



ARTIGO

Óleo essencial de eucalipto para indução de micorriza em arbóreas nativas

Rodrigo Ferreira da Silva^{1*}, Alex Dellai², Douglas Leandro Scheid³, Rudinei De Marco²,
Andre Luis Grolli³, Ricardo Bemfica Steffen⁴ e Evandro Luiz Missio⁵

Recebido: 14 de setembro de 2015 Recebido após revisão: 14 de janeiro de 2016 Aceito: 26 de janeiro de 2016
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3531>

RESUMO: (Óleo essencial de eucalipto para indução de micorriza em arbóreas nativas). O desenvolvimento lento de arbóreas nativas de clima tropical pode estar relacionado à dificuldade do estabelecimento de ectomicorriza em condições naturais. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do óleo essencial de eucalipto no crescimento e para indução de ectomicorriza em Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e Grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr.). O isolado ectomicorrízico utilizado foi o *Pisolithus microcarpus*. Em condições de laboratório, individualmente as plantas foram submetidas a um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (somente planta (controle), óleo essencial, somente inóculo e inóculo + óleo essencial). Avaliou-se a altura de planta, massa fresca da parte aérea e do sistema radicular, número de folhas, massa seca da parte aérea, comprimento da raiz principal, presença de estruturas fúngicas, percentual de colonização radicular e a contribuição efetiva dos tratamentos para produção de massa seca da parte aérea. A adição de óleo essencial e do isolado *P. microcarpus* não possibilita a formação de estruturas típicas de ectomicorriza nas plântulas de Bracatinga. A utilização de óleo essencial de eucalipto pode contribuir para o estabelecimento de associação de *P. microcarpus* nas raízes das plântulas de Grápia. A presença de *P. microcarpus* aumenta altura das plântulas de Bracatinga e Grápia e a massa seca da parte aérea da Bracatinga produzidas *in vitro*.
Palavras-chave: Fungo ectomicorrízico, Espécies nativas, *Mimosa scabrella*, *Apuleia leiocarpa*.

ABSTRACT: (The use of eucalyptus essential oil for mycorrhizal induction in native tree species). The slow development of native tropical tree species may be related to their difficulty in establishing ectomycorrhizal associations in natural conditions. We aimed to evaluate the influence of the eucalyptus essential oil on the growth and on the induction of ectomycorrhiza formation in "bracatinga" (*Mimosa scabrella* Benth.) and "grápia" (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr.). The ectomycorrhizal isolate used was *Pisolithus microcarpus*. Under laboratory conditions, plants were individually subjected to a completely randomized experimental design with four treatments (plant only (control), essential oil, inoculum only, and inoculum + essential oil). We evaluated plant height, shoot and root fresh weight, number of leaves, shoot dry weight, length of the main root, presence of fungal structures, percentage of root colonization, and the effective contribution of treatments for shoot dry weight production. The addition of both the essential oil and *P. microcarpus* did not induce the formation of typical ectomycorrhizal structures in bracatinga seedlings. The use of the eucalyptus essential oil alone may contribute to the establishment of the association with *P. microcarpus* in roots of grápia seedlings. The presence of *P. microcarpus* increased the height of both bracatinga and grápia seedlings grown *in vitro*, as well as the shoot dry weight of the former.

Keywords: ectomycorrhizal fungi, native species, *Mimosa scabrella*, *Apuleia leiocarpa*.

INTRODUÇÃO

As arbóreas nativas apresentam crescimento lento quando comparadas a espécies exóticas como o eucalipto. Desse modo, novas estratégias devem ser estudadas com vistas a essas espécies alcancem níveis satisfatórios de crescimento e produção. Diante disso, as ectomicorrizas contribuem para o estabelecimento de mudas florestais, bem como na estabilidade das florestas plantadas (Oliveira *et al.* 2008), podendo ser uma alternativa para auxiliar no desenvolvimento de arbóreas nativas em diferentes condições de solo e ambiente.

