Pt132, also a *P. microcarpus*, had no effect on these variables. After five weeks in growth chamber, plants aseptically growing in presence of ectomycorrhizal isolates formed mycorrhizas with only three of them, UFSC-Pt132, UFSC-Ch163 and UFSC-Pt188. Isolate SA9 (*Scleroderma flavidum*), did not promoted any detectable colonization. Mycorrhizas formed by the isolates UFSC-Pt132 and UFSC-Pt188, both of the species *Pisolithus microcarpus*, presented the same morphological and anatomical characteristics indicating that morphotyping is not a convenient technique to differentiate them when associated to eucalypt roots. Mycorrhizas formed by the isolate UFSC-Ch163 (*Chondrogaster angustisporus*) were of a quite different morphotype. The sequence of the ITS region of the rRNA gene of *C. angustisporus* UFSC-Ch163 showed 100 % similarity with a unidentified and uncultivated ECMf from Seychelles available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank. The nucleotide sequence similarity among this isolate and NCBI sequences ranged from 82 to 100 % for both regions. Its similarity with those obtained from species of other putative ECMf of the genera *Gloeocantharellus*, *Ramaria*, *Gautieria*, *Gomphus*, *Hysterangium* and *Sphaerobolus* supports the recent proposal that places *Chondrogaster* in the new subclass Phallomycetidae formed by the gomphoid-phalloid group, based in the sequences of the genes nuc-LSU-rRNA and mt-SSU-rRNA and of proteins.

**Key words:** Competitiveness, Efficiency, Morphotyping, Sequencing, ITS

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

∅	diâmetro
µg	micrograma(s)
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
µg.mL <sup>-1</sup>	microgramas por mililitro
®	marca registrada
ATP	adenosina trifosfato
B	boro
BAM	bactérias auxiliaadoras da micorrização
BOD	demanda bioquímica de oxigênio
°C	grau(s) Celsius
cf.	confronte, compare
cm	centímetro(s)
cm.planta <sup>-1</sup>	centímetro(s) por planta
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
Cu	cobre
dNTP	desoxirribonucleotídeos
Fe	ferro
fECM	fungo(s) ectomicorrízico(s)
g	grama(s)
g.L <sup>-1</sup>	grama(s) por litro
g.planta <sup>-1</sup>	grama(s) por planta
h	hora(s)
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
K	potássio
L	litro(s)
M	molar
m	metro(s)
Mg	magnésio
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)

mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	minimolar
MNM	meio Melin-Norkrans modificado
Mn	manganês
Mo	molibdênio
N	nitrogênio
ng	nanograma(s)
nm	nanômetro(s)
P	fósforo
$p \leq$	probabilidade menor ou igual
pb	pares de base
P-B	solução de molibdato de amônio
P-C	solução de ácido-1-amino-2-naftol-sulfônico
PCBs	bifenis policlorinados
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	polietileno glicol
planta <sup>-1</sup>	por planta
POPs	poluentes orgânicos persistentes
PVC	policloreto de vinila
PVLG	álcool polivinílico ao lactoglicerol
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rpm	rotações por minuto
s	segundo(s)
UV	Ultravioleta
V:V	volume por volume
Zn	Zinco



## INTRODUÇÃO

Diversos fungos podem estabelecer simbioses mutualísticas com plantas, formando estruturas denominadas micorrizas. Este termo (do grego *mykes* = fungo e *rhiza* = raiz) foi proposto por Frank em 1885, quando observou que essas associações não constituíam casos de parasitismo entre o fungo e a planta, mas que resultavam em benefícios para ambos.

Nessas associações, os fungos micorrízicos aumentam a captura de vários nutrientes do solo e sua translocação à planta hospedeira. A distribuição difusa do micélio no solo ao redor das raízes, alcançando distâncias maiores do que as atingidas pela raiz não colonizada, proporciona uma maior capacidade de absorção de nutrientes, principalmente de fósforo (P), nitrogênio (N) e potássio (K). Além disso, as mudanças na arquitetura radicular, com maior intensidade de ramificação, aumentam a superfície de contato com o solo. As raízes colonizadas possuem maior longevidade, e uma maior resistência a patógenos, a elementos tóxicos presentes no solo e a condições extremas de temperatura, acidez e umidade.

Ao se associarem com as raízes, os fungos ficam protegidos da intensa competição microbiana da rizosfera, além de se beneficiarem de vários compostos produzidos pela planta hospedeira, como carboidratos, aminoácidos e vitaminas. Como resultado, as plantas colonizadas apresentam maior sobrevivência e crescimento em solos com deficiência de nutrientes como N, P e K do que as plantas não colonizadas.

Dentre os diferentes tipos de micorrizas, as vesículo-arbusculares e as ectomicorrizas são consideradas as mais importantes sob o ponto de vista ecológico e econômico. As primeiras, devido ao grande número de plantas hospedeiras e, a sua ocorrência em grande parte dos ecossistemas, principalmente tropicais e subtropicais. Elas são encontradas em espécies vegetais de interesse agrônomo, para produção de alimentos e fibras. As ectomicorrizas são encontradas em plantas de interesse florestal e silvicultural, principalmente em regiões temperadas. Embora estime-se que ocorram em somente cerca de 3 % dos vegetais superiores, as ectomicorrizas são predominantes nas essências florestais mais utilizadas em silvicultura intensiva no mundo (Pinaceae, Myrtaceae e Fagaceae), envolvendo uma

grande variedade de espécies fúngicas, principalmente dos filos Ascomycota e Basidiomycota.

Vários gêneros de fungos são capazes de formar associações ectomicorrízicas, como por exemplo: *Amanita*, *Boletus*, *Chondrogaster*, *Descomyces*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lycoperdon*, *Pisolithus*, *Ramaria*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Suillus* e *Thelephora*, entre outros. Na maioria dos casos, as plantas crescendo sob condições de campo encontram-se colonizadas por diferentes fungos.

Além dos benefícios citados anteriormente, há, também, o aumento na resistência e sobrevivência dessas plantas hospedeiras em áreas contaminadas com metais ou outras substâncias tóxicas. Uma variedade de fungos ectomicorrízicos tem demonstrado capacidade de degradar cinco das principais classes dos chamados poluentes orgânicos persistentes (POPs). Entende-se que há também um benefício para o ecossistema, já que a inoculação das plantas com fungos micorrízicos pode diminuir significativamente a quantidade de fertilizantes requerida para o cultivo de vegetais.

As espécies do gênero *Eucalyptus* encontram-se entre aquelas que se beneficiam da associação ectomicorrízica. No Brasil, os eucaliptos são as essências florestais mais importantes, com cerca de 6 milhões de hectares plantados. Sua exploração é responsável por grande parte do sucesso da atividade florestal brasileira, principalmente dos setores ligados à produção de papel e celulose.

Embora seja uma atividade das mais produtivas, o cultivo do eucalipto no Brasil encontra limitações no que diz respeito à fertilidade do solo, pois é feito, geralmente, em solos pobres. Isso contribui para aumentar a importância dos fungos ectomicorrízicos (fECM).

Estudos sobre a diversidade, a dinâmica das populações de fECM e suas relações com os hospedeiros poderão contribuir para uma melhor compreensão sobre a biodiversidade da região, a seleção de fECM eficientes e o controle da micorrização.

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos por diferentes autores, em diferentes regiões, visando selecionar fungos ectomicorrízicos eficientes para inoculação de plantas de interesse silvicultural. Entretanto, todos eles tinham como objetivo avaliar o efeito individual dos isolados fúngicos na colonização e na

promoção do crescimento. Embora esses resultados sejam de grande importância para o aperfeiçoamento das técnicas de produção de inoculantes e de inoculação, as situações estudadas não representam de maneira fiel os eventos que devem ocorrer sob condições naturais de campo.

A inoculação das plantas com isolados individuais deixa de considerar as interações entre diferentes fungos ectomicorrízicos, assim como as interações destes com a microbiota do solo em geral. Tais interações são, no entanto, importantes e devem ser consideradas nas estratégias de micorrização controlada.

A ocorrência simultânea de diferentes espécies desses fungos no mesmo sistema radicular pode resultar da complementação fisiológica observada em interações sinérgicas. Essa complementação entre diferentes espécies ou isolados de fECM também pode se dar em benefício da planta hospedeira.

Assim, é importante comparar o efeito de diferentes combinações de fECM em relação ao procedimento de inoculação individual, visando explorar de maneira mais eficiente os benefícios advindos da simbiose ectomicorrízica.

A identificação de cada isolado colonizando o sistema radicular é de grande importância para a complementação de tais resultados. Métodos tradicionais de caracterização anatômica e morfológica (morfotipagem) têm sido empregados em conjunto com as modernas ferramentas de biologia molecular para o reconhecimento da espécie fúngica presente na raiz e um melhor conhecimento a respeito da comunidade micorrízica local.

Nesse âmbito, o principal objetivo deste trabalho foi o de testar o efeito da inoculação de diferentes fECM, aplicados isoladamente ou em mistura, na colonização, absorção de fósforo e promoção do crescimento de mudas de *Eucalyptus dunnii*.

Para isso, foram conduzidos estudos envolvendo os seguintes aspectos:

1. Efeito da inoculação dos isolados SA9, UFSC-Pt132, UFSC-Ch163, UFSC-Pt188, aplicados individualmente e em mistura, no crescimento de *E. dunnii* sob condições de casa de vegetação;
2. Caracterização anatômica e morfológica (morfotipagem) das micorrizas formadas por cada isolado fúngico nas raízes de *E. dunnii*;

3. Extração, amplificação e seqüenciamento da região ITS do gene rRNA do isolado UFSC-Ch163, *Chondrogaster angustisporus*, a partir do micélio obtido em cultura pura.

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estima-se que 75-80% das plantas formam associações simbióticas mutualísticas com as raízes de certas espécies de fungos (SMITH & READ, 1997). Tais associações, denominadas micorrizas, caracterizam-se pela colonização das raízes pelo fungo e pelos benefícios mútuos para ambos os simbioss, o fungo e a planta. As micorrizas teriam desempenhado um papel fundamental na colonização do ambiente terrestre pelas plantas (PIROZYNSKI & MALLOCH, 1975; PIROZYNSKI, 1981).

Quando associados às raízes, os fungos micorrízicos favorecem a absorção de vários nutrientes do solo e sua translocação à planta hospedeira. A distribuição difusa do micélio aumenta a superfície de contato das raízes com o solo, proporcionando uma maior absorção de nutrientes, principalmente de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) (SMITH & READ, 1997). Este fenômeno é particularmente importante em relação ao P, já que a maior parte deste mineral encontra-se sob formas indisponíveis aos vegetais nos solos das regiões tropicais e subtropicais (RAIJ *et al.*, 1982). Além disso, o P é pouco móvel no solo, tornando-se um dos principais fatores limitantes ao crescimento das plantas (PAUL & CLARK, 1989).

Os fungos micorrízicos também podem aumentar a absorção de nutrientes através da exsudação de compostos quelantes e da mobilização de nutrientes escassos (MARSCHNER & DELL, 1994). As raízes colonizadas possuem maior longevidade, e uma maior resistência a patógenos, a elementos tóxicos presentes no solo e a condições extremas de temperatura, acidez e umidade (ALLEN, 1991).

Em contrapartida, os fungos associados às raízes, além de se protegerem da intensa competição microbiana da rizosfera, se beneficiam de vários compostos produzidos pela planta hospedeira, como carboidratos, aminoácidos e vitaminas (SMITH & READ, 1997). Como resultado, as plantas adquirem maior biomassa e crescem melhor em solos com deficiência de nutrientes como N, K e P que as plantas não colonizadas (GARBAYE, 1990; SMITH & READ, 1997).

Além dos benefícios para a planta e para o fungo, entende-se que há, também, benefícios econômicos e ambientais, já que a colonização das plantas com fungos ectomicorrízicos pode diminuir significativamente a quantidade de fertilizantes e agroquímicos requeridos para o cultivo de vegetais (MARX, 1991; MARX *et al.*, 1992).

Dentre os vários grupos de micorrizas, as micorrizas vesículo-arbusculares e as ectomicorrizas são as mais importantes sob o ponto de vista ecológico e econômico. Este último grupo apresenta uma importância ainda maior no que diz respeito à silvicultura intensiva. Embora ocorram em apenas cerca de 3% dos vegetais superiores, as ectomicorrizas envolvem uma grande variedade de espécies fúngicas, principalmente dos filos Basidiomycota e Ascomycota, e são predominantes nas essências florestais mais utilizadas em silvicultura no mundo (espécies das famílias Pinaceae, Myrtaceae e Fagaceae) (WILCOX, 1990; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; SMITH & READ, 1997).

Estima-se que existam mais de 6 mil espécies de fungos ectomicorrízicos. Considerando-se que apenas 5% da diversidade fúngica do planeta é conhecida, com aproximadamente 80.000 espécies descritas (KIRK *et al.*, 2001), de um total estimado de 1,5 milhão de espécies (HAWKSWORTH, 1991, 1993), pode-se supor que o número de espécies de fungos ectomicorrízicos seja ainda maior.

As espécies do gênero *Eucalyptus* encontram-se entre aquelas que formam ectomicorrizas e se beneficiam dessa associação. No Brasil, os eucaliptos são as essências florestais mais importantes, com cerca de 6 milhões de hectares plantados. Sua exploração é responsável por grande parte do sucesso do setor florestal brasileiro, principalmente na obtenção de madeira para a produção de papel e celulose (EMBRAPA, 2003).

Embora seja uma atividade das mais produtivas, o cultivo do eucalipto no Brasil encontra fatores limitantes no que diz respeito à fertilidade do solo. A maioria dos solos do território nacional utilizados para plantios florestais é de baixa fertilidade (RAIJ, 1991), o que torna ainda maior a importância dos fungos ectomicorrízicos (fECM). Além disso, as mudas, tanto nos viveiros como no campo, são susceptíveis a ataques de fungos patogênicos. Por isso, há um grande interesse no uso de fungos ectomicorrízicos como agentes de controle biológico (SMITH & READ, 1997).

Algumas interações entre os microrganismos da rizosfera de uma micorriza, a micorrizosfera, são bem estudadas e apresentam exemplos importantes no que diz

respeito à saúde e crescimento das plantas. Entre elas, encontra-se a inibição, por fungos micorrízicos, de infecções das raízes. As doenças radiculares constituem um dos principais fatores limitantes à produção vegetal. Fungos do gênero *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Rhizoctonia* são conhecidos patógenos de vegetais que infectam as raízes e/ou produzem toxinas, matando a planta ou reduzindo sua capacidade de absorver água e nutrientes (GARBAYE, 1991). Quando a simbiose ainda não está estabelecida, esses patógenos apresentam certa vantagem competitiva sobre os fungos micorrízicos, devido a sua maior capacidade saprofítica, ainda que alguns fungos micorrízicos produzam compostos antibióticos que contribuem para minimizar esta desvantagem.

Quando a simbiose já se estabeleceu, os fECM passam de uma condição de desvantagem para uma situação de vantagem competitiva sobre os patógenos de raiz. Nesse momento, os fECM não mais competem pelo substrato e se tornam mais eficientes na produção de antibióticos. Além disso, os fECM passam a funcionar com uma verdadeira barreira física para os patógenos, devido à presença do manto fúngico cobrindo a raiz. Marx (1972) afirma que fECM, como *Pisolithus tinctorius*, apresentam essa capacidade protetora apenas quando o manto fúngico já está completamente formado, diferentemente de outros, como *Laccaria laccata* e *Suillus luteus*, que apresentam uma ação preventiva anterior à formação do manto, possivelmente devido à produção de antibióticos.

Existem ainda registros de efeitos protetores estimulados por um terceiro organismo de vida livre. Stack & Sinclair (1975), *apud* Garbaye (1991), observaram que as raízes de *Pseudotsuga menziesii* eram protegidas da ação de *Fusarium oxysporum* pela presença de microrganismos antagonistas ao patógeno. Esses antagonistas seriam estimulados pela presença na rizosfera do fECM *Laccaria laccata*, mesmo antes de a colonização micorrízica se estabelecer.

Alguns estudos mostram que podem haver outros benefícios indiretos às raízes hospedeiras. Marx (1972) sugere que o estabelecimento da simbiose ectomicorrízica aumenta drasticamente o conteúdo de polifenóis ou terpenos das raízes, inibindo o crescimento de patógenos radiculares. Sylvia & Sinclair (1983) e Smith & Read (1997) sugerem que a produção de compostos fenólicos pelos tecidos vegetais, em resposta à presença de fungos micorrízicos, pode ser responsável pela redução de doenças causadas por *Fusarium oxysporum* em *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies* e *Pinus sylvestris*.

Marx (1969) encontrou que os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris* reduzem o impacto do patógeno de raiz *Phytophthora cinnamomi*, quando inoculados em mudas de *Pinus* spp. Para esse autor, a rede de Hartig bloqueia o avanço do patógeno para o interior da raiz, funcionando como uma barreira mecânica. Além disso, outros mecanismos de inibição de patógenos podem estar envolvidos.

Há vários registros da produção de antibióticos por fungos ectomicorrízicos. Kope & Fortin (1990) sugerem que há uma proteção fornecida pela colonização ectomicorrízica das raízes com a produção de antibióticos por parte de fungos ectomicorrízicos. Num estudo de seleção dos fungos ectomicorrízicos, esses autores encontraram que metabólitos excretados pelo fungo produziram uma mudança na morfologia das hifas de outros fungos na rizosfera. Mais especificamente, *Pisolithus tinctorius* produziu metabólitos que causaram lise de hifas e outras mudanças morfológicas que indicaram uma disfunção celular em alguns fitopatógenos. Essa inibição de um fitopatógeno por um fungo ectomicorrízico, pode servir como uma ferramenta poderosa no controle biológico de doenças de plantas.

Além disso, a produção de antibióticos por fungos ectomicorrízicos pode ser de fundamental importância no que diz respeito à persistência da espécie no ambiente. Para um fungo ectomicorrízico permanecer competitivo em um ambiente continuamente em mudança, como é aquele em torno da raiz do hospedeiro, são necessários diversos mecanismos de sobrevivência, incluindo a produção de antibióticos. Por sua vez, tal habilidade pode ser importante no estabelecimento da simbiose, considerando-se que muitos organismos de vida livre são antagonistas de fungos micorrízicos durante o seu crescimento sobre a superfície da raiz, na fase que antecede a colonização pelo fungo.

Alguns trabalhos têm mostrado que quando estão em abundância na rizosfera, alguns microrganismos podem inibir drasticamente a colonização micorrízica e, conseqüentemente, o crescimento das plantas (KEAST & TONKIN, 1983). Muitas espécies de bactérias e fungos como *Trichoderma* spp. são parasitas de fungos ectomicorrízicos (SUMMERBELL, 1989), enquanto que outros microorganismos, como protozoários e nematóides, se alimentam do micélio desses fungos. Além disso, bactérias e fungos freqüentemente produzem substâncias tóxicas (antibióticos), ou competem com fungos micorrízicos por exsudatos das raízes requeridos para o estabelecimento da simbiose (BRIAN *et al.*, 1945).



Outras espécies bacterianas, porém, podem beneficiar essa relação simbiótica. É o caso das bactérias auxiliaadoras da micorrização (BAM), assim denominadas por Garbaye & Bowen (1989). Segundo Oliveira & Garbaye (1989), entre os mecanismos que podem influenciar o estabelecimento da simbiose estão a produção de substratos carbonados que podem ser utilizados pelo fECM como fonte de carbono, ou de fatores de crescimento (hormônios, vitaminas e aminoácidos), a detoxificação do ambiente, a mineralização de compostos orgânicos complexos e a liberação de nutrientes aos simbiossitos, ou, ainda, a produção de enzimas celulolíticas que facilitam a penetração do fungo na raiz.

Num estudo recente, Aspray *et al.* (2007) verificaram que um dos mecanismos de ação de certas bactérias do solo, *Paenibacillus* sp. e *Burkholderia* sp., consistia na modificação da arquitetura radicular, aumentando a intensidade de dicotomia das raízes curtas. Como já mencionado, a maior ramificação do sistema radicular contribui para o aumento da interface raiz-solo e, por conseguinte, para um maior potencial de captação de nutrientes e água.

Desse modo, essas bactérias podem contribuir para o sucesso da colonização micorrízica, melhorando as condições de sobrevivência das plantas hospedeiras em seu ambiente.

Além dos benefícios proporcionados às plantas pelas ectomicorrizas, citados anteriormente, há o aumento na resistência e sobrevivência dessas plantas hospedeiras em áreas contaminadas com metais ou outras substâncias tóxicas. Uma variedade de fECM já foi estudada e muitos dos isolados mostraram capacidade de degradar cinco das principais classes dos chamados poluentes orgânicos persistentes (POPs). Donnelly e Fletcher (1995) encontraram que 14 dos 21 fECM estudados por eles apresentavam capacidade para degradar bifenis policlorinados (PCBs), um resíduo da indústria de lubrificantes com alta persistência no ambiente ao se ligar a partículas do solo. Algumas espécies mostram-se capazes de degradar diclorofenol e trinitrotolueno, outros poluentes orgânicos (MEHARG *et al.*, 1997a e 1997b).

Embora a degradação desses poluentes por fECM seja, em geral, menos eficiente que aquela promovida por fungos saprófitas, como os fungos da podridão branca (GRAMSS *et al.*, 1999), existem alguns fatores que devem ser considerados, como por exemplo, a velocidade relativa de crescimento dos fungos e a persistência destes no solo. Neste sentido, os fECM mostram-se promissores, pois muitos podem

persistir no solo por muitos anos, podendo auxiliar no estabelecimento de novas espécies em áreas sujeitas a essas condições adversas. Assim, as associações ectomicorrízicas podem ser úteis na recuperação de áreas degradadas, tornando as plantas hospedeiras mais aptas a colonizar áreas poluídas (CAIRNEY *et al.*, 2000).

Embora presentes em muitos ecossistemas florestais, as diferentes espécies ou isolados de fECM variam em sua capacidade de promover benefícios a seu hospedeiro (MARX & CORDELL, 1989). Por essa razão, Garbaye (1984) aconselha a adoção de um programa de controle da micorrização, através do qual as plantas seriam inoculadas com fungos previamente testados quanto a sua infectividade e eficiência na promoção do crescimento da planta. Tal programa visa assegurar a colonização micorrízica e o bom desempenho das plantas, em solos com baixos teores de nutrientes ou com outras condições adversas. Essa prática surge como uma alternativa ao uso de fertilizantes, podendo contribuir para diminuir os custos de produção e a poluição do meio ambiente (GARBAYE, 1990).

Com o objetivo de selecionar fungos ectomicorrízicos eficientes para o controle da micorrização de *Eucalyptus dunnii* no Brasil, Souza (2003) encontrou que, embora vários fECM fossem capazes de colonizar as raízes dessa planta, alguns apresentaram maior agressividade na colonização radicular. Dos isolados testados, alguns foram mais eficientes na promoção do crescimento da parte aérea das plantas enquanto outros foram mais eficientes na absorção de fósforo (SOUZA *et al.*, 2004). Pode-se, portanto, perceber que a introdução de isolados capazes de beneficiar diferentes funções da planta hospedeira poderia permitir explorar ainda mais os benefícios advindos dessa simbiose, com resultados significativos na produtividade das plantações.

Embora diversos autores tenham feito estudos visando a seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para inoculação de plantas de interesse silvicultural (GARBAYE, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 1994; SOUZA, 2003; SOUZA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006), todos eles limitaram-se a avaliar o efeito individual dos isolados fúngicos na colonização e na promoção do crescimento vegetal. Tais resultados são de grande importância no que diz respeito ao aperfeiçoamento das técnicas de micorrização controlada, mas as situações estudadas não representam de maneira fiel o que ocorre no solo sob condições naturais. Esses resultados aplicam-se perfeitamente às condições de viveiro (produção de mudas) onde os substratos de plantas são desinfetados e permitem a introdução de isolados de

fECM selecionados. Entretanto, uma vez no solo das plantações, não se sabe qual será o comportamento do fungo introduzido frente aos outros fECM naturalmente presentes no local.

As interações entre fungos ectomicorrízicos, assim como as interações microbianas em geral, são também importantes e devem ser consideradas nas estratégias de micorrização controlada. Estas podem ser naturalmente negativas ou positivas. Em alguns casos, podem envolver a produção de substâncias químicas inibidoras. Pesquisas realizadas com um isolado de *Cenococcum geophilum*, que produzia compostos antifúngicos com atividade inibitória contra diversos outros fungos filamentosos, indicaram que essa atividade seria responsável pelas freqüentes interações negativas observadas entre *C. geophilum* e outras espécies de fungos ectomicorrízicos (KRYWOLAP, 1964, *apud* KOIDE *et al.*, 2004).

Mas interações positivas entre fungos ectomicorrízicos também têm sido observadas. A ocorrência simultânea de diferentes espécies desses fungos pode resultar da complementação fisiológica observada em interações de cooperação. Por exemplo, uma espécie pode secretar enzimas que lhe permitam ser superior na aquisição do nitrogênio (N) de fontes orgânicas, enquanto outras podem secretar enzimas que lhe permitam ser mais eficiente na aquisição de fósforo (P). Vivendo em associação próxima, ambas as espécies podem adquirir o N e o P necessários a seu crescimento e melhorar seu desempenho (KOIDE *et al.*, 2004).

Essa complementação entre diferentes espécies ou isolados de fECM também pode se dar em benefício da planta hospedeira. Souza (2003) observou que, enquanto alguns isolados de fECM contribuíam para uma maior acumulação de biomassa na parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii*, outros promoviam uma maior acumulação de fósforo.

Assim, é importante comparar o efeito de diferentes combinações de fECM em relação ao procedimento de inoculação individual, visando explorar de maneira mais eficiente os benefícios advindos da simbiose ectomicorrízica.

Nesse contexto, a identificação dos diferentes fungos presentes no sistema radicular das plantas é de grande importância, de modo a confirmar a participação de cada isolado nos efeitos sobre as variáveis estudadas. A caracterização anatômica e morfológica (morfotipagem) das ectomicorrizas constitui a forma clássica para distinguir as raízes colonizadas (CHILVERS, 1968; AGERER, 1994),

separando tipos de ectomicorrizas com base em características morfológicas e anatômicas e assumindo que cada tipo (morfortipo) coincide com uma espécie ou grupos de espécies.

Além disso, técnicas mais recentes, utilizando ferramentas de biologia molecular, têm sido empregadas para a identificação de fungos ectomicorrízicos, quando estes já se encontram associados ao sistema radicular hospedeiro, independentemente de variação ambiental (EGGER, 1995). Essa identificação pode ser feita através da análise de polimorfismo (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) ou do seqüenciamento de certas regiões do DNA que tenham sido amplificadas pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (GARDES & BRUNS, 1993). Para amplificação por PCR, têm sido escolhidas regiões do DNA de caráter altamente conservado, mas que ainda apresentam certa variabilidade entre as espécies, como é o caso do espaçador interno ITS presente no gene rRNA (RNA ribossômico). Diversos *primers* têm sido desenvolvidos para amplificar essa região do DNA que se mostra como uma ferramenta útil para estudos taxonômicos e filogenéticos (WHITE *et al.*, 1990; MARTIN & RYGIWICZ, 2005).

A aplicação dessas diferentes estratégias possibilitará o reconhecimento dos simbiontes e fornecerá importantes subsídios aos estudos aplicados sobre a associação micorrízica.

## CAPÍTULO 2

### **CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Eucalyptus dunnii* INOCULADAS COM ISOLADOS DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS, INDIVIDUALMENTE OU EM MISTURA, SOB CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

Os benefícios advindos da associação micorrízica estão bem documentados na literatura. Vários autores afirmam que plantas inoculadas com fungos ectomicorrízicos na fase de viveiro apresentam maior taxa de sobrevivência, resistência a doenças e a estresses ambientais e maior crescimento quando transplantadas para o campo (MOLINA & TRAPPE, 1984; SMITH & READ, 1997; MARX & CORDELL, 1989). No entanto, a inoculação com uma espécie de fungo ectomicorrízico não representa de forma mais adequada as condições naturais, onde encontram-se várias espécies de fungos ectomicorrízicos e outros microrganismos.

Do ponto de vista da promoção do crescimento vegetal, muitas interações positivas entre microrganismos têm sido observadas (KOIDE *et al.*, 2004). Deste modo, os fungos ectomicorrízicos que coexistem num mesmo ambiente devem apresentar interações, sejam elas positivas ou negativas. É importante conhecer tais interações, já que a introdução de isolados, atuando sobre a planta através de diferentes mecanismos, pode aumentar ainda mais os benefícios advindos dessa simbiose, revelando possíveis efeitos sinérgicos entre eles no que diz respeito à promoção do crescimento vegetal. Assim, é importante testar os efeitos da inoculação mista de isolados de fECM, e compará-los à inoculação individual desses fungos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Isolados fúngicos utilizados

Foram estudados isolados da coleção de fECM do Laboratório de Ectomicorrizas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Quadro 2.1). Esses isolados foram escolhidos com base nos resultados de SOUZA (2003) e SOUZA *et al.* (2004), por apresentarem eficiência na promoção do crescimento das mudas de *Eucalyptus dunnii*. As culturas puras desses fungos foram originalmente obtidas de carpóforos coletados em plantações de *Eucalyptus* spp. e são mantidas através de repicagens periódicas para meio de cultura Melin-Norkrans Modificado sólido (MNM) (MARX, 1969), em placas de Petri, em incubadora do tipo B.O.D. a  $25 \pm 1$  °C.

Cada isolado foi repicado a partir das culturas da coleção para meio de mesma composição (placas-matrizes), sob condições assépticas em capela de fluxo laminar. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C em incubadora tipo B.O.D. até o momento da utilização das culturas, cerca de 20 dias após.

Quadro 2.1. Isolados de fungos ectomicorrízicos da coleção da UFSC utilizados nesse estudo

Isolado	Espécie	Hospedeiro
SA 9	<i>Scleroderma flavidum</i> E. et. E.	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.
UFSC-Pt132	<i>Pisolithus microcarpus</i> (Cooke & Masee) Cunn.	<i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden
UFSC-Ch163	<i>Chondrogaster angustisporus</i> Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira	<i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden
UFSC-Pt188	<i>Pisolithus microcarpus</i> (Cooke & Masee) Cunn.	<i>Eucalyptus</i> sp.

### 2.2.2 Produção do inóculo fúngico

Para a produção do inóculo fúngico a ser usado na inoculação das plantas, culturas em meio MNM, com 20 dias de idade foram utilizadas para obtenção de discos de meio (8 mm de diâmetro) contendo micélio a partir da extremidade das

colônias. Esses discos foram colocados em meio fresco MNM sólido, em placas de Petri, para ser testados quanto à viabilidade e ausência de contaminações. Após 2-3 dias, quando o micélio voltou a crescer nas bordas dos discos e nenhuma contaminação foi observada, os discos de micélio foram colocados em 25 mL de MNM líquido em frascos tipo erlenmeyer, de 250 mL de capacidade, seguindo-se de incubação a  $25 \pm 1$  °C durante 20 dias em incubadora B.O.D.

Após esse período, o micélio produzido foi fragmentado em liquidificador esterilizado durante 5 s a 3600 rpm, sob condições assépticas de fluxo laminar, e a suspensão miceliana assim obtida foi utilizada para inocular 300 mL de substrato sólido constituído de uma mistura de turfa, vermiculita, na proporção de 1:4 (V:V), e 200 mL de meio MNM líquido, em frascos tipo conserva de 900 mL. Essa mistura tinha sido previamente submetida a dois ciclos de esterilização em autoclave a 121 °C. O primeiro durante 60 min, antes da adição do meio de cultura, e o segundo durante 20 min, após a adição de meio.

Os frascos foram mantidos em B.O.D. a  $25 \pm 1$  °C, na ausência de luz, durante cerca de 2 meses, até que toda a parte visível do substrato apresentasse colonização miceliana.

### 2.2.3 Preparo do substrato de plantio

O substrato de plantio, constituído por turfa e vermiculita, na proporção de 1:3 (V:V), foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 60 min. A esse substrato adicionou-se uma solução nutritiva contendo os seguintes elementos (mg por planta): K, 16; Mn, 0,15; Mg, 3; Zn, 0,0375; Cu, 0,125; Mo, 0,05; B, 0,05; e Fe, 0,375 (BOUGHER *et al.*, 1990). A fonte de nitrogênio, nitrato de amônia ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), foi aplicada em 5 parcelas ao longo do experimento, de modo a obter 35 mg por planta, tendo a primeira sido aplicada aos 15 dias após o plantio.

O fósforo (P) foi adicionado na forma de  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$  e administrado em solução na dose de 0,5 mg de P por planta, de acordo com recomendação de Souza (2003).

### 2.2.4 Germinação das sementes

As sementes de *E. dunnii*, fornecidas pela empresa RIGESA, Três Barras - SC, foram desinfetadas em álcool 70 % por 1 minuto, lavadas em água destilada e

esterilizada por três vezes consecutivas, e então transferidas para uma solução de germinação de ácido bórico ( $3 \mu\text{M}$ ), glicose ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e sulfato de cálcio ( $500 \mu\text{M}$ ), esterilizada, com pH 5,7. Esses procedimentos foram feitos sob condições assépticas de capela de fluxo laminar. As sementes foram deixadas nessa solução durante 3 dias, à temperatura ambiente, sob agitação constante.

#### 2.2.5 Inoculação e condução do experimento

Após 2 meses de crescimento o inóculo fúngico (micélio + substrato sólido) foi retirado dos frascos e lavado com água destilada estéril (ALVES *et al.*, 2001). Em seguida, o inóculo de cada isolado foi adicionado ao substrato de plantio, individualmente ou em mistura. Neste último caso, combinou-se o inóculo dos diferentes isolados, de modo a obter combinações com dois isolados, três e, finalmente, quatro, conforme mostrado no quadro 2.2. Também foi preparado um tratamento testemunha não inoculado. Para efeito de melhor visualização os tratamentos serão exibidos sem o código UFSC e as letras que o precedem. Por exemplo: UFSC-Ch163 será tratado como isolado 163.

A inoculação foi feita antes da semeadura, adicionando-se 10 % do inoculante, de cada fungo ou das misturas, ao substrato de plantio, totalizando 6 mL por tubete. Foi feita uma homogeneização manual do inoculante sob condições assépticas. O tratamento testemunha recebeu a mesma quantidade de turfa-vermiculita-MNM não inoculada, produzida e submetida às mesmas condições de incubação que o inoculante.

O substrato foi distribuído em tubetes cônicos de PVC de 60 mL, previamente desinfetados com hipoclorito de sódio (1 %), durante 24 horas e lavados em água destilada. Os tubetes foram, então, distribuídos em bandejas de poliestireno e cada um deles recebeu 4-5 plântulas depositadas a aproximadamente 1 cm de profundidade. Em seguida, o substrato foi umedecido com água destilada esterilizada. Após a inoculação e o plantio, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e regadas diariamente com água destilada esterilizada. Para cada tratamento, foram estabelecidas 15 plantas. Após uma semana, foi feito o desbaste deixando-se apenas uma planta por tubete.



Quadro 2.2. Esquema dos diferentes tratamentos de inoculação de mudas de *Eucalyptus dunnii* por fungos ectomicorrízicos

<b>Tratamentos</b>	
Testemunha (não inoculada)	132 + 163
SA9	132 + 188
132 (UFSC-Pt132)	163 + 188
163 (UFSC-Ch163)	SA9 + 132 + 163
188 (UFSC-Pt188)	SA9 + 132 + 188
SA9 + 132	SA9 + 163 + 188
SA9 + 163	132 + 163 + 188
SA9 + 188	SA9 + 132 + 163 + 188

#### 2.2.6 Avaliação dos resultados

O estudo completo teve duração de três meses em casa de vegetação. Durante esse período, amostras de cinco plantas de cada tratamento foram coletadas a cada 30 dias e analisadas quanto aos seguintes aspectos: altura, peso de matéria seca, diâmetro do caule, colonização radicular, porcentagem e acúmulo de P, comprimento radicular e relação raiz/parte aérea.

As raízes foram imersas em um becker com água durante alguns segundos, para facilitar a separação do substrato de plantio, e então lavadas cuidadosamente em água corrente. A parte aérea foi separada do sistema radicular e colocada em estufa a  $70 \pm 1$  °C para determinação do peso da matéria seca.

O sistema radicular de cada planta foi dividido em duas amostras e em cada amostra as raízes foram cortadas em seções de cerca de 2 cm. Determinou-se o peso de matéria fresca das duas amostras e uma delas, com peso em torno de 0,1 g, foi destinada à avaliação da colonização micorrízica, sendo conservada em solução salina sob refrigeração por no máximo 12 horas. A outra amostra foi secada em estufa a  $70 \pm 1$  °C, juntamente com a parte aérea, para determinação do peso da matéria seca. Com esse procedimento, pôde-se, mais tarde, determinar o peso de matéria seca total do sistema radicular.

A infectividade dos isolados foi avaliada pela determinação da porcentagem de colonização radicular, de acordo com a técnica das intersecções de Giovanetti & Mosse (1980), modificada por Brundrett *et al.* (1996).

Para determinação do teor de P nos tecidos das plantas, empregou-se a técnica descrita por Tedesco *et al.* (1995), utilizando-se, para isso, a parte aérea moída em moinho com lâminas de aço inoxidável. Do material moído, foram separadas amostras de 0,200 g que foram misturadas a 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %), 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e 0,7 g da mistura de digestão, contendo 100 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O e 1 g de selênio. A digestão foi realizada em bloco digestor a 180 °C, até a completa evaporação da água. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 380 °C, sendo mantida por mais 1 h após o extrato atingir uma coloração amarelo-esverdeada.

Após digestão e resfriamento adicionou-se, então, um pouco de água destilada para evitar a solidificação da amostra. Posteriormente, completou-se o volume para 50 mL com adição de água destilada. Em seguida, as soluções foram agitadas com ar comprimido e os extratos foram decantados durante 24 hs, antes de se retirarem as alíquotas para a análise.

Alíquotas de 1 mL de cada extrato, juntamente com 2 mL de água destilada, 3 mL da solução P-B e 3 gotas da solução P-C (ANEXOS 1 e 2 respectivamente), foram transferidas para copos plásticos descartáveis e submetidos à agitação manual. Após 20 min de descanso da mistura, determinou-se a absorbância de cada amostra em comprimento de onda de 660 nm, em espectrofotômetro marca Jenway<sup>®</sup>, modelo 6100. Os valores obtidos foram corrigidos pelos valores das provas em branco e, em seguida, determinaram-se os teores de fósforo. Para isso, utilizou-se a equação de regressão de uma curva padrão de fósforo, obtida com o emprego de soluções com teores de P conhecidos (P: 0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,5 e 5,0 µg.mL<sup>-1</sup>). O conteúdo de P das amostras (µg.mL<sup>-1</sup>) foi transformado em porcentagem de P e acúmulo de P na parte aérea (µg por planta).

Os resultados de teor e acúmulo de P na parte aérea das plantas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o programa StatGraphics Plus<sup>®</sup>.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se as onze variáveis estudadas neste trabalho, verificou-se que em seis delas foram apresentadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos de inoculação, considerando-se todo o período experimental. As variáveis com maiores efeitos significativos foram altura, matéria seca (parte aérea, raiz e total) e acúmulo de P (Figuras 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.8; Tabelas 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.8).

Os efeitos positivos da inoculação foram particularmente maiores nos tratamentos onde ocorreu a inoculação simultânea de vários isolados quando comparados à inoculação de isolados individuais e à testemunha, não inoculada.

No caso da altura das plantas, dois tratamentos se destacaram dos demais, considerando-se a média ao final dos 3 meses do experimento (Figura 2.1). As plantas inoculadas com a mistura de todos os isolados (SA9+132+163+188), juntamente com as plantas inoculadas com a mistura dos isolados SA9+188, foram aquelas que apresentaram os maiores valores de altura, com diferenças de aproximadamente 18 % em relação às plantas do tratamento testemunha não inoculadas. Um grupo intermediário com 13 tratamentos veio logo em seguida, com valores mais baixos que os dois primeiros, porém com altura média maior que aquela apresentada pelas plantas inoculadas com o isolado 132, que foram aquelas com os menores valores de altura.

O aumento nos valores de altura ao longo dos três meses de experimento (Tabela 2.1) não foi regular, sendo mais intenso no primeiro e no segundo mês e menor no terceiro, para todos os tratamentos. A média de altura, considerando-se todos os tratamentos, aumentou de  $9,73 \text{ cm.planta}^{-1}$ , no primeiro mês, para  $20,15 \text{ cm.planta}^{-1}$ , no segundo, um aumento de 120 %. Do segundo para o terceiro mês, porém, o aumento foi de apenas 15 %.

Esse efeito deve estar relacionado à redução na quantidade dos nutrientes disponíveis, o que explicaria uma maior velocidade de crescimento no início do cultivo e a redução desta ao longo do período. Além disso, no final do terceiro mês, o espaço físico do tubete disponível para o sistema radicular começa a se tornar um fator limitante ao crescimento.