As ectomicorrizas são fungos de solo que formam simbiose mutualística com certas plantas vasculares. Nessa associação, ocorre o desenvolvimento de estruturas pró-

prias no sistema radicular do hospedeiro, como o manto fúngico e a rede de Hartig, responsáveis pelas trocas de nutrientes entre o fungo e planta (Smith & Read 2008). A simbiose ectomicorrízica possibilita maior crescimento das plantas com aumento na absorção de nutrientes, atua como barreira aos metais tóxicos (Jourand *et al.* 2014) e contribui na tolerância a fatores ambientais possibilitando às plantas superarem estresses bióticos e abióticos que ocorrem no solo (Silva *et al.* 2007, Campos *et al.* 2011). Dessa forma, a formação de ectomicorriza pode ser uma estratégia para aumentar o desenvolvimento de arbóreas nativas de clima tropical.

Por causa da dificuldade do estabelecimento de ectomicorrizas nas arbóreas nativas de clima tropical, tem-se

1. Engenheiro Agrônomo, Doutor em Ciência do Solo, Professor Adjunto da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Campus de Frederico Westphalen, Linha Sete de Setembro, s/n, Caixa Postal 54, CEP 98400-000, Frederico Westphalen, RS, Brasil.

2. Mestre em Agronomia (Agricultura e Ambiente) da UFSM. Campus de Frederico Westphalen, Linha Sete de Setembro s/n, CEP 98400-000, Frederico Westphalen, RS, Brasil.

3. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Agricultura e Ambiente) da UFSM. Campus de Frederico Westphalen, Linha Sete de Setembro s/n, CEP 98400-000, Frederico Westphalen, RS, Brasil.

4. Engenheiro Agrônomo, Doutor em Ciência do Solo, UFSM. Av. Roraima, nº 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

5. Engenheiro Agrônomo, Doutor em Engenharia Florestal, Pesquisador da FEPAGRO Floresta, Distrito Boca do Monte, CEP 97001-970, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: rofesil@bol.com.br

a proposição da utilização de óleo essencial de eucalipto como bioestimulador desta associação. Esses óleos são compostos de origem natural que estão envolvidos nas interações entre plantas e microrganismos (Simionatto 2004), formados por uma complexa mistura envolvendo 127 compostos orgânicos (Elaissi et al. 2011) similares aos exsudatos radiculares e representam uma alternativa biotecnológica no manejo de microrganismos patogênicos ou simbioses do solo (Bâ et al. 2010). Estes compostos, dependendo da concentração, podem proporcionar relações de sinergismo, resultando na indução do crescimento de microrganismos ou plantas (Ludley et al. 2009).

Durante a formação da micorriza, as alterações na expressão gênica ocorrem em resposta a estímulos liberados pela planta (Pereira et al. 2014). Esses estímulos bioquímicos emitidos nos compostos orgânicos pelo sistema radicular das plantas estimulam a fase pré-simbiótica da micorriza, desencadeando mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto no fungo, quanto na planta (Bécard et al. 2004, Akiyama et al. 2005, Zhi-Lin et al. 2007). Assim, o óleo essencial poderá ser opção para estimular a micorrização em arbóreas nativas com dificuldade em estabelecer esta simbiose.

No que se refere a espécies arbóreas nativas, a Grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr.) pertence à família Fabaceae, com madeira pesada, sem falhas e durável (Mattos 2002), podendo ser empregada em marcenaria, esquadrias, carrocerias e construção civil (Lorenzi 2008). A Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) é uma Fabaceae, de rápido crescimento, heliófita, adequada para a recuperação de áreas degradadas, pois mantém crescimento razoável e deposita expressivas quantidades de material orgânico rico em nitrogênio no solo (Carpanezzi et al. 1988). Resultados de pesquisa indicam que o óleo essencial de eucalipto e fungo ectomicorrízico possibilitam o desenvolvimento de mudas de Sibipiruna (Steffen et al. 2012). Entretanto, não há relatos na literatura sobre o efeito estimulante do óleo essencial de eucalipto na micorrização da Bracatinga e Grápia.

Na intenção de gerar informações sobre a possibilidade da formação de micorriza em espécies arbóreas nativas de clima tropical, este trabalho objetivou avaliar a influência do óleo essencial de eucalipto no crescimento e para indução de ectomicorriza em Bracatinga (*Mimosa scabrella*) e Grápia (*Apuleia leiocarpa*).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Santa Maria, campus de Frederico Westphalen – RS. O fungo ectomicorrízico utilizado para inoculação foi o isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*) obtido na Universidade Federal de Santa Catarina. O fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio MNM sólido (Melin-Norkrans Modificado) (Marx 1969) durante 28 dias em BOD com temperatura de 25 ± 1 °C.