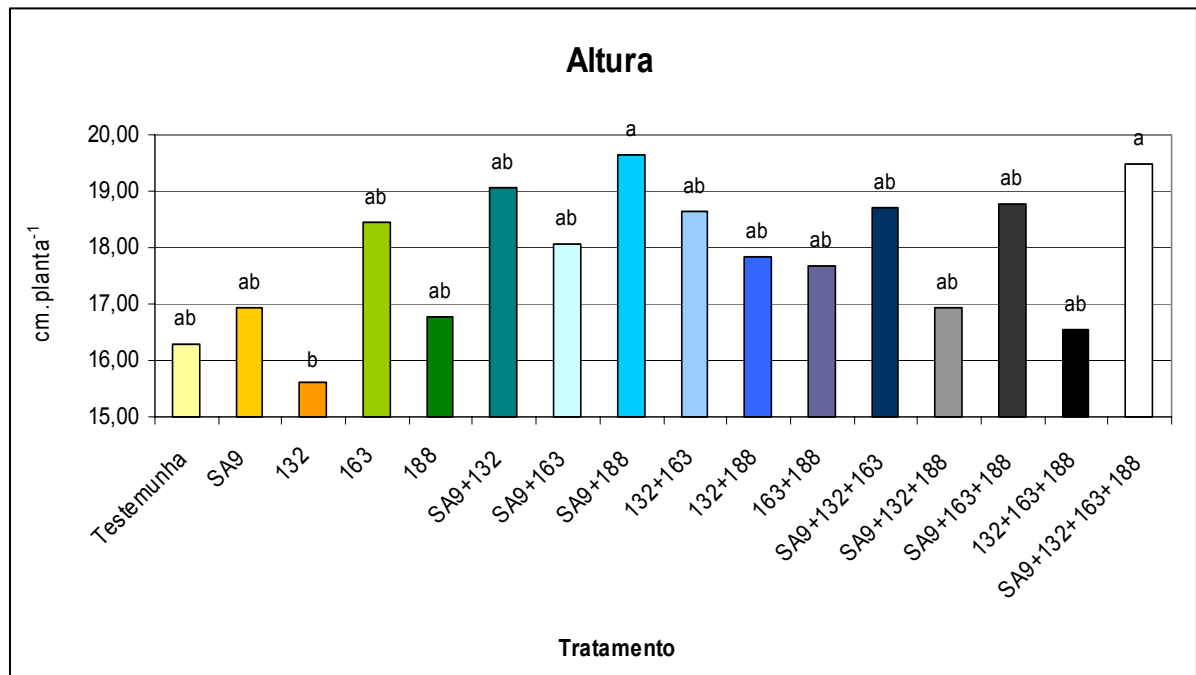


Figura 2.1. Altura das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

A análise isolada dos valores de cada mês (Tabela 2.1) revela que diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos de inoculação surgiram apenas no segundo mês, com destaque para as plantas inoculadas com a mistura dos isolados SA9+132+163, que apresentaram os maiores valores de altura, e para as plantas inoculadas com o isolado 132, aplicado individualmente, que apresentaram os menores valores. Para este último tratamento, o efeito negativo sobre a altura das plantas também foi verificado no terceiro mês.

Embora as diferenças estatísticas realcem apenas os dois tratamentos citados com os maiores valores de altura, notou-se uma tendência de aumento desses valores nos tratamentos envolvendo maior número de isolados, como pode ser observado na figura 2.1.

Tabela 2.1. Altura média de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamentos	Altura (cm.planta <sup>-1</sup> )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	9,2 A	18,0 ABC	21,70 A
SA9	7,7 A	20,8 ABC	22,36 A
132	10,5 A	16,5 C	19,90 A
163	10,9 A	20,4 ABC	24,02 A
188	7,6 A	20,3 ABC	22,40 A
SA9+132	11,4 A	22,0 AB	23,84 A
SA9+163	8,1 A	19,1 ABC	26,93 A
SA9+188	11,4 A	22,5 AB	25,04 A
132+163	7,3 A	20,5 ABC	28,23 A
132+188	8,6 A	20,64 ABC	24,28 A
163+188	12,3 A	18,76 ABC	22,00 A
SA9+132+163	9,7 A	22,78 A	23,66 A
SA9+132+188	10,8 A	17,10 BC	22,88 A
SA9+163+188	10,4 A	22,46 AB	23,48 A
132+163+188	9,4 A	19,14 ABC	21,12 A
SA9+132+163+188	10,3 A	21,36 ABC	26,80 A
<b>Média</b>	<b>9,7 c</b>	<b>20,2 b</b>	<b>23,7 a</b>

\*Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação ao diâmetro do caule, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quando se consideram as médias de todo o período experimental (Figura 2.2).

Porém, considerando-se os valores dos diferentes períodos isoladamente (Tabela 2.2), foram observadas diferenças entre os tratamentos de inoculação no terceiro mês. As plantas dos tratamentos SA9, 163, 188, SA9+163, 163+188 e SA9+132+163+188, apresentaram maiores valores de diâmetro do caule que as plantas dos demais tratamentos. Já as plantas inoculadas com a mistura SA9+163+188, apresentaram diâmetro mais reduzido que as demais.

Apesar de a análise estatística indicar diferenças entre tratamentos no terceiro mês, os valores são muito próximos. Souza (2003) considera que as medidas de diâmetro do caule têm pouca utilidade para avaliar o efeito da inoculação nesta fase do desenvolvimento das plantas, pois a resposta inicial da colonização micorrízica está associada ao aumento de captação e aproveitamento de água e nutrientes, tendo maior reflexo na produção de ramos e folhas (SMITH & READ, 1997). Assim, os valores de matéria seca é que são considerados as

variáveis mais úteis para medir o efeito de tratamentos de inoculação micorrízica sobre o crescimento das plantas (MARX, 1980; MARX *et al.*, 1991).

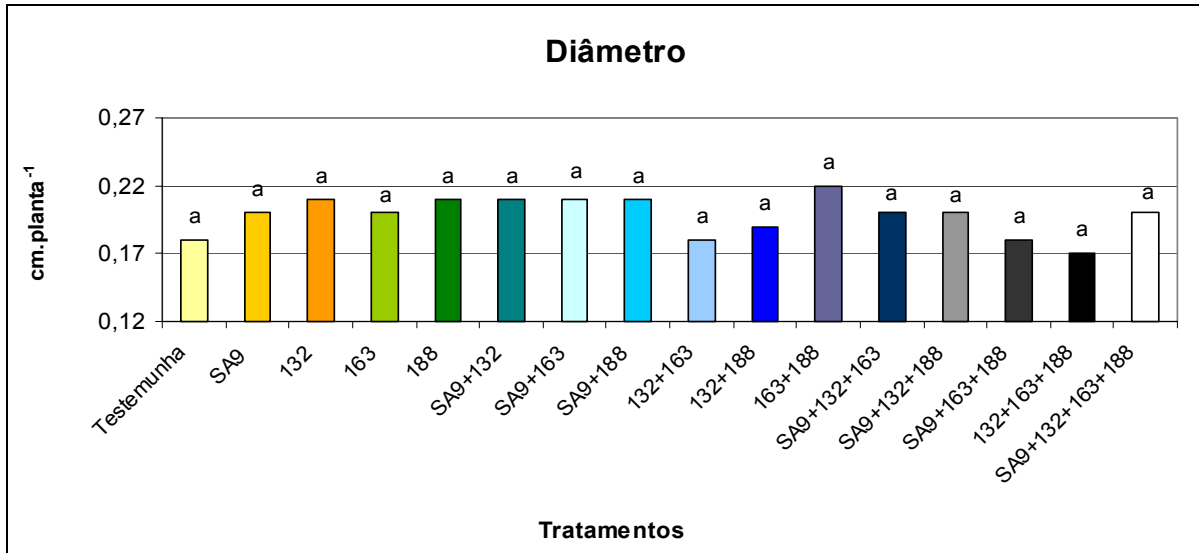


Figura 2.2. Diâmetro do caule das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

Na média dos três meses, as plantas dos tratamentos SA9+163+188 e SA9+132+163+188 se destacaram positivamente com relação à matéria seca da parte aérea, com valores significativamente maiores que os das plantas dos demais tratamentos (Figura 2.3). Interessante notar que o primeiro tratamento citado (SA9+163+188) foi aquele com os menores valores de diâmetro, o que demonstra a falta de correlação entre o diâmetro e a matéria seca, pelo menos nessa fase do desenvolvimento das plantas, conforme mencionado anteriormente (SOUZA, 2003).

Outros tratamentos que se destacaram em relação à matéria seca, na média geral do período experimental, foram SA9+132+188 e 132+163+188 (Figura 2.3). Um grupo intermediário de dez tratamentos apresentou valores significativamente semelhantes entre si. Por fim, dois tratamentos apresentaram valores mais baixos que os demais, o tratamento testemunha e o tratamento 132. Mais uma vez, as plantas inoculadas com o isolado UFSC-Pt132 apresentaram valores inferiores às dos demais tratamentos.

Tabela 2.2. Diâmetro de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamento	Diâmetro (cm.planta <sup>-1</sup> )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0,10 A	0,19 A	0,25 ABC
SA9	0,08 A	0,24 A	0,29 A
132	0,13 A	0,21 A	0,28 AB
163	0,10 A	0,20 A	0,29 A
188	0,10 A	0,22 A	0,30 A
SA9+132	0,14 A	0,22 A	0,27 AB
SA9+163	0,08 A	0,22 A	0,31 A
SA9+188	0,12 A	0,24 A	0,28 AB
132+163	0,07 A	0,21 A	0,27 AB
132+188	0,09 A	0,22 A	0,26 ABC
163+188	0,14 A	0,24 A	0,28 A
SA9+132+163	0,12 A	0,23 A	0,27 AB
SA9+132+188	0,10 A	0,20 A	0,27 AB
SA9+163+188	0,11 A	0,24 A	0,18 C
132+163+188	0,11 A	0,21 A	0,20 BC
SA9+132+163+188	0,10 A	0,20 A	0,28 A
<b>Média</b>	<b>0,11 c</b>	<b>0,22 b</b>	<b>0,27 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A análise de matéria seca da parte aérea ao longo dos três meses de experimento mostra que já no primeiro mês as diferenças foram significativas entre os tratamentos, com destaque para a mistura 163+188. As diferenças entre tratamentos foram mais marcantes no segundo mês de cultivo, com os valores mais altos sendo encontrados para os tratamentos SA9+163+188 e SA9+132+163+188. Essa tendência se consolida na média geral desses tratamentos (Tabela 2.3).

Dentre os tratamentos com os menores valores de matéria seca, destacaram-se a testemunha e o tratamento 132. Com relação ao terceiro mês, não houve diferença significativa, mas a exemplo do mês anterior, pode-se notar uma tendência de valores mais altos na parte inferior da tabela, ou seja, referentes aos tratamentos que envolveram maior número de isolados.

No entanto, é importante salientar que ao longo do terceiro mês ocorreu uma severa queda de folhas das mudas que pode ter influenciado nos resultados, minimizando as diferenças estatísticas entre os tratamentos ao fim do período de cultivo.

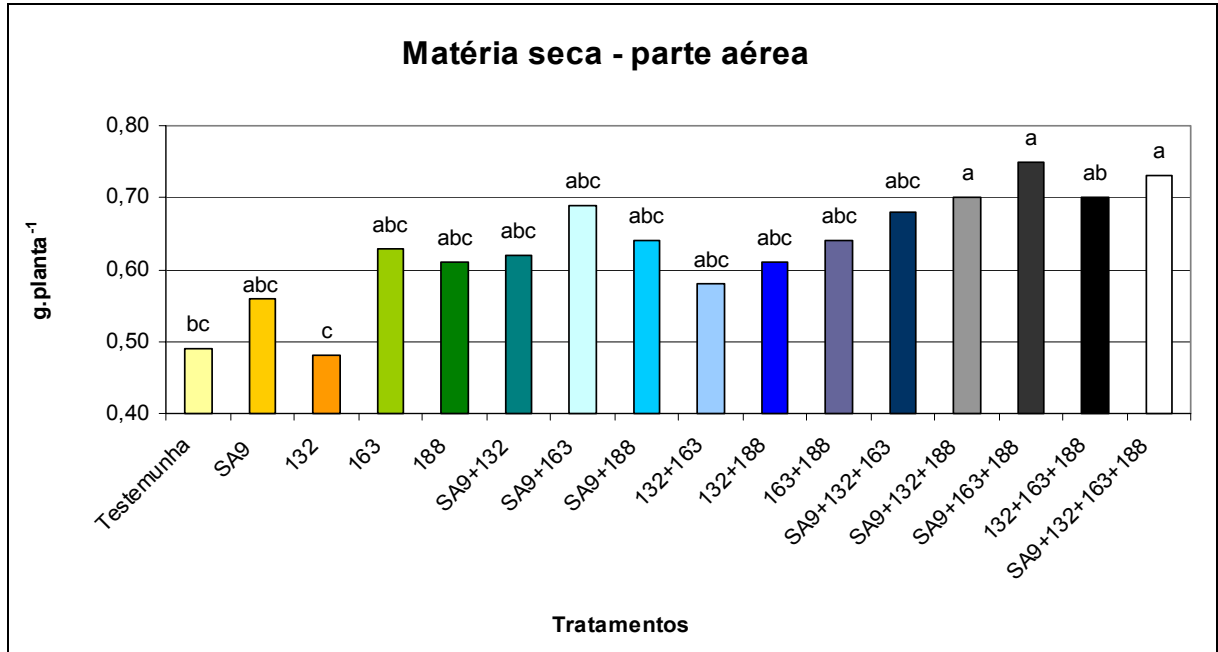


Figura 2.3. Matéria seca da parte aérea das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

Ainda com relação ao período total do experimento, pode-se afirmar que a velocidade de crescimento da parte aérea das plantas foi levemente menor do segundo para o terceiro mês quando comparada ao ganho de peso nos dois primeiros meses. A matéria seca média nos períodos aumentou de 0,16 para 0,71 g.planta<sup>-1</sup>, do primeiro para o segundo mês, representando um aumento de 340 %. Do segundo para o terceiro mês, entretanto, o aumento foi de apenas 45 %. Os valores de matéria seca da parte aérea entre os três períodos foram significativamente diferentes.

Com relação à matéria seca do sistema radicular, não foram observadas diferenças entre os tratamentos quando se consideram os resultados gerais dos três meses de casa de vegetação (Figura 2.4). Notou-se, porém, mais uma vez uma tendência de valores maiores nos tratamentos envolvendo maior número de isolados, quando comparados aos valores observados nos tratamentos com a inoculação individual dos isolados ou, ainda, com a testemunha não inoculada, que apresentou o mais baixo valor dentre todos os tratamentos.



Tabela 2.3. Matéria seca da parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamento	Matéria seca (g.planta <sup>-1</sup> )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0,11 AB	0,54 BC	0,80 A
SA9	0,09 ABC	0,74 ABC	0,85 A
132	0,16 AB	0,53 C	0,76 A
163	0,19 AB	0,71 ABC	0,98 A
188	0,13 AB	0,69 ABC	1,01 A
SA9+132	0,24 AB	0,64 ABC	0,99 A
SA9+163	0,11 AB	0,75 ABC	1,20 A
SA9+188	0,18 AB	0,77 ABC	0,97 A
132+163	0,08 AB	0,71 ABC	0,95 A
132+188	0,12 AB	0,65 ABC	1,06 A
163+188	0,26 A	0,70 ABC	0,96 A
SA9+132+163	0,18 AB	0,77 ABC	1,08 A
SA9+132+188	0,15 AB	0,70 ABC	1,25 A
SA9+163+188	0,22 AB	0,90 A	1,12 A
132+163+188	0,12 AB	0,75 ABC	1,23 A
SA9+132+163+188	0,15 AB	0,80 AB	1,21 A
<b>Média</b>	<b>0,16 c</b>	<b>0,71 b</b>	<b>1,03 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O aumento da matéria seca de raiz ao longo dos três meses foi constante, indicando um crescimento regular nesse período (Tabela 2.4).

A análise mês a mês revela diferenças significativas entre os tratamentos apenas no primeiro mês, com destaque para a mistura 163+188 (Tabela 2.4). Nos dois meses seguintes, as diferenças não foram significativas, apesar de apontarem uma tendência de resultados menos favoráveis para os tratamentos com apenas um isolado e para a testemunha. As plantas deste último tratamento, juntamente com aquelas inoculadas somente com o isolado UFSC-Pt132, foram aquelas com os menores valores de matéria seca de raiz.

Cabe ressaltar que as plantas desses dois tratamentos foram aquelas com os menores valores de altura, diâmetro do caule e matéria seca da parte aérea, conforme apresentado anteriormente. Esses resultados, considerados em conjunto, reforçam os comentários feitos anteriormente a respeito da ausência de eficiência por parte do isolado UFSC-Pt132, quando inoculado em separado dos demais.

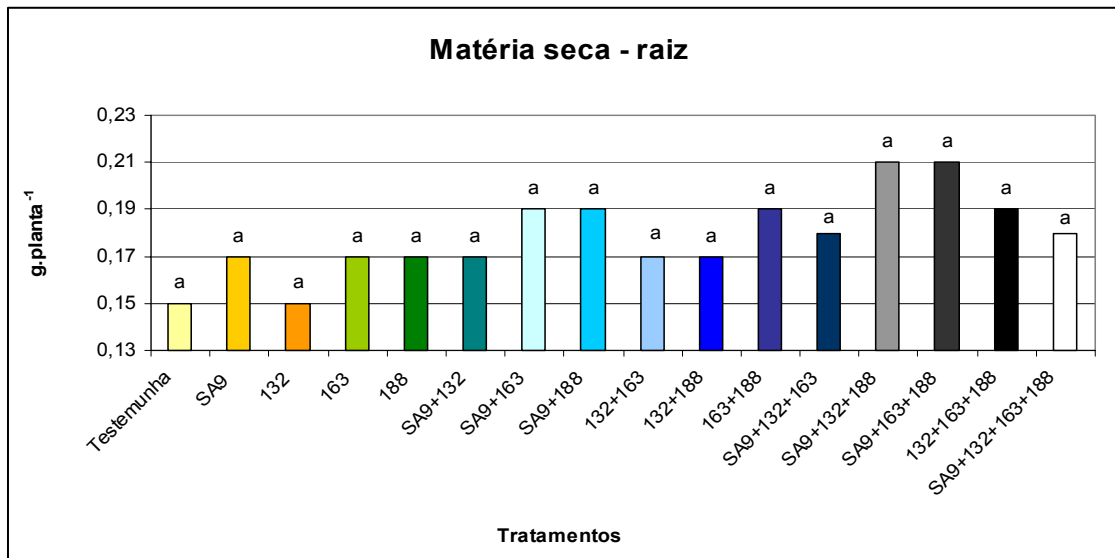


Figura 2.4. Matéria seca radicular das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

Tabela 2.4. Matéria seca do sistema radicular de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamentos	Matéria seca (g.planta <sup>-1</sup> )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0,03 AB	0,15 A	0,28 A
SA9	0,02 B	0,15 A	0,35 A
132	0,03 AB	0,11 A	0,30 A
163	0,03 AB	0,16 A	0,31 A
188	0,03 AB	0,16 A	0,31 A
SA9+132	0,05 AB	0,16 A	0,29 A
SA9+163	0,03 AB	0,19 A	0,35 A
SA9+188	0,05 AB	0,19 A	0,35 A
132+163	0,02 B	0,17 A	0,33 A
132+188	0,02 B	0,17 A	0,33 A
163+188	0,07 A	0,16 A	0,33 A
SA9+132+163	0,04 AB	0,17 A	0,33 A
SA9+132+188	0,04 AB	0,19 A	0,40 A
SA9+163+188	0,05 AB	0,18 A	0,39 A
132+163+188	0,03 AB	0,17 A	0,38 A
SA9+132+163+188	0,02 B	0,16 A	0,37 A
<b>Média</b>	<b>0,04 c</b>	<b>0,16 b</b>	<b>0,34 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Finalmente, quando se consideram os valores de matéria seca total, três tratamentos se destacaram dentre todos como aqueles que promoveram a maior acumulação de biomassa, confirmando a tendência que já vinha sendo apontada na análise das variáveis discutidas anteriormente. Foram eles os tratamentos SA9+132+188, SA9+163+188 e SA9+132+163+188 (Figura 2.5). As plantas desses três tratamentos apresentaram os maiores valores de matéria seca total, com 0,90, 0,95 e 0,91 g planta<sup>-1</sup>. Comparadas às plantas testemunhas, o ganho de matéria seca com a inoculação das plantas com esses isolados, variou entre 40 e 48 %, um valor considerável.

Em segundo lugar ficaram as plantas inoculadas com a mistura 132+163+188 (Figura 2.5). Os menores valores de matéria seca total na média geral do experimento foram apresentados pelas plantas dos tratamentos testemunha e do tratamento de inoculação com o isolado UFSC-Pt132.

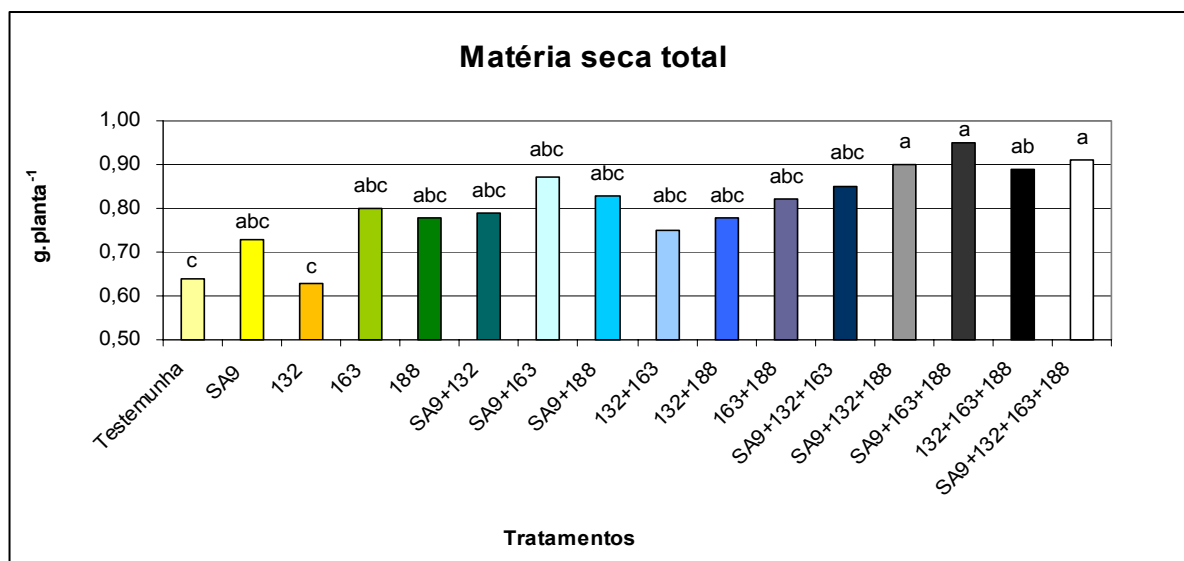


Figura 2.5. Matéria seca total das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

Como ocorreu em relação às variáveis anteriormente analisadas, os resultados apontam para a superioridade dos tratamentos contendo maior número de isolados. Essa tendência pode ser percebida a partir do segundo mês, embora apenas um tratamento (SA9+163+188) tenha sido, nesse período, estatisticamente diferente dos demais (Tabela 2.5).

No terceiro mês não foram detectadas diferenças importantes entre os tratamentos, embora se observe a mesma correlação positiva entre matéria seca e número de isolados envolvidos. A queda de folhas, já relatada em parágrafo anterior relativo à matéria seca da parte aérea, foi, possivelmente, o fator responsável por esses resultados.

É possível, porém, que tais diferenças, mais evidentes no início do crescimento das plantas, tenham diminuído ao longo do tempo devido ao limitado espaço físico dentro dos tubetes, como foi comentado anteriormente. Assim, à medida que o crescimento vegetal foi ficando limitado pelo pequeno espaço disponível, as diferenças entre os tratamentos foram se tornando menores. A matéria seca total é considerada por muitos autores como a variável ideal para se avaliar o efeito de tratamentos de inoculação ectomicorrízica por avaliar a planta por inteiro e, assim, indicar o tratamento mais eficiente em termos de produção de biomassa (MARX, 1980; MARX *et al.*, 1991).

Tabela 2.5. Matéria seca total de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamentos	Matéria seca (g.planta <sup>-1</sup> )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0,15 AB	0,69 B	1,08 A
SA9	0,10 B	0,90 AB	1,20 A
132	0,19 AB	0,64 B	1,06 A
163	0,22 AB	0,87 AB	1,30 A
188	0,16 AB	0,86 AB	1,32 A
SA9+132	0,30 AB	0,80 AB	1,28 A
SA9+163	0,14 AB	0,93 AB	1,55 A
SA9+188	0,22 AB	0,96 AB	1,32 A
132+163	0,10 AB	0,88 AB	1,28 A
132+188	0,14 AB	0,82 AB	1,39 A
163+188	0,32 A	0,87 AB	1,29 A
SA9+132+163	0,23 AB	0,95 AB	1,40 A
SA9+132+188	0,19 AB	0,85 AB	1,66 A
SA9+163+188	0,26 AB	1,08 A	1,51 A
132+163+188	0,15 AB	0,92 AB	1,61 A
SA9+132+163+188	0,18 AB	0,96 AB	1,58 A
<b>Média</b>	<b>0,19 c</b>	<b>0,87 b</b>	<b>1,36 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os menores valores de comprimento radicular foram observados nas plantas do tratamento testemunha (Figura 2.6). Diversos autores têm observado uma correlação positiva entre o comprimento radicular total e a colonização radicular por

fungos ectomicorrízicos (SOUZA *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram essa afirmação.

Isto pode ser observado também no terceiro mês, ao final do experimento, e essa tendência já podia ser notada a partir do segundo mês, justamente quando foram observadas as primeiras evidências de colonização ectomicorrízica (Tabela 2.6). Ressalte-se que ao final do período experimental, três meses, os dois tratamentos com maiores valores de comprimento radicular (SA9+188 e SA9+163+188) foram, justamente, os que apresentaram altos níveis de comprimento radicular colonizado e de porcentagem de colonização, quando comparados aos outros tratamentos como se pode notar na tabela 2.6.

É sabido que os fungos ectomicorrízicos, juntamente com as bactérias que os acompanham, estimulam as raízes a produzir padrões de ramificação diferentes (SMITH & READ, 1997; ASPRAY *et al.*, 2007). Essa mudança na arquitetura radicular promove o aumento do comprimento radicular além de proporcionar uma maior superfície de contato entre a planta e o solo. Como principal consequência, aumenta-se a absorção de nutrientes e melhora-se a nutrição da planta, resultando em maior crescimento.

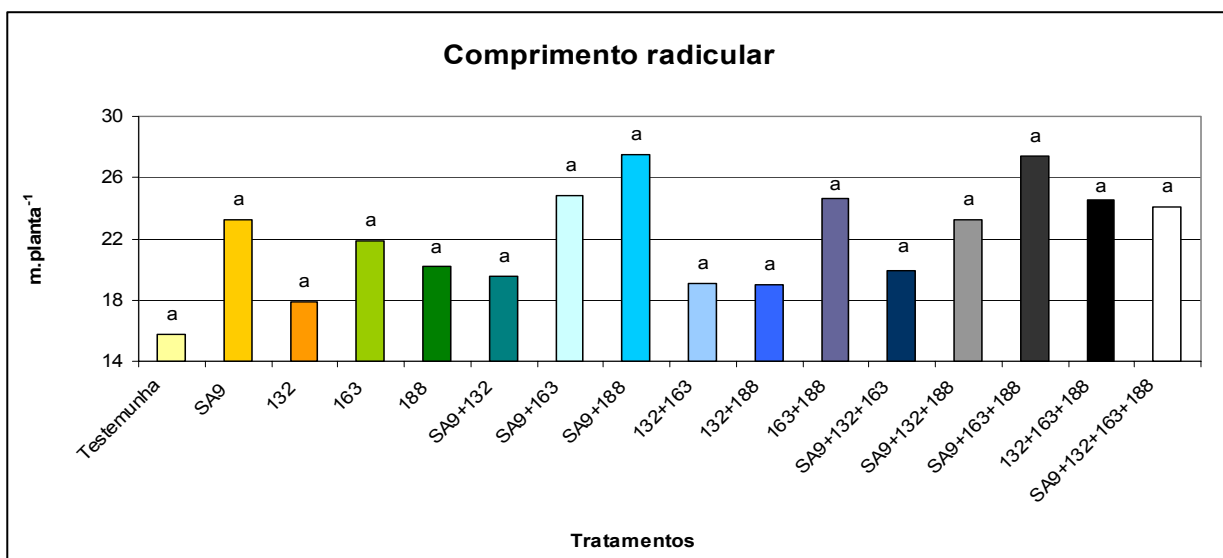


Figura 2.6. Comprimento radicular total das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

A relação entre o peso de matéria seca do sistema radicular e o peso de matéria seca da parte aérea (Figura 2.7, Tabela 2.7), aqui denominada relação

raiz/parte aérea (R/PA), também foi analisada, pois tem sido aceita a idéia de que esta relação aumentaria com a presença do fungo na raiz, como consequência do maior crescimento desta (ALVES *et al.*, 2001). No entanto, os resultados observados demonstram exatamente o oposto. O tratamento que apresentou a maior relação R/PA foi o tratamento testemunha. Por outro lado, o tratamento envolvendo a mistura dos quatro isolados (SA9+132+163+188), que apresentou os maiores valores de altura e matéria seca, foi aquele com os menores valores de relação raiz/parte aérea.

Tabela 2.6. Comprimento radicular de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamentos	Comprimento radicular (m.planta <sup>-1</sup> )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	4,72 A	13,20 A	29,42 A
SA9	3,19 A	18,21 A	48,23 A
132	4,88 A	12,32 A	36,41 A
163	6,79 A	17,00 A	41,68 A
188	4,22 A	16,76 A	39,55 A
SA9+132	4,72 A	18,84 A	35,00 A
SA9+163	3,23 A	21,63 A	49,69 A
SA9+188	5,08 A	21,95 A	55,38 A
132+163	2,39 A	18,10 A	36,72 A
132+188	3,58 A	16,48 A	37,02 A
163+188	6,50 A	18,00 A	49,30 A
SA9+132+163	3,49 A	24,61 A	31,62 A
SA9+132+188	3,52 A	23,57 A	42,79 A
SA9+163+188	4,57 A	24,11 A	53,57 A
132+163+188	3,60 A	24,69 A	45,37 A
SA9+132+163+188	3,70 A	18,88 A	49,54 A
<b>Média</b>	<b>4,26 c</b>	<b>19,27 b</b>	<b>42,58 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Isto corrobora os resultados encontrados por Guehl *et al.* (1990). Dosskey *et al.* (1992) observaram efeito semelhante em mudas de *Pseudotsuga menziesii* inoculadas com fungos micorrízicos. Nesses estudos, essa relação também diminuiu nas plantas inoculadas em comparação com as plantas não inoculadas.

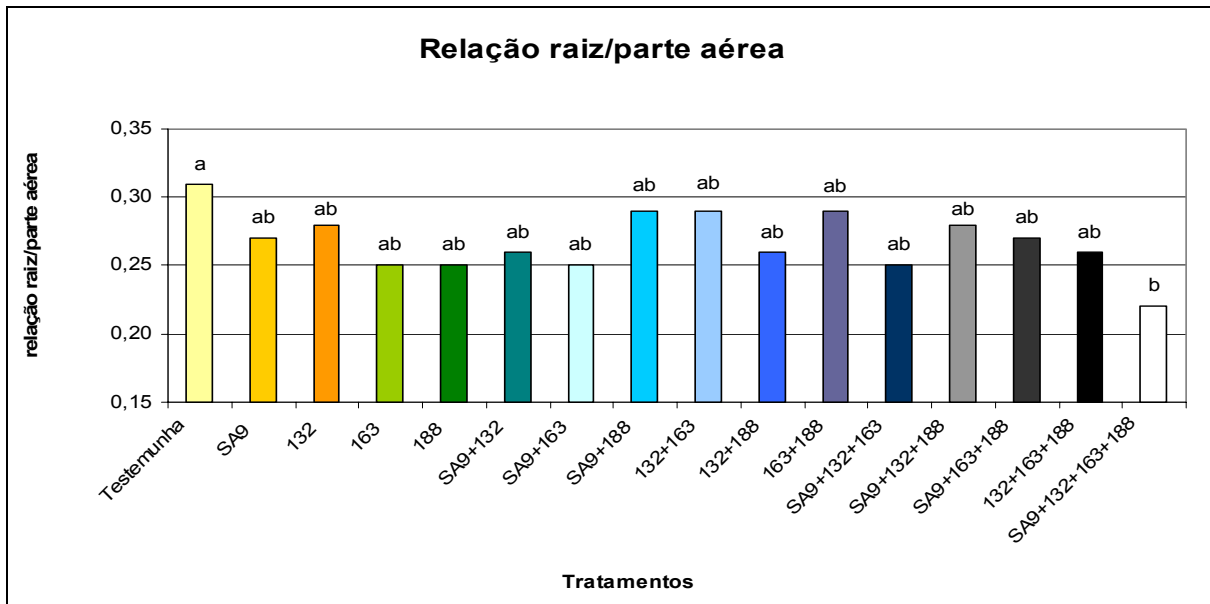


Figura 2.7. Relação entre a matéria seca do sistema radicular e da parte aérea de mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

A diminuição da relação raiz/parte aérea nos tratamentos de inoculação indica maior crescimento da parte aérea em relação à raiz. Isto assim ocorre devido ao efeito positivo proporcionado pelos fungos ectomicorrízicos, propiciando um aumento na eficiência da translocação de nutrientes para a parte aérea da planta (SMITH & READ, 1997).

A absorção de P pelas plantas foi outra variável em cujos resultados se pode observar a eficiência de atuação de fungos ectomicorrízicos. Neste caso, observou-se que as plantas do tratamento 132+163+188, seguidas pelas plantas dos tratamentos SA9+132+163+188 e SA9+132+188, foram aquelas com os maiores valores de P na parte aérea. Esses tratamentos estão entre aqueles que envolvem maior número de isolados. Essa tendência pode ser notada observando-se os dados da Figura 2.8. Os tratamentos contendo apenas um isolado só não apresentaram resultados mais baixos que o tratamento 132+188, o que reforça a idéia de que tratamentos envolvendo maior números de isolados produzem melhor efeito no crescimento vegetal.

Tabela 2.7. Relação entre a matéria seca do sistema radicular e da parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamentos	Relação raiz/parte aérea*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0,30 A	0,28 A	0,36 A
SA9	0,19 B	0,21 A	0,40 AB
132	0,20 AB	0,22 A	0,40 AB
163	0,19 AB	0,22 A	0,34 AB
188	0,21 AB	0,23 A	0,31 AB
SA9+132	0,23 AB	0,25 A	0,30 AB
SA9+163	0,22 AB	0,25 A	0,28 AB
SA9+188	0,25 AB	0,25 A	0,37 AB
132+163	0,27 AB	0,24 A	0,36 AB
132+188	0,21 AB	0,25 A	0,32 AB
163+188	0,26 AB	0,24 A	0,36 AB
SA9+132+163	0,23 AB	0,22 A	0,30 AB
SA9+132+188	0,26 AB	0,27 A	0,32 AB
SA9+163+188	0,21 AB	0,21 A	0,40 AB
132+163+188	0,22 AB	0,23 A	0,31 AB
SA9+132+163+188	0,16 B	0,20 A	0,31 B
<b>Média</b>	<b>0,22 b</b>	<b>0,24 b</b>	<b>0,34 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Quando se analisa a evolução do acúmulo de fósforo na parte aérea ao longo do período experimental (Tabela 2.8), pode-se notar que os valores aumentaram até o segundo mês de idade das plantas. Nesse período, o aumento foi da ordem de 160 %. Do segundo para o terceiro mês, entretanto, ocorreu uma queda acentuada nos valores desse elemento nos tecidos, passando de 122 para 54  $\mu\text{g.planta}^{-1}$ .

A queda de folhas no decorrer do terceiro mês de crescimento, relatada anteriormente, poderia ser cogitada para explicar esse efeito não fosse pelo fato de os valores de matéria seca da parte aérea terem continuado a aumentar, mesmo com essa queda. Por outro lado, é possível que esse fenômeno possa ter contribuído para diminuição nos valores de P considerando-se o fato de que, com a queda das folhas, os tecidos da parte aérea ficaram representados em maior proporção pelos ramos, onde existe grande quantidade de células mortas e menor atividade metabólica.



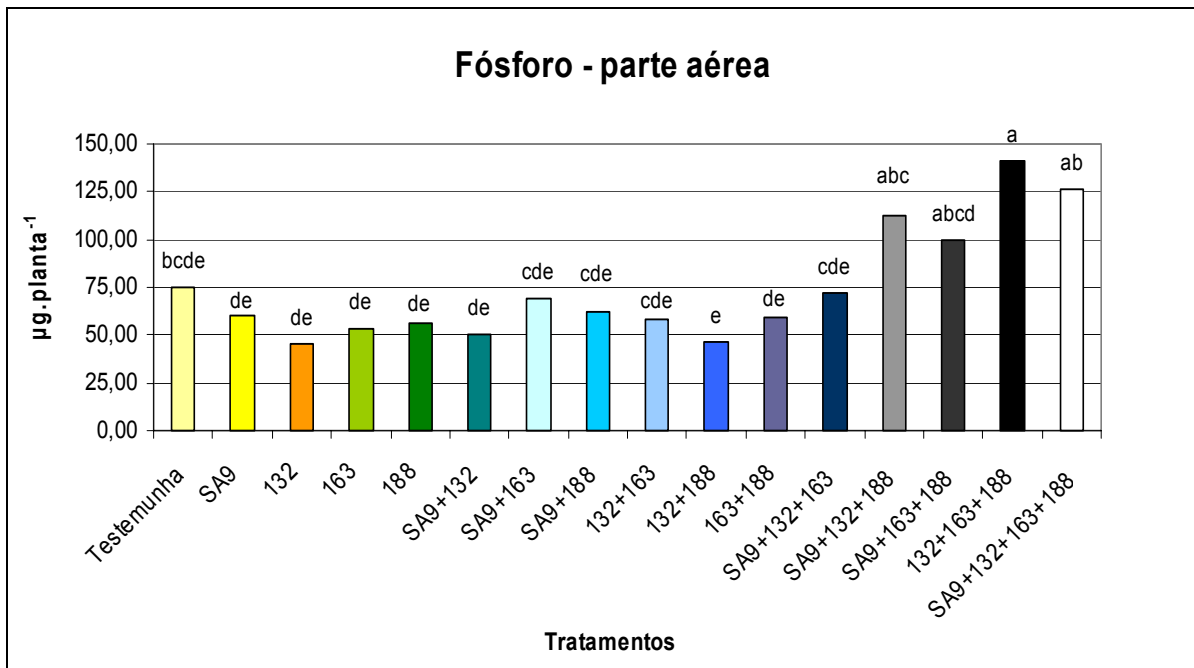


Figura 2.8. Acúmulo de P total na parte aérea das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições. [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

Ora, sabe-se que o P se concentra justamente nas partes mais ativas das plantas, como flores, folhas e brotos, onde participa da síntese de ATP e de outros eventos do metabolismo celular. Por essa razão, mesmo que os valores de matéria seca da parte aérea tenham continuado a aumentar do segundo para o terceiro mês, é coerente que os valores de P diminuam, já que ao final do terceiro mês havia menor proporção de folhas em relação aos ramos.

Observou-se que as plantas apresentavam no terceiro mês uma coloração arroxeadada que, segundo Brundrett *et al.* (1996), é um sintoma de deficiência de P em espécies de *Eucalyptus*. Segundo Dell *et al.* (1995), *apud* Brundrett *et al.* (1996), a concentração adequada de P em *E. urophylla* é de 1,9-4,0 mg por grama de matéria seca. Neste caso, mesmo os valores mais altos encontrados neste trabalho, nas plantas dos tratamentos 132+163+188 e SA9+132+163+188, que foram de 0,2 e 0,17 mg P.g matéria seca<sup>-1</sup>, respectivamente, ainda estão muito abaixo daqueles considerados ideais por este autor.

Tabela 2.8. Acúmulo de fósforo (P) na parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamentos	P na parte aérea ( $\mu\text{g.planta}^{-1}$ )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	33,1 AB	138,4 BCD	53,6 AB
SA9	24,2 B	107,9 CD	48,5 B
132	23,2 AB	85,3 CD	29,1 B
163	28,3 AB	94,4 CD	37,8 B
188	26,8 B	85,2 CD	56,8 AB
SA9+132	22,6 AB	64,1 D	63,1 AB
SA9+163	21,5 B	90,3 CD	94,5 A
SA9+188	58,6 AB	70,1 CD	53,2 AB
132+163	37,5 AB	98,2 CD	38,4 B
132+188	27,9 B	58,3 D	52,7 AB
163+188	54,0 AB	83,7 CD	40,5 B
SA9+132+163	74,0 AB	103,1 CD	40,0 B
SA9+132+188	51,5 AB	226,9 AB	60,2 AB
SA9+163+188	56,5 AB	167,5 ABC	73,9 AB
132+163+188	148,3 A	213,7 AB	60,6 AB
SA9+132+163+188	55,3 AB	260,0 A	62,5 AB
<b>Média</b>	<b>46,5b</b>	<b>121,93 a</b>	<b>54,10 b</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Quando os valores de acúmulo de P das plantas dos diferentes tratamentos foram transformados em porcentagem, observou-se a mesma tendência, onde as plantas inoculadas com a mistura dos isolados 132+163+188 destacaram-se das demais por apresentarem a maior porcentagem de P nos tecidos, com uma média geral de 0,05 (Figura 2.9). Mais uma vez, observa-se que os tratamentos contendo maior número de isolados apresentaram maior contribuição aos valores das variáveis analisadas.