O óleo essencial foi obtido através da técnica de hidrodestilação de folhas frescas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, seguindo a metodologia descrita por (Vitti & Brito, 2003), em seguida foi solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v/v), conforme metodologia de Fabrowski et al. (2003) e mantido sob refrigeração a 4°C até o momento do uso. A concentração do óleo essencial utilizado no experimento seguiu a indicada por Steffen et al. (2011, 2012), que avaliaram doses de óleo essencial de eucalipto para estimular a micorrização em mudas de *Eucalyptus grandis* e sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.), sendo utilizado a concentração de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$.

O óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro e recolhido em recipiente para fins de quantificação do rendimento. A caracterização dos compostos foi por meio de análises cromatográficas, sendo utilizado o cromatógrafo marca Varian® 3800 dotado de detector de ionização de chama FID e equipado com o programa Star Chromatography Workstation (versão 4.5) e o cromatógrafo marca Shimadzu GC-17A dotado de espectrômetro de massas Shimadzu® modelo QP5000. Em ambos os equipamentos, empregou-se coluna capilar SPB-TM-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm de fase estacionária) da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Os espectros de massa obtidos foram comparados com os espectros do site da NIST. Obteve-se um total de 40 compostos no óleo essencial de *Eucalyptus grandis*, sendo 14 com percentuais relativos superiores a 1%, em relação ao total extraído (Tab. 1). Os demais compostos (26) representaram individualmente, menos de 1% do total extraído.

A caracterização do óleo essencial revelou maior percentual do composto Eucalyptol (1,8-cineol). Este composto, dependendo da concentração, pode proporcionar relações de sinergismo, resultando na indução do crescimento de microrganismos ou plantas (Ludley et al. 2009). Essa caracterização justifica a utilização do óleo essencial de eucalipto.

Tabela 1. Porcentagem relativa (PR), em relação ao total, de 14 compostos obtidos no óleo extraído de folhas de eucalipto.

Compostos*	PR (%)
Eucalyptol (1,8-cineol)	9,87
p-Cymeno	7,87
Spathulenol	6,58
Lepidozenal	4,89
Cubeb-11-ene	3,89
Junenol	3,48
4(15)-Dehydroglobulol	3,20
Deca-4,8-dienol, 1-ethynyl-1,5,9-trimethyl	2,42
α -Phellandrene	2,26
allo-Aromadendra-4(15),10(14)-diene	2,00
(E)-Nerolidol	1,95
α -Humulene	1,87
α -Guaiol	1,70
T-Cadinol	1,28

* Somente 14 compostos, dos 40 obtidos, com porcentagem relativa superior a 1%.

As sementes das espécies nativas foram fornecidas pela Estação de Pesquisas Florestais - FEPAGRO Santa Maria - RS. As sementes de Grábia e Bracatinga foram submetidas à desinfecção com hipoclorito de sódio 2% durante 10 min e álcool 70% por mais 12 min, após foram lavadas três vezes consecutivas com água esterilizada. As sementes foram germinadas em meio de germinação ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (500 μM), H_3BO_3 (3 μM), 7,5g/L de Ágar, 2g L^{-1} de glicose, pH 5,7), em erlenmeyer, esterilizado em autoclave, permanecendo 7 dias no escuro em temperatura de 25 ± 1 °C.

Após a germinação, as sementes foram transferidas para Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 60 mL de meio MNM sólido. Conforme recomendações de Chilvers *et al.* (1986), antes da colocação das sementes pré-germinadas, foi adicionado na superfície do meio um disco de papel celofane transparente, previamente fervido durante 8 horas para retirar o excesso de compostos de enxofre. Com as plântulas no interior dos frascos aplicaram-se os tratamentos de inoculação e óleo essencial. Para isso, inoculou-se próximo ao sistema radicular, três discos de 10 mm de diâmetro do isolado ectomicorrízico, retirados do meio sólido produzido em placa de petri (Brundrett *et al.* 1996). Para o óleo essencial aplicou-se 2 ml da solução de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ diluída em água destilada esterilizada.