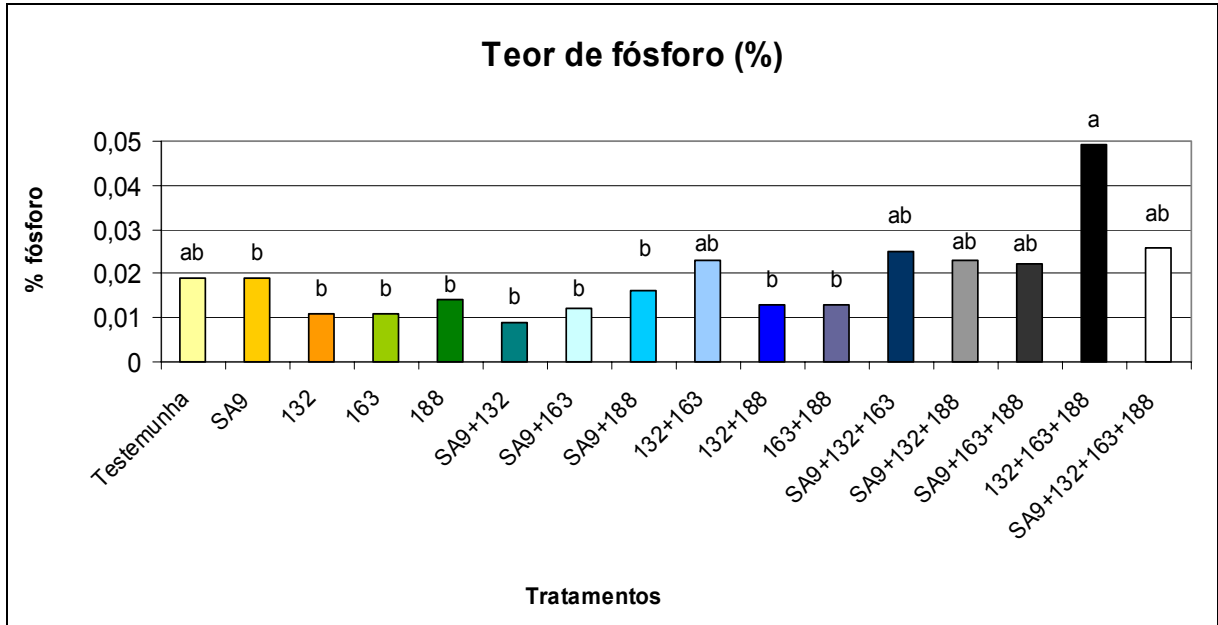


Figura 2.9. Teor de P na parte aérea das mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos isoladamente ou em mistura, cultivadas em casa de vegetação. Os valores correspondem à média dos três meses de avaliação, compreendendo 15 repetições por tratamento [Médias indicadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )].

Quando se analisa a evolução dos teores de P ao longo do período experimental (Tabela 2.9), observa-se uma tendência ligeiramente diferente daquela observada em relação à evolução do acúmulo de P mostrada na tabela 2.8. Neste caso, ocorreu uma significativa redução do teor de P nos tecidos do primeiro ao terceiro mês de cultivo, com valores médios de 0,035, 0,017 e 0,005 %, para o primeiro, segundo e terceiro mês de crescimento, respectivamente. Tal redução deve ter sido provocada pelo aumento do peso de matéria seca resultante do crescimento das plantas (Figura 2.5).

A colonização micorrízica foi detectada somente a partir do segundo mês de crescimento das plantas, porém ainda de forma muito incipiente. Apenas dois tratamentos (188 e 163+188) apresentaram colonização micorrízica nesse momento, e com níveis de colonização muito baixos. Isso acentuou-se no terceiro mês, tanto na intensidade da colonização, como no número de tratamentos.

Tabela 2.9. Teor (%) de fósforo (P) na parte aérea de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamentos	P na parte aérea (%)*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0,030 AB	0,023 ABC	0,007 AB
SA9	0,037 AB	0,015 BC	0,006 ABC
132	0,015 B	0,016 BC	0,004 BC
163	0,016 AB	0,014 C	0,004 BC
188	0,026 B	0,012 C	0,006 ABC
SA9+132	0,010 B	0,010 C	0,006 ABC
SA9+163	0,018 B	0,012 C	0,008 A
SA9+188	0,034 AB	0,010 C	0,005 ABC
132+163	0,052 AB	0,014 C	0,004 BC
132+188	0,024 B	0,009 C	0,005 ABC
163+188	0,022 B	0,013 C	0,004 BC
SA9+132+163	0,059 AB	0,013 C	0,003 C
SA9+132+188	0,037 AB	0,028 AB	0,005 ABC
SA9+163+188	0,040 AB	0,020 ABC	0,007 AB
132+163+188	0,111 A	0,029 A	0,005 ABC
SA9+132+163+188	0,039 AB	0,033 A	0,005 ABC
<b>Média</b>	<b>0,035 a</b>	<b>0,017 b</b>	<b>0,005 b</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Ao final do período experimental, apresentaram colonização os tratamentos 188, SA9+188, 132+163, 163+188, SA9+132+163, SA9+132+188, SA9+163+188 e SA9+132+163+188, sendo o tratamento SA9+163+188 aquele que apresentou o maior valor de colonização em todo o experimento. É importante notar que este tratamento é justamente um dos que apresentou melhores resultados com relação ao crescimento quando se observam as variáveis discutidas anteriormente.

Quando se observa a tabela 2.10, nota-se uma tendência de os tratamentos envolvendo misturas de isolados apresentarem maiores níveis de colonização, embora isso não seja respaldado pela análise estatística. Com exceção do tratamento 188, os outros que continham apenas um isolado não apresentaram colonização micorrízica.

No entanto, é possível que a operação de lavagem das raízes logo após a sua coleta tenha contribuído para eliminar muitas raízes curtas, as mais susceptíveis à colonização pelo fungo ectomicorrízico e, ao mesmo tempo, as mais frágeis e fáceis de perder durante a manipulação e lavagem das raízes. Assim, seria possível

considerar que a baixa intensidade de colonização observada após a coleta das plantas, não seja aquela realmente existente durante a condução do mesmo.

Por essas razões, sugere-se que em trabalhos futuros o processo de lavagem das raízes seja substituído por outro procedimento menos agressivo, de forma a preservar melhor as micorrizas. Esta limitação da técnica já foi também, apontada por Souza (2003) e Alves (2006).

Embora os níveis de colonização tenham se mostrado baixos, e considerando-se a possibilidade de erro experimental em função das lavagens das raízes, é importante salientar que foi observada uma intensificação da colonização em função da idade das plantas.

Tabela 2.10. Comprimento radicular colonizado de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamento	Comprimento radicular colonizado (cm.planta <sup>-1</sup> )*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0,0 A	0,0 A	0,0 A
SA9	0,0 A	0,0 A	0,0 A
132	0,0 A	0,0 A	0,0 A
163	0,0 A	5,9 A	0,0 A
188	0,0 A	0,0 A	0,0 A
SA9+132	0,0 A	0,0 A	0,0 A
SA9+163	0,0 A	0,0 A	48,6 A
SA9+188	0,0 A	0,0 A	16,8 A
132+163	0,0 A	0,0 A	0,0 A
132+188	0,0 A	1,0 A	0,0 A
163+188	0,0 A	0,0 A	9,8 A
SA9+132+163	0,0 A	0,0 A	0,7 A
SA9+132+188	0,0 A	0,0 A	72,5 A
SA9+163+188	0,0 A	0,0 A	0,0 A
132+163+188	0,0 A	0,0 A	0,9 A
SA9+132+163+188	0,0 A	0,0 A	0,0 A
<b>Média</b>	<b>0,0 a</b>	<b>0,43 a</b>	<b>9,33 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os efeitos positivos no crescimento e absorção de P em decorrência da inoculação com fungos ectomicorrízicos foram evidentes, ainda que a colonização radicular tenha se mostrado baixa. É possível que a presença dos isolados fúngicos no ambiente rizosférico tenha influenciado positivamente o crescimento das plantas. Muitos fungos ectomicorrízicos têm mostrado capacidade de solubilizar fosfatos e de

produzir substâncias promotoras de crescimento (NARLOCH, 2002). Lapeyrie *et al.* (1991) observaram que vários fungos ectomicorrízicos têm capacidade de solubilizar fosfatos. Dentre eles um isolado de *Pisolithus tinctorius*. Narloch (2002) verificou que o fungo ectomicorrízico *Rhizopogon vulgaris* (isolado UFSC-Rh106) apresentou bom potencial de solubilização de fosfatos.

Os valores de porcentagem de colonização radicular, da mesma forma que aqueles de comprimento radicular colonizado, foram baixos. A porcentagem máxima encontrada foi de 0,407 % e 0,207 %, para os tratamentos SA9+163+188 e SA9+188, respectivamente. Esses valores podem ser considerados muito baixos se comparados aos encontrados por outros autores estudando a colonização ectomicorrízica em *Eucalyptus dunnii* (ALVES *et al.*, 2001) e em *E. diversicolor* (BOUGHER *et al.*, 1990), por outros fungos ectomicorrízicos.

Os níveis de colonização também são baixos se comparados aos valores observados por Souza (2003), neste caso utilizando os mesmos isolados empregados no presente estudo, sob as mesmas condições de substrato e adubação. Esse autor observou valores de 10 % de colonização nas mudas inoculadas com o isolado UFSC-Pt188, 7 % nas mudas inoculadas com o isolado UFSC-Ch163 e 4 % para aqueles inoculadas com o isolado UFSC-Pt132. Porém, à semelhança do que foi observado no presente estudo, o isolado SA9 também não apresentou colonização detectável.

Por outro lado, os valores de porcentagem de colonização estão mais próximos daqueles observados por Alves (2006) em mudas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com diferentes isolados fúngicos ectomicorrízicos e crescendo em substrato com rochas como fonte de potássio e de fósforo. Nesse estudo, observou-se baixa porcentagem de colonização para a maioria dos isolados, inclusive para um dos empregados neste estudo, o isolado UFSC-Ch163, que não apresentou níveis detectáveis de colonização. Já o isolado UFSC-Pt188, no trabalho de Alves (2006), apresentou níveis bem mais elevados de colonização do que o encontrado no presente estudo, com valores variando de 4 a 15 %, dependendo do tipo de rocha utilizada como fonte fósforo.

Tabela 2.11. Porcentagem de colonização radicular de plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com fungos ectomicorrízicos, isoladamente ou em mistura, em função do tempo de cultivo sob condições de casa de vegetação

Tratamento	% Colonização radicular*		
	1 mês	2 meses	3 meses
Testemunha	0	0	0
SA9	0 A	0 A	0 A
132	0 A	0 A	0 A
163	0 A	0,28 A	0 A
188	0 A	0 A	0 A
SA9+132	0 A	0 A	0 A
SA9+163	0 A	0 A	0,62 A
SA9+188	0 A	0 A	0,55 A
132+163	0 A	0 A	0 A
132+188	0 A	0,06 A	0 A
163+188	0 A	0 A	0,38 A
SA9+132+163	0 A	0 A	0,02 A
SA9+132+188	0 A	0 A	1,22 A
SA9+163+188	0 A	0 A	0 A
132+163+188	0 A	0 A	0,02 A
SA9+132+163+188	0 A	0 A	0 A
<b>Média</b>	<b>0 a</b>	<b>0,023 a</b>	<b>0,19 a</b>

\* Os valores representam a média de 5 plantas por tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Essas comparações reforçam a hipótese de que as raízes finas colonizadas tenham sido perdidas durante a lavagem e revelam uma limitação metodológica para os trabalhos com essa planta. Em *E. dunnii*, as micorrizas apresentaram-se muito frágeis e com dimensões bastante reduzidas. As medidas dessas estruturas obtidas por síntese *in vitro* forneceram valores de comprimento variando de 0,4 a 5 mm, dependendo do fungo simbionte. A maioria apresentou comprimento de 1-2 mm. A espessura variou de 0,1 a 1,1 mm.

Os resultados deste estudo confirmam a superioridade de alguns isolados fúngicos ectomicorrízicos na promoção de benefícios à planta hospedeira, anteriormente sugerida por Souza (2003), Souza *et al.* (2004) e Alves (2006), notadamente em relação ao isolado UFSC-Pt188, *Pisolithus microcarpus*.

Além disso, observou-se que a inoculação das plantas com misturas de diferentes isolados pode propiciar maiores benefícios às plantas que a inoculação individual com cada isolado. Tal abordagem, além de simular com mais fidelidade as condições naturais de campo, onde as plantas estão sujeitas à colonização

simultânea de suas raízes por diferentes fungos ectomicorrízicos presentes no local, tem a vantagem de tirar proveito dos diversos mecanismos de ação que esses fungos apresentam para beneficiar seus hospedeiros.

Com base nesses resultados, recomenda-se que novos estudos envolvendo a inoculação das plantas com diferentes isolados sejam desenvolvidos. Cuidado especial deve ser dado à melhoria das técnicas de avaliação da colonização radicular, procurando-se evitar as limitações impostas pelas operações de coleta e lavagem das raízes.

A padronização do inóculo fúngico também deve ser buscada de modo a assegurar que todos os isolados sejam adicionados em quantidades semelhantes ao substrato de crescimento das plantas. Nesse caso, novas formas de produção do inóculo devem ser empregadas, como por exemplo o inóculo em gel de alginato de cálcio, onde uma quantidade conhecida de micélio é imobilizada em cápsulas de alginato (ROSSI, 2006).

## 2.4 CONCLUSÕES

- A inoculação das plantas com maior número de isolados fúngicos ectomicorrízicos promove maior absorção de P e maior crescimento quando comparada à inoculação envolvendo apenas um isolado e ao tratamento sem inoculação;
- As misturas envolvendo o isolado UFSC-Pt188 promovem maior crescimento das mudas de *Eucalyptus dunnii*;
- O isolado UFSC-Pt132, quando aplicado isoladamente ao substrato de plantio, não proporciona efeitos favoráveis sobre a nutrição e o crescimento das mudas de *Eucalyptus dunnii*;
- É necessário desenvolver procedimentos que permitam identificar os diferentes fungos quando presentes simultaneamente no sistema radicular das plantas de modo a confirmar a participação de cada isolado nos efeitos sobre as variáveis estudadas.



## CAPITULO 3

### MORFOTIPAGEM DE ECTOMICORRIZAS OBTIDAS ATRAVÉS DE SÍNTESE *IN VITRO*

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Os estudos que visam comparar a capacidade de colonização radicular (infectividade) e a eficiência de fungos ectomicorrízicos na promoção do crescimento das plantas, quando aplicados individualmente ou em consórcio, exigem o reconhecimento de cada fungo ou isolado quando presente na própria micorriza. O reconhecimento pode ser feito com base nas características anatômicas e morfológicas das micorrizas de cada fungo. Para isso, são necessários estudos preliminares de síntese micorrízica *in vitro* sob condições assépticas.

A formação de ectomicorrizas pode ser induzida *in vitro* pela exposição das raízes das plantas hospedeiras ao micélio do fungo ectomicorrízico em um ambiente que favoreça o crescimento de ambos (BRUNDRETT *et al.*, 1996). Para isso, existem várias técnicas descritas na literatura. Essa produção monoxênica de micorrizas foi descrita pela primeira vez por Melin (1921, 1922 *apud* YANG & WILCOX, 1983). Posteriormente, outros pesquisadores fizeram modificações e adaptações desenvolvendo, assim, novas técnicas.

Técnicas como a do *sandwich-paper* descrita por Chilvers *et al.* (1986) e a do celofane sobre ágar (BURGESS *et al.*, 1994) permitem um contato íntimo entre o fungo ou isolado de interesse com determinada planta, propiciando a formação de ectomicorrizas em condições axênicas. Na técnica do *sandwich-paper*, o fungo e o sistema radicular da planta são colocados dentro de pequenos sacos de papel, crescendo juntos até estabelecerem a simbiose. Na técnica do celofane sobre ágar, o sistema planta-fungo é colocado sobre um disco de papel celofane numa placa de Petri contendo meio de cultura. O celofane é usado para impedir que as raízes cresçam para dentro do meio de cultura, ao mesmo tempo que permite a passagem dos nutrientes contidos no meio de cultura.

Na técnica proposta por Yang & Wilcox (1983), a planta e o fungo são colocados entre uma folha de papel de filtro e a parede de um tubo de ensaio preenchido com uma mistura turfa-vermiculita umidificada com meio de cultura líquido MNM.

Essas técnicas têm se mostrado úteis para avaliar a compatibilidade entre o fungo e planta e, também, para observação e descrição de características gerais das micorrizas. Assim, por meio dessas técnicas, podem ser estudadas, tanto as características macroscópicas, como, padrões de ramificação; a presença de rizomorfas; cor, aspecto e textura do manto, quanto às características microscópicas, como detalhes do manto e da rede de Hartig.

As micorrizas formadas por meio dessas técnicas podem ser facilmente separadas do resto do sistema radicular e submetidas, por inteiro ou seccionadas, a preparações microscópicas. Essas preparações permitem descrever as características microscópicas das micorrizas como o número e a organização das camadas do manto, a anatomia da rede de Hartig, as ornamentações, a presença de cistídeos e as hifas emanantes, dentre outras. A este procedimento de descrição dá-se o nome de morfotipagem.

Os objetivos principais deste estudo foram:

- Caracterizar os morfotipos formados por cada isolado fúngico ectomicorrízico em mudas de *Eucalyptus dunnii*.
- Avaliar a infectividade de diferentes isolados de fECM em *Eucalyptus dunnii* sob condições assépticas de síntese *in vitro*.

Para isso, algumas dessas técnicas de síntese micorrízica *in vitro* foram testadas, tendo sido escolhida a técnica em tubo por ter se mostrado mais eficiente no que diz respeito à manipulação, à assepsia e à observação das micorrizas durante o crescimento das plantas.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Isolados fúngicos utilizados**

Foram estudados os mesmos isolados de fECM utilizados no estudo em casa de vegetação descrito no capítulo 2.

Cada isolado foi repicado a partir das culturas da coleção para meio de mesma composição (placas-matrizes), sob condições assépticas em capela de fluxo

laminar. As placas foram mantidas incubadas a  $25 \pm 1$  °C em incubadora tipo B.O.D. até o momento de utilização das culturas, cerca de 20 dias após.

### 3.2.2 Obtenção das plântulas de *Eucalyptus dunnii* sob condições assépticas

A esterilização da superfície das sementes de *E. dunnii* foi efetuada pela imersão em etanol (70 %), durante 30 s, sob agitação, seguindo-se de uma lavagem em água destilada estéril. Em seguida, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (1 %), durante 20 min e lavadas três vezes em água destilada estéril. Após esse tratamento, foram semeadas em meio de germinação sólido, contendo ácido bórico ( $3 \mu\text{M}$ ), glicose ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e sulfato de cálcio ( $500 \mu\text{M}$ ), pH 5,7, ágar-ágar ( $7 \text{ g.L}^{-1}$ ), em placas de Petri ( $\varnothing=100 \text{ mm}$ ). Todo esse processo foi realizado sob condições assépticas de fluxo laminar. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a  $25 \pm 1$  °C, com fotoperíodo de 24 horas durante 2 semanas.

Após a germinação, as plântulas foram transferidas, sob condições assépticas, para tubos de vidro (20 cm x 2,5 cm) contendo uma mistura turfa-vermiculita (30 mL por tubo), na proporção de 1:20 (V/V). Uma folha de papel de filtro de 11 cm x 11 cm foi colocada entre o substrato de plantio e a parede do tubo.

Esse substrato foi, então, umedecido com cerca de 10 mL de água e esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 20 min. Posteriormente, adicionaram-se 10 mL de meio de cultura MNM por tubo e procedeu-se a uma segunda esterilização sob as mesmas condições de tempo e temperatura. Antes da esterilização, os tubos foram fechados com duas camadas de papel celofane.

Em cada tubo, uma plântula de *E. dunnii* com duas semanas de idade, foi colocada com as raízes dispostas entre a folha de papel de filtro e a parede do tubo, de modo a permitir a visualização periódica do sistema radicular (Figura 3.1). O sistema foi colocado em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \text{ °C} \pm 2$  e fotoperíodo de 12 horas.

### 3.2.3 Inoculação das plântulas

Discos de meio de cultura de 8 mm de diâmetro, cobertos de micélio, foram retirados das bordas das colônias em placas de Petri, com cerca de 20 dias de crescimento. Esses discos foram colocados em meio fresco MNM-ágar, em placas de Petri, para confirmar sua viabilidade e ausência de contaminações. Após 2 dias,

quando o micélio voltou a crescer nas bordas dos discos, e nenhuma contaminação foi observada, os discos foram transferidos para os tubos de síntese onde já se encontravam as plântulas. Esses discos foram depositados de cada lado das raízes, também entre o papel de filtro e a parede do tubo. O conjunto foi incubado em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura e luminosidade.

Preparou-se, também, um tratamento testemunha não inoculado. Os tubos foram novamente fechados com papel celofane, sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar, e as plantas foram devolvidas à câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas.

#### 3.2.4 Avaliação dos resultados

Após 5 semanas em câmara de crescimento, as plantas foram retiradas dos tubos, separando-se o sistema radicular da parte aérea e as características morfológicas externas e internas das micorrizas foram avaliadas.

As características externas das micorrizas foram examinadas sob microscópio estereoscópico, com aumento de até 30X. As micorrizas foram separadas das demais raízes e classificadas conforme o tipo morfológico aparente. As micorrizas de cada tipo foram depositadas em diferentes poços de placas do tipo ELISA contendo solução salina (0,85 % de NaCl).

Sob microscópio estereoscópico, foram anotadas as características de cor do manto, padrão de ramificação, textura do manto, presença de hifas extra-matriciais e de rizomorfias, forma da ponta da raiz e outras características conforme o quadro 3.1. Essa descrição macroscópica foi feita de acordo com catálogos de Ingleby *et al.* (1990), Agerer (1987-1993) e Goodman *et al.* (1996-1998). O modelo das fichas de descrição utilizadas nesta etapa é apresentado no Anexo 3.

Posteriormente, as diferentes micorrizas foram depositadas em tubos do tipo *Eppendorf*, devidamente catalogadas e congeladas à temperatura de -20 °C, para posterior estudo das características microscópicas. Antes do congelamento, as micorrizas foram fotografadas ao microscópio estereoscópico.

Para a caracterização microscópica, as micorrizas foram cortadas em secções de 20-30 µm em criomicrotomo e observadas sob microscópio óptico em aumentos de 400X a 1000X. Antes da observação, as secções foram colocadas sobre uma lâmina de vidro para microscopia e, simultaneamente, fixadas e coradas com uma

mistura contendo uma gota de PVLG (16,6 g de álcool-polivinílico + 100 mL de água destilada + 100 mL ácido láctico + 10 mL de glicerina) e uma gota de solução de azul de algodão (0,05 %) ao lactoglicerol (0,04 g de azul de metila + 10 mL de ácido láctico + 20 mL de glicerina + 10 mL de água destilada).

Ao microscópio, foram anotadas as características do manto, da rede de Hartig, de hifas extra-matriciais e outras (Anexo 4), que também foram descritas de acordo com catálogos de descrição (INGLEBY *et al.*, 1990; AGERER, 1987-1993; GOODMAN *et al.*, 1996-1998) (Quadro 3.1). As secções foram fotografadas ao microscópio óptico.

Quadro 3.1. Características morfológicas externas e internas das micorrizas

<p><b>Morfologia das micorrizas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• intensidade de ramificação</li> <li>• padrões de ramificação</li> </ul> <p><b>Manto</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• textura</li> <li>• cor</li> <li>• organização das hifas na superfície</li> <li>• presença de fíbulas, cystídeos, exsudatos</li> </ul> <p><b>Rede de Hartig</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• presença</li> <li>• espessura</li> <li>• número de camadas</li> <li>• organização das hifas em cada camada</li> </ul>
---

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após cinco semanas, os tubos de síntese *in vitro* foram abertos e seu conteúdo examinado quanto à presença de ectomicorrizas. Na maioria dos tubos, fungo e planta cresceram normalmente, com o micélio avançando por cima do sistema radicular e crescendo sobre as raízes (Figura 3.1).

No entanto, analisando-se minuciosamente as raízes de forma individual, apenas três, dos quatro isolados, formaram ectomicorrizas. Foram eles: UFSC-

Pt132, UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188. As plantas inoculadas com o isolado SA9, um *Scleroderma flavidum*, não apresentaram colonização detectável, embora fosse possível observar a presença de micélio cobrindo as raízes. As características das raízes e/ou micorrizas formadas por cada isolado estão descritas a seguir:

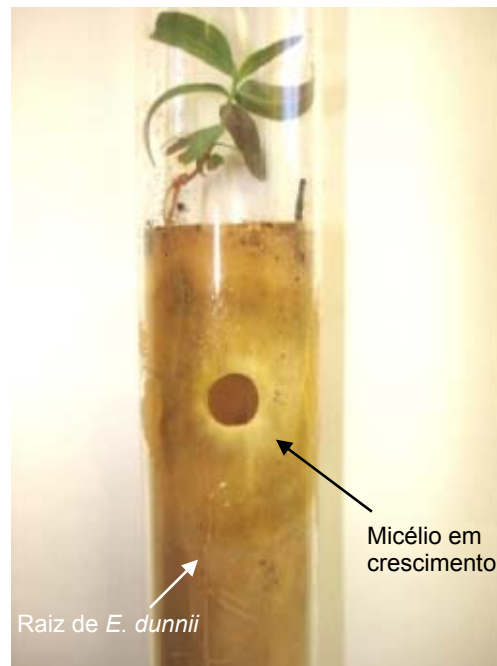


Figura 3.1. Aspecto geral do dispositivo de síntese micorrízica *in vitro*, mostrando o micélio do fungo crescendo sobre raízes de *Eucalyptus dunnii*

### 3.3.1 Aspecto das raízes colonizadas pelos diferentes isolados fúngicos ectomicorrízicos

#### a) Isolado SA9, *Scleroderma flavidum*

Os exemplares observados apresentaram uma delicada camada de hifas brancas cobrindo as raízes, não constituindo um manto verdadeiro, resultando apenas do crescimento do micélio sobre a raiz (Figura 3.2a). Além disso, os segmentos de raiz não apresentaram ramificações ou quaisquer outras características que indicassem colonização micorrízica. Esses segmentos mediam entre 0,5 e 1,5 mm de comprimento.

Confirmando esta afirmação, a observação dos cortes transversais ( $\varnothing=150 \mu\text{m}$ ) sob microscopia óptica, não revelou qualquer presença de manto fúngico ou rede de Hartig nas raízes. Não obstante a ausência dessas estruturas, ainda foram observados pêlos radiculares, um indicativo da ausência de colonização ectomicorrízica (Figura 3.2b).

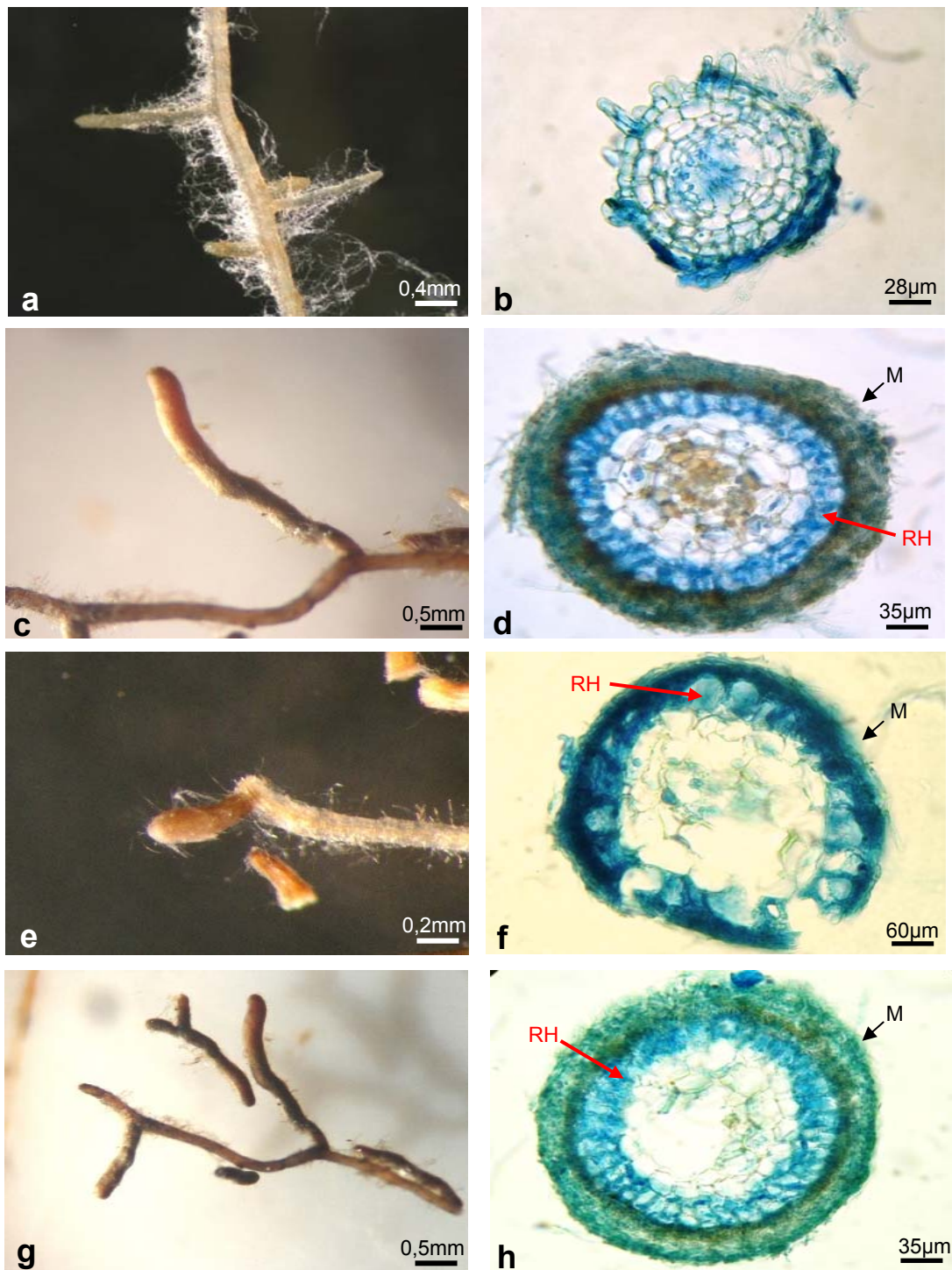


Figura 3.2. Raízes de *Eucalyptus dunnii* cultivadas sob condições axênicas. (a) raiz não colonizada coberta pelo micélio do isolado SA9 e (b) sua secção transversal. (c) Ectomicorriza formada pelo isolado UFSC-Pt132 e a respectiva (d) secção transversal. (e) Aspecto geral da ectomicorriza formada pelo isolado UFSC-Ch163 e (f) secção transversal da mesma micorriza. (g) Ectomicorriza formada pelo isolado UFSC-Pt188 e (h) sua secção transversal. **M** = Manto; **RH** = rede de Hartig.

b) Isolado UFSC-Pt132, *Pisolithus microcarpus*

As micorrizas formadas por esse isolado e mudas de *E. dunnii*, caracterizaram-se pelo aspecto levemente tortuoso, com ramificações irregulares, ou retas, quando não ramificadas. O comprimento dos segmentos variou entre 0,3 e 4,5 mm. O manto tinha uma textura granulada de cor marrom escuro, ou marrom claro nas regiões mais jovens (Figura 3.2c). Apresentava hifas de cor amarelada emanando de alguns pontos, mas não bastante organizadas para caracterizar uma rizomorfa. Alguns exemplares parecendo mais velhos apresentavam cor mais escura e um manto mais compacto, com menos hifas emanando.

Ao microscópio óptico, o manto apresentou apenas uma camada, compacta, com hifas alongadas, do tipo sinênquima em rede (*net synenchyma*), e media aproximadamente 38 µm de espessura. Observou-se a presença de estruturas semelhantes a grânulos, que aparentavam ser as extremidades de cada hifa. A rede de Hartig, facilmente visualizada mas de difícil definição, pareceu ser do tipo classificada por Goodman *et al.* (1996-1998), como comum e amplamente distribuída, apresentando linhas de hifas palmadas e simples, penetrando apenas até a primeira camada de células do córtex da raiz (Figura 3.2d). Não foram observados fíbulas nas hifas que emanavam do manto.

Essa rede de Hartig com baixo grau de penetração no córtex radicular caracteriza as micorrizas do tipo superficial amplamente encontradas em Angiospermae (CHILVERS, 1968; SMITH & READ, 1997).

c) Isolado UFSC-Ch163, *Chondrogaster angustisporus*

Muitas raízes estavam cobertas por hifas de cor branca, mas não aparentavam aspectos de raízes colonizadas, ou estavam ainda iniciando o processo de colonização. Algumas pontas de raízes curtas (0,1 a 0,6 mm) e sem ramificação, apresentavam colonização, com manto de cor marrom claro e textura levemente granulada. Não foram observadas rizomorfas, mas haviam algumas hifas de cor clara emanando do manto o que dava um leve aspecto feltroso (Figura 3.2e).

Analisando-se as secções transversais sob microscopia óptica, o manto revelou-se formado por apenas uma camada, densa e fina, com aproximadamente 8 µm de espessura, do tipo sinênquima em rede (*net synenchyma*), de hifas alongadas, sem espaço entre as células, com exceção das mais externas, dispostas mais frouxamente (Figura 3.2f). As hifas emanando do manto apresentavam fíbulas



(Figura 3.3) e mediam aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$  de espessura, sendo mais espessas que as hifas do manto. A rede de Hartig, embora fosse facilmente visível, era de difícil definição, mas aparentava ser do tipo palmada, à semelhança da rede de Hartig do morfotipo anterior. Essa rede, também como no caso precedente, penetrava apenas até a primeira ou, em alguns pontos, até à segunda camada de células do córtex da raiz.

Importante salientar que esse isolado é de uma espécie nova encontrada e descrita pela primeira vez no Brasil por Giachini *et al.* (2000) e esta é a primeira descrição das micorrizas formadas por essa espécie.

d) Isolado UFSC-Pt188, *Pisolithus microcarpus*

As micorrizas formadas por este isolado estavam sob uma densa camada de hifas de tonalidade ferruginosa, marrom-amarelada, que escureciam facilmente quando injuriadas. Após a remoção destas hifas, as micorrizas apresentavam-se tortuosas, com ramificações irregulares, algumas do tipo monopodial pinada e outras não ramificadas (Figura 3.2g), com o comprimento dos segmentos variando entre 0,2 e 5 mm. O manto, de cor marrom, com a tonalidade variando de clara a escura, apresentou textura granulosa, com hifas de cor amarelada emanando de alguns pontos. Em apenas um exemplar foi observada a presença de rizomorfias, formadas por hifas da mesma cor do manto. Foram observados, também, micorrizas de menor espessura e com manto menos denso, apresentando hifas frouxamente dispostas de cor marrom cobrindo as raízes, tratando-se, possivelmente, de micorrizas ainda em processo de formação.

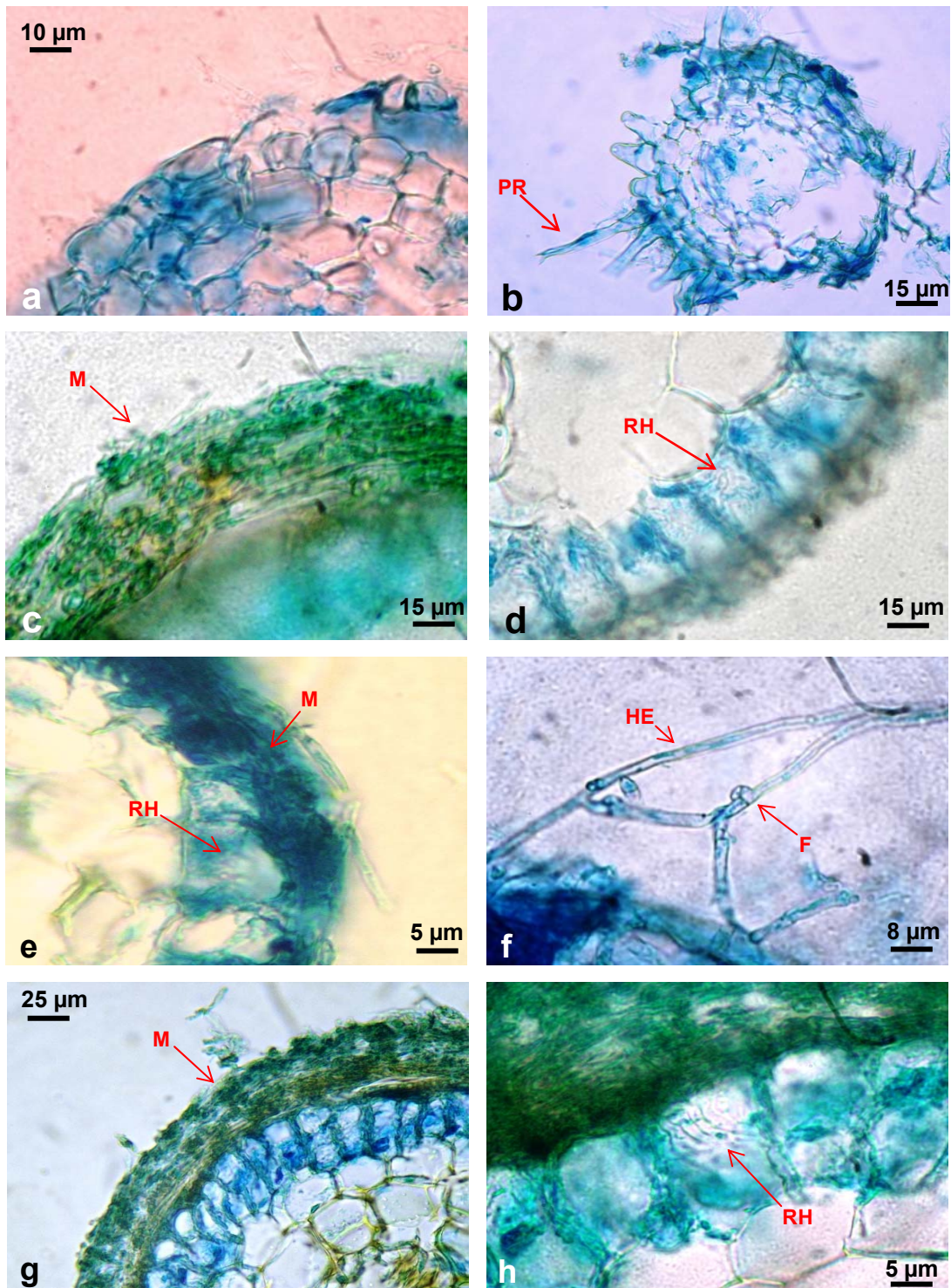


Figura 3.3. Secções transversais de ectomicorizas de *Eucalyptus dunnii* em detalhes. (a) Raiz de *E. dunnii* inoculada com o isolado SA9 e não colonizada, sem manto e rede de Hartig aparentes e (b) com pêlos radiculares. (c) Detalhe do manto e (d) rede de Hartig formados pelo isolado UFSC-Pt132. (e) Manto, rede de Hartig, hifas extra-matriciais e (f) fibulas de ectomicoriza formada pelo isolado UFSC-Ch163. (g) Manto e (g, e) rede de Hartig formados pelo isolado UFSC-Pt188. P = pêlos radiculares; M = manto; RH = rede de Hartig; HE = hifas extra-matriciais; F = fíbula

Microscopicamente, as micorrizas apresentaram manto com apenas uma camada compacta de células alongadas, com aproximadamente 34  $\mu\text{m}$  de espessura, do tipo sinênquima em rede (*net synenchyma*), com estruturas semelhantes a grânulos, possivelmente representando as extremidades das hifas (Figura 3.2h). O manto apresentou hifas emanando de alguns pontos, em que não foram observadas fíbulas. A rede de Hartig atingia apenas a primeira camada células do córtex da raiz e era do tipo palmada, considerada por Goodman *et al.* (1996-1998) como sendo do tipo comum e amplamente distribuída.

Notou-se que os dois isolados da espécie *Pisolithus microcarpus*, UFSC-Pt132 e UFSC-Pt188, apresentavam o mesmo morfotipo, apesar de se diferenciarem em seus aspectos culturais (cor das colônias, velocidade de crescimento) (Souza, 2003) e de infectividade e eficiência simbióticas, conforme pode ser visto no capítulo 2 da presente dissertação, onde foi demonstrado que o isolado UFSC-Pt132 apresentava baixa intensidade de colonização das raízes de *E. dunnii* e pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento ou a nutrição fosfatada dessa planta.

A dificuldade de se distinguir entre micorrizas formadas por diferentes isolados de uma mesma espécie fúngica, demonstra a falta de adequação da morfotipagem como estratégia para quantificar a colonização radicular simultânea desses isolados quando aplicados em inoculantes mistos. Ou, ainda, para distinguir sob condições de viveiro as micorrizas formadas por isolados introduzidos pela inoculação e as formadas por eventuais contaminantes fúngicos ectomicorrízicos da mesma espécie. Entende-se, assim, que seja necessária a aplicação de outros métodos para a distinção das micorrizas formadas por cada um destes isolados, como por exemplo, técnicas utilizando ferramentas de biologia molecular.

A morfotipagem é, por outro lado, bastante útil quando se trata de distinguir micorrizas formadas por fungos de natureza taxonômica distinta. No caso do isolado de *C. angustisporus*, UFSC-Ch163, suas micorrizas foram bastante distintas das micorrizas dos isolados de *Pisolithus*, discutidos anteriormente.

A técnica de síntese *in vitro* em tubos mostrou-se adequada para a formação de ectomicorrizas em *E. dunnii*. A ausência de micorrizas nas plantas inoculadas com o isolado SA9, *Scleroderma flavidum*, parece ser devida à falta de infectividade desse fungo em relação a essa planta. Num experimento em casa de vegetação,

Souza (2003) também observou esse fenômeno de falta de infectividade desse isolado em relação à mudas de *E. dunnii*.

É possível que esse fungo, isolado de plantações de *E. camaldulensis* na Austrália, não apresente compatibilidade simbiótica com a espécie *E. dunnii*, embora esse pareça ser um fenômeno raro na associação ectomicorrízica em espécies do gênero *Eucalyptus*. Exemplos de especificidade são mais comum entre fungos ectomicorrízicos e plantas de diferentes táxons. Giachini *et al.* (2000, 2004) observaram esse fenômeno entre espécies do gênero *Scleroderma* em relação a *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. em plantações de Santa Catarina. *Scleroderma areolatum*, *S. bougheri* e *S. cepa*, só foram encontradas associadas a *Eucalyptus* spp., enquanto que *S. citrinum*, *S. uruguayense* e *S. floridanum* só foram observadas em plantações de *Pinus* spp.

Entretanto, não se pode descartar a hipótese de uma especificidade de grau mais elevado entre esse isolado e espécies diferentes de *Eucalyptus*. Oliveira *et al.* (1994) apresentaram evidências significativas de ocorrência de compatibilidade espécie-específica entre alguns fungos ectomicorrízicos e as espécies *E. dunnii* e *E. viminalis*, sob condições controladas de casa de vegetação.

Sugere-se que mais estudos sejam realizados, envolvendo outras técnicas de síntese *in vitro* para confirmar a possibilidade do estabelecimento de simbiose entre o isolado SA9 e *E. dunnii*.

Os resultados demonstram que a morfotipagem não apresenta sensibilidade suficiente para distinguir isolados da mesma espécie quando associados às raízes hospedeiras. Porém, a técnica mostra-se adequada quando se trata de diferenciar micorrizas formadas por fungos de diferentes grupos taxonômicos.

Para ser amplamente aceita, esta última afirmação deverá ser, porém, testada com novos estudos envolvendo maior número de fungos pertencentes a diferentes gêneros e famílias.

### 3.4 CONCLUSÕES

- As micorrizas formadas por *Chondrogaster angustisporus*, isolado UFSC-Ch163, são bastante distintas das micorrizas de *Pisolithus microcarpus* e podem ser diferenciadas por morfotipagem;

- As ectomicorrizas formadas pelos isolados UFSC-Pt132 e UFSC-Pt188, da espécie *Pisolithus microcarpus*, apresentam as mesmas características anatômicas macroscópicas e microscópicas, não sendo possível a distinção através de técnicas de morfotipagem;
- O isolado SA9, *Scleroderma flavidum*, não forma ectomicorrizas em *Eucalyptus dunnii* nas condições de síntese axênica empregada neste estudo;
- A técnica de síntese axênica em tubos é adequada para a síntese de ectomicorrizas a partir de fungos ectomicorrízicos e plântulas de *Eucalyptus dunnii*.

## CAPÍTULO 4

### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Chondrogaster angustisporus*, ISOLADO UFSC-Ch163

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Esta parte do estudo foi realizada na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, sob a supervisão da Professora Zaida Inês Antonioli.

A dificuldade de se obter um produto de amplificação para a maioria dos isolados impediu que fosse feito seqüenciamento de todos durante o estágio na UFSM. Entretanto, novas tentativas de amplificação permitiram obter DNA suficiente para o seqüenciamento do isolado UFSC-Ch163. Esse isolado teve sua região ITS submetida a seqüenciamento após a amplificação. Atenção especial foi dada a esse isolado, por pertencer a uma espécie nova, descoberta no Brasil e recentemente descrita por Giachini *et al.* (2000). Além disso, esse isolado tem se mostrado eficiente na promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* (SOUZA *et al.*, 2004) e vem sendo estudado pelo Laboratório de Ectomicorrizas da UFSC com vistas à produção de inoculantes comerciais para aplicação em viveiros (ROSSI, 2006).

*Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira, é um fungo hipógeo, encontrado no solo, solitário, ou mais freqüentemente em grupos de várias frutificações, embebidas numa massa miceliana profusa e branca, sob *E. dunnii* Maiden, em Santa Catarina (GIACHINI *et al.*, 2000). Essa espécie também foi coletada na Austrália por J. M. Trappe, M. A. Castellano, A. W. Claridge, e N. Malajczuk, na Austrália, sob *Eucalyptus* spp., e em Montevideu, Uruguai, por V. L. Oliveira e G. Malvarez, sob *E. grandis* (GIACHINI *et al.*, 2000). Mais recentemente, *C. angustisporus* foi observada em plantações de eucalipto na Espanha por Alvarez & Cerceda (2005).

A biologia molecular mostra-se como uma importante ferramenta de estudo, pois permite identificar a espécie fúngica quando esta já se encontra associada ao

sistema radicular hospedeiro, desde que seja feita a escolha adequada das técnicas e das ferramentas moleculares a serem empregadas. A caracterização das comunidades micorrízicas utilizando técnicas de biologia molecular envolve a extração de DNA fúngico nas raízes colonizadas; a amplificação deste DNA pela técnica de PCR (MULLIS & FALOONA, 1987), utilizando iniciadores (*primers*) específicos para fungos; digestão por enzimas de restrição para produzir padrões de fragmentos específicos para cada isolado, ou mesmo o seqüenciamento de regiões específicas de certos genes.

A escolha da região ITS baseia-se em seu caráter altamente conservado nos organismos, aliado a uma certa variabilidade que permite a distinção entre espécies e até mesmo entre indivíduos diferentes (isolados) (WHITE *et al.*, 1990; EGGER, 1995).

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Extração do DNA do isolado fúngico ectomicorrízico UFSC-Ch163,

#### *Chondrogaster angustisporus*

A cultura matriz desse isolado faz parte da coleção de culturas de fungos ectomicorrízicos do Laboratório de Ectomicorrizas da Universidade Federal de Santa Catarina. O fungo foi isolado a partir de carpóforos coletados em plantação de *E. dunnii* em Correia Pinto, SC, em 1997 por A. J. Giachini e V. L. Oliveira (GIACHINI *et al.*, 2004).

Na coleção de culturas de fungos ectomicorrízicos do Depto. de Microbiologia e Parasitologia da UFSC, esse fungo é mantido em meio MNM sólido, no qual a sacarose, presente no meio original (Melin-Norkrans) na concentração de 2,5 g.L<sup>-1</sup> (NORKRANS, 1949), é substituída pela glicose na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> (MARX, 1969). A esse meio, são adicionados 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado para prolongar a viabilidade das culturas.

Como a maior parte dos fungos ectomicorrízicos já estudados, *C. angustisporus*, isolado UFSC-Ch163, apresenta crescimento lento em laboratório quando comparado a microrganismos de vida livre. Em meio líquido, esse isolado apresenta uma velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) de 0,19.dia<sup>-1</sup>, e uma produtividade de 0,26 g.L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (ROSSI, 2006).

O fungo foi cultivado em 25 mL de meio MNM em frascos do tipo erlenmeyer, durante 20 dias, à temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , em incubadora do tipo B.O.D. Após esse período, os tapetes micelianos formados na superfície do meio foram assepticamente transferidos para frascos reagentes em borosilicato com tampa rosqueável, com 100 mL de capacidade e, em seguida, congelados à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento de serem transportados de Florianópolis a Santa Maria, onde foram realizados os procedimentos de biologia molecular. O transporte deu-se em caixas de isopor providas de gelo seco. Chegando ao local de destino o material foi novamente colocado em congelador até o momento da extração do DNA.

Antes de iniciar a extração, os frascos foram deixados à temperatura ambiente para descongelamento do micélio. Para evitar interferências nas reações de PCR e no seqüenciamento, o excesso de líquido foi retirado com o auxílio de papel absorvente. Pela mesma razão, foram retirados os pedaços de meio de cultura sólido, remanescentes dos discos de micélio utilizados para iniciar as culturas em meio líquido.

Depois de seco, o micélio foi colocado em um gral de porcelana, com o auxílio de uma espátula esterilizada, e congelado com um jato de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) líquido. Imediatamente após, o micélio foi macerado com pistilo até ser transformado em pó. O micélio utilizado para esse fim foi produzido conforme descrito no item 4.2.1. Para o seqüenciamento, cerca de 300 mg micélio fresco foram empregados e a extração do DNA foi realizada conforme técnica descrita por Roy *et al.* (1992). O micélio foi inicialmente congelado em nitrogênio líquido e macerado em 600  $\mu\text{L}$  de 2 % CTAB [100 mL de água ultrapura, 1,4 M NaCl, 20 mM de EDTA, 2 % de CTAB, 100 mM de Tris-HCl, a pH 8,0]. Após a maceração, a suspensão miceliana foi homogeneizada durante 1 min e incubada em banho-maria a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 60 min. Após a incubação, foi feita uma nova homogeneização durante 5 min, adicionando-se uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamil (25:24:1), seguida por centrifugação a 18.894 rcf, rotor 12130, durante 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , numa centrífuga 4K15 da marca Sigma Laboratory.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi lavado em 100  $\mu\text{L}$  de etanol 80 % gelado. Após 5 min, o *pellet* foi novamente centrifugado a 18.894 rcf durante 10 min. Eliminou-se, então, o sobrenadante e, após evaporação do etanol, o *pellet* foi ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de água ultra pura e armazenado em congelador, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Após a extração do DNA, o material foi tratado com uma solução de RNAase (10 mg.mL<sup>-1</sup>) correspondendo a 2 % do volume a 37 °C em banho-maria, durante 30 min. A presença de DNA nesse material foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1,2 %) contendo 0,5 µL de brometo de etídio.

#### 4.2.2 Amplificação e seqüenciamento da região ITS do DNA de *Chondrogaster angustisporus*, isolado UFSC-Ch163

A amplificação da região ITS do isolado UFSC-Ch163 foi feita com *primers* específicos para fungos asco e basidiomicetos: ITS1 (5' TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE *et al.*, 1990). A reação de amplificação (PCR) foi feita com 1,0 µL do DNA; 2,5 µL de o tampão de PCR 10X; 3,0 µL dos dNTPs (1,5 mM); 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (20 mM); 3,0 µL de cada *primers* (25 pmoles); 0,5 U de *Taq* polimerase (5 U.µL<sup>-1</sup>); e 10,5 µL de água ultrapura.

A amplificação ocorreu num termociclador modelo PTC-100 da MJ Research, INC, com as seguintes condições: primeira extensão a 94 °C durante 30 s; desnaturação a 94 °C durante 45 s, temperatura de anelamento de 55 °C (30 s) durante 35 ciclos com uma extensão final a 72 °C durante 10 min. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,2 % (P:V) em tampão TBE (SAMBROOK *et al.*, 1989), corado com brometo de etídio e observado sob luz UV (360 nm). Esse produto foi mantido sob refrigeração, a 4 °C, até o momento de sua utilização.

Antes do seqüenciamento, esse produto foi purificado de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Primeiramente, o produto recebeu igual volume de PEG 8000 a 13 % PEG (10 mL de água ultrapura, 1,3 g de PEG e 0,94 g de NaCl) (DUNN & BLATTNER, 1987) e foi mantido sob refrigeração durante 12 h. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada a 18.894 rcf durante 15 min. A solução de PEG foi, então, eliminada e foram adicionados 200 µL de uma solução de álcool etílico a 70 %. Uma nova centrifugação de 18.894 rcf foi aplicada durante 10 min. O álcool foi eliminado e o DNA foi ressuspendido em água ultra pura.

O seqüenciamento foi feito usando uma cópia de DNA de dupla fita oriunda do produto de PCR (70 ng) e 1 µM de cada um dos primers ITS1 e ITS4, seguindo-se as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante do seqüenciador Mega BACE

500, da Amersham Biosciences. As seqüências foram editadas com o programa EditSeq e alinhada através do programa MegaAlign DNASTAR (Lasergene, 1994). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de genes NCBI Blast Genbank (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Seqüenciamento da região ITS de *Chondrogaster angustisporus*, isolado UFSC-Ch163

A amplificação do gene rRNA de *Chondrogaster angustisporus* (isolado UFSC-Ch163), com os *primers* ITS1 e ITS4 produziu um fragmento de 610 pb, compreendendo as regiões ITS1 e ITS2, incluindo a porção codificando para a subunidade 5,8S (Figura 4.1). Para este isolado fúngico, essas regiões apresentaram um total de 237 e 210 pb, respectivamente. A seqüência insere-se na mesma amplitude de comprimento das regiões ITS1 e ITS2 de outros fungos ectomicorrízicos, disponíveis no banco de dados do "National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank", apesar da variação observada entre as diferentes espécies ou isolados.

Quando a seqüência de *C. angustisporus* UFSC-Ch163 foi analisada em conjunto com as dez seqüências mais similares obtidas no NCBI Genbank, observou-se a formação de dois grupos distintos, indicando que *C. angustisporus* é um isolado diferente (Figura 4.2). Na árvore filogenética obtida, o comprimento de cada par de ramos representa a distância entre os pares de seqüência calculada com base no alinhamento das seqüências.

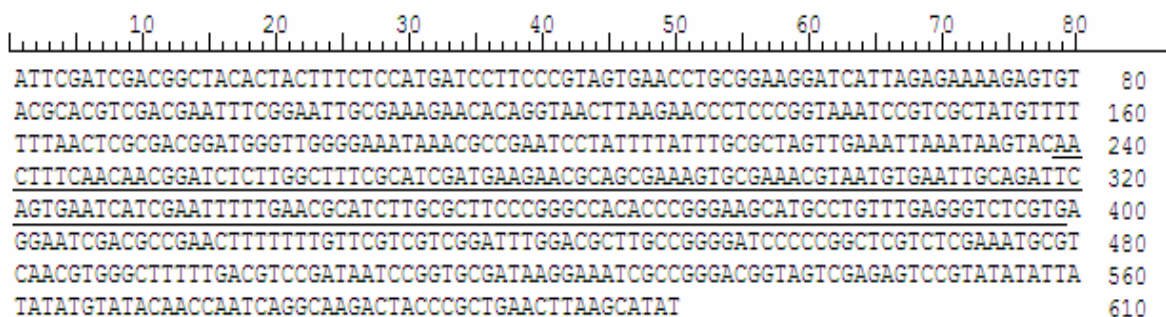


Figura 4.1. Seqüência de nucleotídeos da região ITS do fungo ectomicorrízico *Chondrogaster angustisporus*, isolado UFSC-Ch163, gerada pelo *software* Seqman, DNASTAR. A região sublinhada representa a porção do gene rRNA que codifica para a subunidade 5,8S do RNA ribossômico. Região ITS1: 1 – 238; 5,8S: 239 – 399; região ITS2: 400 – 610.

Considerando-se as dez seqüências mais similares a *C. angustisporus*, quando a seqüência desse fungo (EF989122) foi comparada às seqüências registradas no NCBI Genbank, esse isolado formou um agrupamento (*cluster*) separado com um fungo ectomicorrízico não identificado e não cultivado, registrado no NCBI sob o número AM412270, oriundo do arquipélago das Seicheles (TEDERSOO *et al.*, 2007). As nove outras seqüências, registros DQ365637, AM412270, AJ408353, AF377077, AJ292294, AY872281, DQ672289, DQ974736 e DQ365606, formaram agrupamentos separados.

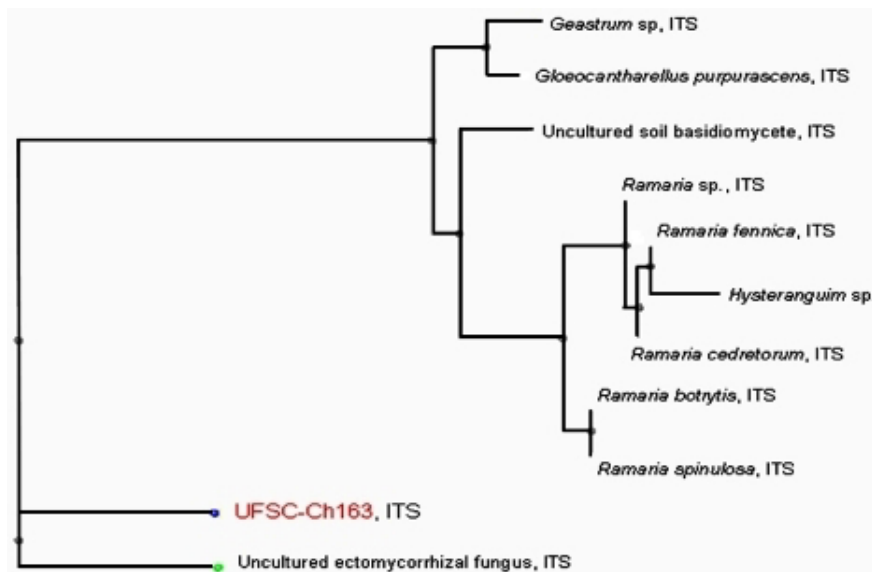


Figura 4.2. Dendrograma baseado na seqüência da região ITS de *Chondrogaster angustisporus* isolado UFSC-Ch163 obtido com o programa Clustal DNASTAR. As seqüências de outras espécies foram obtidas junto ao GenBank - National Center of Biotechnology Information (NCBI).

A porcentagem de similaridade entre a seqüência da região ITS de *C. angustisporus*, isolado UFSC-Ch163, e as seqüências dessa mesma região dos dez fungos ectomicorrízicos com maior porcentagem de similaridade, disponíveis no NCBI, variou de 82 a 100 % (Tabela 4.1). Esses resultados indicam uma afinidade significativa entre *Chondrogaster angustisporus* e espécies dos gêneros *Gloeocantharellus*, *Ramaria*, *Gautieria*, *Gomphus*, *Hysterangium* e *Sphaerobolus*, além do elevado grau de similaridade (100 %) com a seqüência de um fungo ectomicorrízico não identificado coletado nas Seicheles, também disponível no banco de dados do NCBI.

Características morfológicas já foram usadas para descrever a espécie *Chondrogaster angustisporus* (GIACHINI *et al.*, 2000). O presente estudo constitui-

se no primeiro seqüenciamento da região ITS desse fungo ectomicorrízico coletado em plantações de *Eucalyptus dunnii*, em Santa Catarina. Verificou-se que a seqüência da região ITS de *C. angustisporus* apresenta grande similaridade em relação às seqüências da região ITS de outros fungos ectomicorrízicos obtidas por outros autores e disponíveis no banco de genes do NCBI.

Tabela 4.1. Afinidade entre *Chondrogaster angustisporus*, isolado UFSC-Ch163, e os dez fungos mais estreitamente relacionados de acordo com a seqüência da região ITS do gene rRNA

Organismo	Identidade (%)	Registro*	Referências
<i>Gomphus clavatus</i>	90	DQ365637	Dunham <i>et al.</i> (2006)
fEMC, não cultivado	100	AM412270	Tedersoo <i>et al.</i> (2007)
<i>Ramaria cedretorum</i>	91	AJ408353	Daniels <i>et al.</i> (2001)
<i>Gautieria</i> sp.	90	AF377077	Bidartondo <i>et al.</i> (2001)
<i>Ramaria botrytis</i>	91	AJ292294	Daniels <i>et al.</i> (2001)
<i>Gloeocantharellus purpurascens</i>	91	AY872281	Hughes <i>et al.</i> (2004)
Basidiomiceto não cultivado	90	DQ672289	Midgley <i>et al.</i> (2007)
<i>Hysterangium</i> sp.	82	DQ974736	Smith <i>et al.</i> (2007)
<i>Ramaria</i> sp.	91	DQ365606	Dunham <i>et al.</i> (2006)
<i>Sphaerobolus</i> sp.	90	DQ979014	Tlapa <i>et al.</i> (2006)
<i>Chondrogaster angustisporus</i>	100	EF989122	Este trabalho

\* Número de registro do Genbank – National Center of Biotechnology Information (NCBI).

(site: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

fEMC: fungo ectomicorrízico

O alto grau de similaridade com espécies dos gêneros *Gloeocantharellus*, *Ramaria*, *Gautieria*, *Gomphus*, *Hysterangium* e *Sphaerobolus*, reforça a recente proposta que classifica o gênero *Chondrogaster* numa nova subclasse, Phallomycetidae, formada pelo agrupamento das ordens Gomphales e Phallales, baseada nas seqüências dos genes nuc-LSU-rRNA e mt-SSU-rRNA e de proteínas (HOSAKA *et al.*, 2006).

O sucesso no seqüenciamento da região ITS de *C. angustisporus* com os *primers* ITS1 e ITS4, indica a boa adequação desses *primers* para a amplificação dessa região em fungos (WHITE *et al.*, 1990; PRITSCH *et al.*, 2000; WRIGHT *et al.*, 2000). Esse seqüenciamento vem contribuir para uma melhor compreensão da diversidade genética dos fungos ectomicorrízicos que é, ainda, muito deficiente na maioria dos casos. Acredita-se que a região ITS em fungos apresenta uma evolução muito lenta contendo, assim, uma variação na seqüência de nucleotídeos que é

adequada ao estudo das relações filogenéticas em nível molecular entre espécies ou isolados (AMICUCCI *et al.*, 1998; FARMER *et al.*, 1998).

A seqüência da região ITS obtida poderá facilitar o desenvolvimento de *primers* específicos para uso em procedimentos confiáveis de identificação ou detecção de *Chondrogaster angustisporus*, independentemente das condições ambientais ou dos hospedeiros. Isso contribuirá para estudos da diversidade de plantas hospedeiras, permitindo estabelecer se esse fungo é um simbionte específico de plantas do gênero *Eucalyptus*, como indicam as informações disponíveis até o momento, ou se este é capaz de se associar a outras plantas da família Myrtaceae, de grande importância em florestas sub-tropicais do Brasil (Mata Atlântica), ou mesmo de outras famílias. No sul do Brasil, as plantações de *Eucalyptus* spp. convivem, lado a lado, com plantações de *Pinus* spp. e com áreas de florestas nativas.

O desenvolvimento de técnicas confiáveis para a identificação desse fungo também é importante para a implantação de programas de controle da micorrização, quando for necessária a detecção dos fungos nas raízes das plantas inoculadas no viveiro e após seu transplante para o campo. Isso permitirá acompanhar sua persistência nas raízes em presença dos fungos naturalmente presentes nesses locais.

Novos estudos são, no entanto, necessários para comparar a seqüência da região ITS do isolado UFSC-Ch163 a outros isolados da mesma espécie ou mesmo a outras espécies do gênero *Chondrogaster*, de modo a esclarecer o polimorfismo em nível inter e intraespecífico dessa região do gene rRNA desse promissor fungo ectomicorrízico.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

- Os *primers* ITS1 e ITS4 são adequados para o seqüenciamento da região ITS de *Chondrogaster angustisporus*;
- *Chondrogaster angustisporus* apresenta grande afinidade filogenética com outros fungos ectomicorrízicos da subclasse Phalomycetidae;
- A obtenção da seqüência de *Chondrogaster angustisporus*, UFSC-Ch163, pode contribuir para o desenvolvimento de técnicas confiáveis para a identificação desse isolado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERER, R. 1987-1993. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Schwäbisch Gmünd, Germany.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. **Introductory micology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 869p.
- ALLEN, M. F. 1991. **The ecology of mycorrhizae**. Cambridge: Cambridge University Press, 184p.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 25, pp. 3389-3402.
- ALVAREZ, M. L.; CERCEDA, M. C. 2005. *Chondrogaster angustisporus*, nueva cita para europa. **Cryptogamie Mycologie**. Paris, v. 26, pp. 113-122.
- ALVES, J. R.; SOUZA, O.; PODLECH, P. A. S.; GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L. 2001. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 36, n. 2, pp. 307-313.
- ALVES, L. 2006. Solubilização de nutrientes contidos em rochas por fungos ectomicorrízicos. 99p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- AMICUCCI, A.; ZAMBONELLI, A.; GIOMARO, G.; POTENSA, L.; STOCCHI, V. 1998. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 7, pp. 173 - 277.
- ASPRAY, T. J.; FREY-KLETT, P.; JONES, J. E.; WHIPPS, J. M.; GARBAYE, J.; BENDING, G. D. 2007. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. **Mycorrhiza**. New York, v. 16, pp. 533-541.
- BOUGHER, N. L.; GROVE, T. S.; MALAJCZUK, N. 1990. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* B. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. **New Phytologist**. New York, v. 114, pp. 77-85.



- GARBAYE, J. 1984. Compétitivité de champignons ectomycorhiziens: premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorhization contrôlée du hêtre et du chêne rouvre dans le nord-est de la France. **Revue Forestière Française**. Nancy, v. 36, pp. 33-43.
- GARBAYE, J. 1990. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In: STRULLU, D. G. (ed.). **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**. Paris: Lavoisier, pp. 197-250.
- GARBAYE, J. 1991. Biological interactions in the mycorrhizosphere. **Experientia**. Basel, v. 47, pp. 370-375.
- GARBAYE, J.; BOWEN, G. D. 1989. Stimulation of ectomycorrhizal infection of *P. Radiata* by some microorganisms associated with the mantle of mycorrhizas. **New Phytologist**. New York, v. 112, pp. 383-388.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. 1993. ITS Primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 2, pp. 113-118.
- GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L.; CASTELLANO, M. A.; TRAPPE, J. M. 2000. Ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus and Pinus plantations in southern Brazil. **Mycologia**. Lawrence, KS, v. 92, pp. 1166-1177.
- GIACHINI, A. J.; SOUZA, L. A. B. OLIVEIRA, V. L. 2004. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza**. New York, v. 14, pp. 375-381.
- GIOVANETTI, M. G.; MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**. New York, v. 84, pp. 489-500.
- GOODMAN, D. M.; DURALL, D. M.; TROFYMOW, J. A.; BERCH, S. M. 1996-1998. **A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae**. Mycologue Publications. Sidney, 110 p.
- GRAMSS, G.; KIRSCH, B.; VOIGT, K. D.; GUNTHER, T.; FRITSCH, W. 1999. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. **Mycological Research**. New York, v. 103, pp. 1009–1018.
- GUEHL, J. M.; MOUSAIN, D.; FALCONNET, G.; GRUEZ, J. 1990. Growth, carbon dioxide assimilation capacity and water-use efficiency of *Pinus pinea* L. seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi. **Annales des Sciences Forestières**. Paris, v. 47, pp. 91-100.



HAWKSWORTH, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**. New York, v. 95, pp. 641-655.

HAWKSWORTH, D. L. 1993. The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis, and prognosis. In: S. ISAAC, J.C. FRANKLAND, R. WATLING, A.J.S. WHALLEY (eds.). **Aspects of tropical mycology**. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 265-293.

HOSAKA, K.; BATES, S. T.; BEEVER, R. E.; CASTELLANO, M. A.; COLGAN, W.; DOMINGUEZ, L. S.; NOUHRA, E. R.; GEML, J.; GIACHINI, A. J.; KENNEY, S. R.; SIMPSON, N. B.; SPATAFORA, J. W.; TRAPPE, J. M. (2006) Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. **Mycologia**. Lawrence, v. 98, pp. 949-959.

INGLEBY, K.; MASON, P. A.; LAST, F. T.; FLEMING, L. V. 1990. **Identification of ectomycorrhizas**. Institute for Terrestrial Ecology, Natural Environmental Research Council, U.K. Res. Publ. No. 5, London, 112p.

KEAST, D.; TONKIN, C. 1983. Antifungal activity of western australian soil actinomycetes against *Phytophthora* and *Pythium* species and a mycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*. **Australian Journal of Biological Sciences**. Melbourne, v. 36, pp. 191-203.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. 2001. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi**. 9<sup>th</sup> ed. CAB International, Wellingford, 616p.

KOIDE, R. T.; XU, B.; SHARDA, J.; LEKBERG, Y.; OSTIGUY, N. 2004. Evidence of species interactions within an ectomycorrhizal fungal community. **New Phytologist**. New York, v. 165, pp. 305–316.

KOPE, H. H.; FORTIN, J. A. 1990. The efficacy and variation in the production of antifungal antibiotic metabolites by *Pisolithus arhizus*. In: M. F. ALLEN, S. E. WILLIAMS (eds.), **Proceedings of the 8<sup>th</sup> NACOM**, University of Wyoming, Jackson, 169p.

LAPEYRIE, F. F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. 1991. Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 69, pp. 342-346.

LASERGENE. 1994. **User's guide: A manual for the Lasergene System**. Madison. Biocomputing software for windows, 253 p.

MARSCHNER, H.; DELL. B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. In: **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. A. D. Robson; L. K. Abbott; N. Malajczuk (eds.). Dordrecht, pp. 89-102.

MARTIN, K. J.; RYGIIEWICZ, P. T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**. London, v. 5

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

MARX, D. H. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. **Annual Review Phytopathology**. Pablo Alto, v. 10, pp. 429-454.

MARX, D. H. 1980. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: P. MIKOLA (Ed.) **Tropical Mycorrhiza Research**. Oxford: Pub. Clarendon Press, pp. 13-71.

MARX, D. H. 1991. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In: **The Marcus Wallenberg foundation Symposia Proceedings:7**. Stockolm: M. Wallenberg Foundation, pp. 54-90.

MARX, D. H.; CORDELL, C. E. 1989. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: J. M. WHIPPS; R. D. LUMSDEN (eds.). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. New York: pp. 1-25.

MARX, D. H.; MAUL, S. B.; CORDELL, C. E. 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in Wood Forestry. In: G. F. LEATHAM (Ed.). **Frontiers in Industrial Mycology**. New York: Chapman & Hall, pp. 78-98.

MARX, D. H.; RUEHLE, J. L.; CORDELL, C. E. 1991. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: J. R. NORRIS; D. J. READ; A. K. VARNA (Eds.) **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, v. 23, pp. 471-411.

MEHARG, A. A.; CAIRNEY, J. W. G.; MAGUIRE, N. 1997a. Mineralization of 2,4-dichlorophenol by ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with pine. **Chemosphere**. Kingswood, v. 34, pp. 2495-2504.

MEHARG, A. A.; DENNIS, G. R.; CAIRNEY, J. W. G. 1997b. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by ectomycorrhizal basidiomycetes. **Chemosphere**. Kingswood, v. 35, pp. 513-521.

MOLINA, R.; TRAPPE, J. M. 1984. Mycorrhiza management in bareroot nurseries. In: M. L. DURYEY; T.D. LANDIS (eds.). **Forestry nursery manual: production of bareroot seedlings**. Lancaster: Martinus Nijhoff, pp. 211-213.

MULLIS, K.; FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**. San Diego, v. 155, pp. 335-350.

NARLOCH, C. 2002. **Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos - fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L.** 153p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NORKRANS, B. 1949. Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species, **Svensk Botanisk Tidskrift**. Stockholm, v. 43, pp. 485-490.

OLIVEIRA, L. P. 2004. Produção de inoculante, seleção e aplicação de fungos ectomicorrízicos em mudas de *Pinus taeda* L. 77p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, L. P.; ROSSI, M. J.; FURIGO JR. A.; SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. 2006. Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculum produced in an airlift bioreactor and immobilized in calcium alginate, **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 37, pp. 251-255.

OLIVEIRA, V. L.; GARBAYE, J. 1989. Lês microorganismes auxiliares de l'établissement des symbioses mycorrhiziennes. **European Journal of Forest Pathology**. Berlin, v. 19, pp. 54-64.

OLIVEIRA, V. L.; GIACHINI, A. J. 1999. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: J. O. SIQUEIRA; F. M. S. MOREIRA; A. S. LOPES; L. R. G. GUILHERME; V. FAQUIN; A.E. FURTINI NETO; J. G. CARVALHO (eds.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, pp. 775-796.

OLIVEIRA, V. L.; SCHMIDT, V. D. B.; GOMES, N. C.; MAIA, D. C. 1994. Spécificité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. **Agronomie**. Paris, v. 14, pp. 57-62.

PAUL, E. A.; CLARK. F. E. 1989. **Soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press Limited, 213p.

PIROZYNSKI, K. A. 1981. A interactions between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 59, pp. 1824-1827.

PIROZYNSKI, K. A.; MALLOCH, W. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **BioSystems**. Clare, v. 6, pp. 153-164.

PRITSCH, K.; MUNCH, J.-C.; BUSCOT, F. 2000. Identification and differentiation of mycorrhization of mycorrhizal isolates of black alder by sequence analysis of the ITS region. **Mycorrhiza**. New York, v. 10, pp. 87-93.

RAIJ, B. van. 1991. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo/Piracicaba: Ceres/POTAFOS, 343p.

RAIJ, B. van; ROSAND, P. C.; LOBATO, E. 1982. Adubação fosfatada no Brasil. In: **Adubação fosfatada no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, pp. 9-28.

- ROSSI, M. J. 2006. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift**. 188p. Tese. (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- ROY, A.; FRASCARIA, N.; MACKAY, J.; BOUSQUET, J. 1992 Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 85, pp. 173-180.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 999p.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. 1997. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 605p.
- SOUZA, L. A. B. 2003. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 100p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SOUZA, L. A. B.; SILVA FILHO, G. N., OLIVEIRA, V. L. 2004. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção de crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 39, pp. 349-355.
- SUMMERBELL, R. C. 1989. Microfungi associated with the mycorrhizal mantle and adjacent microhabitats within the rhizosphere of black spruce. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 67, pp. 1085-1095.
- SYLVIA, D. M.; SINCLAIR, W. A. 1983. Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Phytopathology**. St. Paul, v. 73, pp. 390-397.
- TEDERSOO, L.; SUVI, T.; BEAVER, K.; KÕLJALG, U. 2007. Ectomycorrhizal fungi of the Seychelles: diversity patterns and host shifts from natives *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). **New Phytologist**. Oxford, v. 175, pp. 321-333.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. 1995. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2ª ed. Porto Alegre: UFRGS. 174p.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. INNIS, D.H. GELFAND, J. J. SNINSKY, T. J. WHITE (eds), **PCR protocols: a Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, pp. 315-322.
- WILCOX, H. E. 1990. Mycorrhizal Associations. In: J. P. NAKAS, C. HAGEDORN (eds), **Biotechnology of plant-microbe interactions**. New York: McGraw-Hill, pp. 227-255.

WRIGHT, D. P.; SCHOLLES, J. D.; READ, D. J.; ROLFE, S. A. 2000. Changes in carbon allocation of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. **Plant, Cell and Environment**. Oxford, v. 23, pp. 39-49.

YANG, C. S.; WILCOX, H. E. 1983. Technique for observation of mycorrhizal development under monoxenic conditions. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 62, pp. 251-254.

## ANEXO 1

### PROTOCOLO DE PREPARO DE 1 L DA SOLUÇÃO P-B (MOLIBDATO DE AMÔNIO)

- a) Dissolver 3,8 g de molibdato de amônio  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  em 150 mL de água destilada previamente aquecida a 60 °C, em copo de becker de 200 mL;
- b) Deixar esfriar, transferir para um balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água destilada;
- c) Transferir para um frasco com capacidade de 1 L;
- d) Em outro balão, colocar 80 mL de água destilada;
- e) Adicionar 70,7 mL de HCl concentrado ( $d=1,191$ ; 37,7% e 12,31N) e agitar;
- f) Completar o volume com água destilada e agitar;
- g) Transferir para o frasco de 1 L, onde já se encontra a solução de molibdato de amônio, e agitar;
- h) Adicionar 600 mL de água destilada, utilizando balão volumétrico de 200 mL, e agitar bem para perfeita homogeneização.

## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE PREPARO DA SOLUÇÃO P-C (ÁCIDO 1-AMINO-2-NAFTOL-4-SULFÔNICO)

- a) Preparar um estoque de pó redutor, misturando e triturando em almofariz os seguintes reagentes:
  - 2,5 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico,
  - 5 g de sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ),
  - 146 g de metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ );
- b) Guardar o pó redutor em vidro fosco, envolto com folha de papel alumínio (no máximo por 40 dias);
- c) Dissolver 32 g do pó redutor em 200 mL de água destilada morna (50 - 60°C), em copo de becker de 1000 mL;
- d) Transferir para um recipiente escuro e deixar em repouso até cristalizar (3 a 6 dias);
- e) Filtrar o cristalizado e guardar a solução (no máximo por 3 semanas).

## ANEXO 3

### FICHA DE DESCRIÇÃO DE MORFOTIPOS DE ECTOMICORRIZAS

Morfotipo nº.:

DATA DE COLETA:

ESPÉCIE HOSPEDEIRA:

#### ❖ MORFOLOGIA DO SISTEMA - Lupa

**RAMIFICAÇÃO:** monopodial pinada, monopodial piramidal, dicotômica, irregular, coralóide, tuberculada, não ramificada, outra \_\_\_\_\_

**FORMA DA EXTREMIDADE:** reta, como corrente de contas, com ápices mais largos do que as bases, sinuosa, outra \_\_\_\_\_

**COMPRIMENTO TOTAL:** \_\_\_\_\_ cm

**COR:** + **JOVENS:** \_\_\_\_\_ + **VELHOS:** \_\_\_\_\_

**ÁPICES:** \_\_\_\_\_

**TEXTURA:** lisa, finamente granulada, grosseiramente granulada, feltrosa, aveludada, verrugosa, lanosa, cotonosa, filamentosa, com espinhos curtos, com espinhos longos, outra \_\_\_\_\_

**BRILHO:** sem brilho, brilhante, reflete a luz, outro \_\_\_\_\_

**VISIBILIDADE DO TECIDO DO HOSPEDEIRO ATRAVÉS DO MANTO:** sim não

#### ❖ MORFOLOGIA DO MICÉLIO - Lupa

**LIGAÇÃO:** em um só ponto, ao longo da superfície e ficando próxima a ela, em forma de leque

**FREQÜÊNCIA:** ausente, raro, comum

**SUPERFÍCIE:** lisa, peluda, outra \_\_\_\_\_

#### ❖ ANATOMIA DO MANTO - M. O.

**REDE DE HARTIG:** presente ausente

**CÉLULAS ESPECIALIZADAS:** laticíferas, oleíferas, cistídeos, outras \_\_\_\_\_

**FREQÜÊNCIA:** ausentes, raras, comuns

**SUPERFÍCIE MAIS EXTERNA TIPO:** prosênquima frouxo, prosênquima organizado como rede, sinênquima organizado como rede, sinênquima irregular intercalado, sinênquima irregular não intercalado, sinênquima regular

**SUPERFÍCIE MAIS INTERNA TIPO:** prosênquima frouxo, prosênquima organizado como rede, sinênquima organizado como rede, sinênquima irregular intercalado, sinênquima irregular não intercalado, sinênquima regular

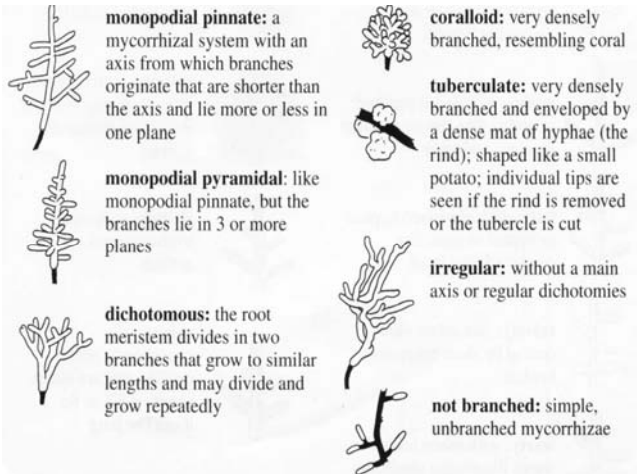
#### ❖ PROVÁVEL ESPÉCIE:



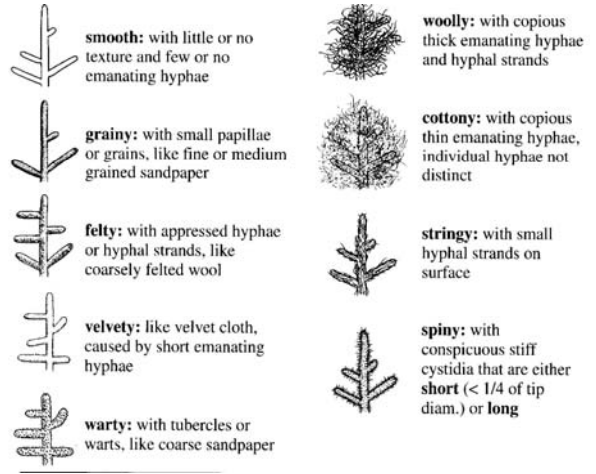
## ANEXO 4

### CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ECTOMICORRIZAS

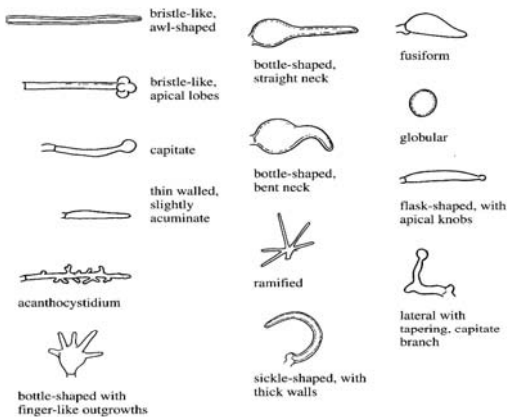
#### Ramificação do sistema



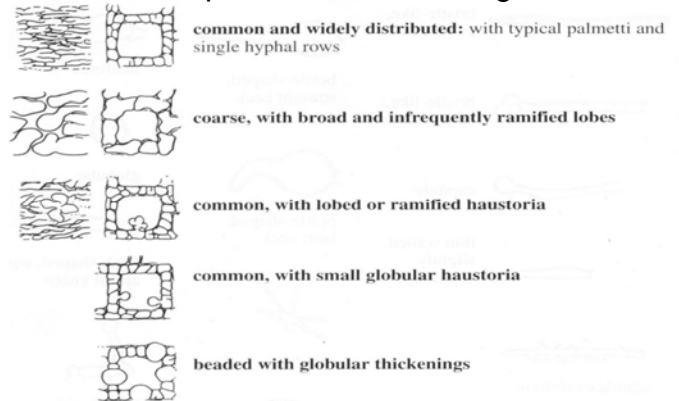
#### Textura do manto



#### Ornamentações do manto



#### Tipos de rede de Hartig



#### Organização das hifas no manto