Cada erlenmeyer contendo uma planta foi considerado uma unidade experimental e o experimento foi conduzido durante 42 dias em câmara com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 ± 1 °C. Durante o período do experimento as unidades experimentais foram sorteadas aleatoriamente em intervalos de dois dias e procedido o rodízio para atender as exigências do delineamento experimental.

Foi estabelecido um delineamento experimental para cada espécie de planta, em arranjo inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições, sendo: T1, sem inoculação e sem aplicação de óleo essencial (testemunha); T2, sem inoculação/ com aplicação de óleo essencial (Óleo); T3, com inoculação/ sem aplicação de óleo essencial (inoculado); T4, com inoculação/ com aplicação do óleo essencial (inoculado + Óleo)

As variáveis analisadas foram altura de planta (AP), massa fresca da parte aérea (MFPA) e do sistema radicular (MFR), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da raiz principal (CRP), presença de associação ectomicorrízica, percentual de pêlos radiculares colonizados (%PRC) e contribuição efetiva dos tratamentos (CET). Para a avaliação da altura de planta, utilizou-se régua graduada de 30 cm de comprimento, medindo-se da região do coleto da muda até o meristema apical. Para estimar a massa fresca da parte aérea e radicular realizou-se uma secção transversal no coleto da planta separando a parte aérea da radicular em seguida foram pesadas em balança analítica. A parte aérea da planta foi seca em estufa a 65 ± 1 °C, até peso constante, após as amostras foram pesadas em balança analítica.

A avaliação da colonização ectomicorrízica foi realizada por meio da observação visual externa das raízes em microscópio estereoscópico binocular com aumento de 60x, visando detectar a presença de alterações morfológicas características da formação de ectomicorriza (Brundrett *et al.* 1996). Na sequência, foram realizados cortes histológicos transversais nas raízes em micrótomo Microton® e posterior confecção de lâminas para observação da morfologia interna das raízes em microscópio óptico. A avaliação da morfologia interna foi realizada através da análise de fotografias obtidas com máquina fotográfica digital Sony®, acoplada ao microscópio óptico Olympus® modelo CX40 com aumento de 200x, detectando-se a presença de manto fúngico e rede de Hartig (Brundrett *et al.* 1996).

O percentual de colonização radicular foi obtido por meio da quantificação do número de pêlos colonizados e não colonizados, conforme Brundrett *et al.* (1996). A contribuição efetiva dos tratamentos (CET) expressa a contribuição percentual dos tratamentos em relação ao tratamento controle, sendo calculada pela fórmula:

$$\text{CET (\%)} = [(\text{PCT} - \text{PST}) / \text{PST}] * 100$$

Onde P, parâmetro analisado (massa seca da parte aérea); CT, com tratamento (óleo, fungo, ou óleo + fungo) e ST, sem tratamento (testemunha).

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos inoculado e inoculado + óleo possibilitaram alterações morfológicas características de estruturas de ectomicorriza, como o manto fúngico, nas raízes de Bracatinga, enquanto a Grábia manifestou essas alterações somente no tratamento inoculo + óleo (Fig. 1). Silva *et al.* (2009) estudando a ocorrência de fungos ectomicorrízicos em treze espécies nativas na região central do Rio Grande do Sul não encontrou formação de ectomicorriza em condições naturais, em árvores de Grábia, atribuindo que a associação não depende somente da planta, mas também do ambiente e disponibilidade de inóculo. Esses resultados indicam que o isolado ectomicorrízico testado promove modificação na morfologia externa das raízes de Grábia e Bracatinga, com a possibilidade de uma simbiose funcional.

Por meio da análise das alterações morfológicas externas, as plântulas de Bracatinga manifestaram 6% de colonização radicular no tratamento inoculado e 9% no inoculado + óleo, enquanto que a Grábia evidenciou 2% de colonização no tratamento inoculado + óleo (Tab. 2). Conforme a classificação de Zangaro *et al.* (2003) os percentuais de colonização obtido nesse trabalho são considerados baixos. Em mudas de sibipiruna inoculadas com o fungo *Pisolithus microcarpus* com adição de óleo essencial de eucalipto, produzidas em condições de casa de vegetação e em turfa, foi detectado 22% de

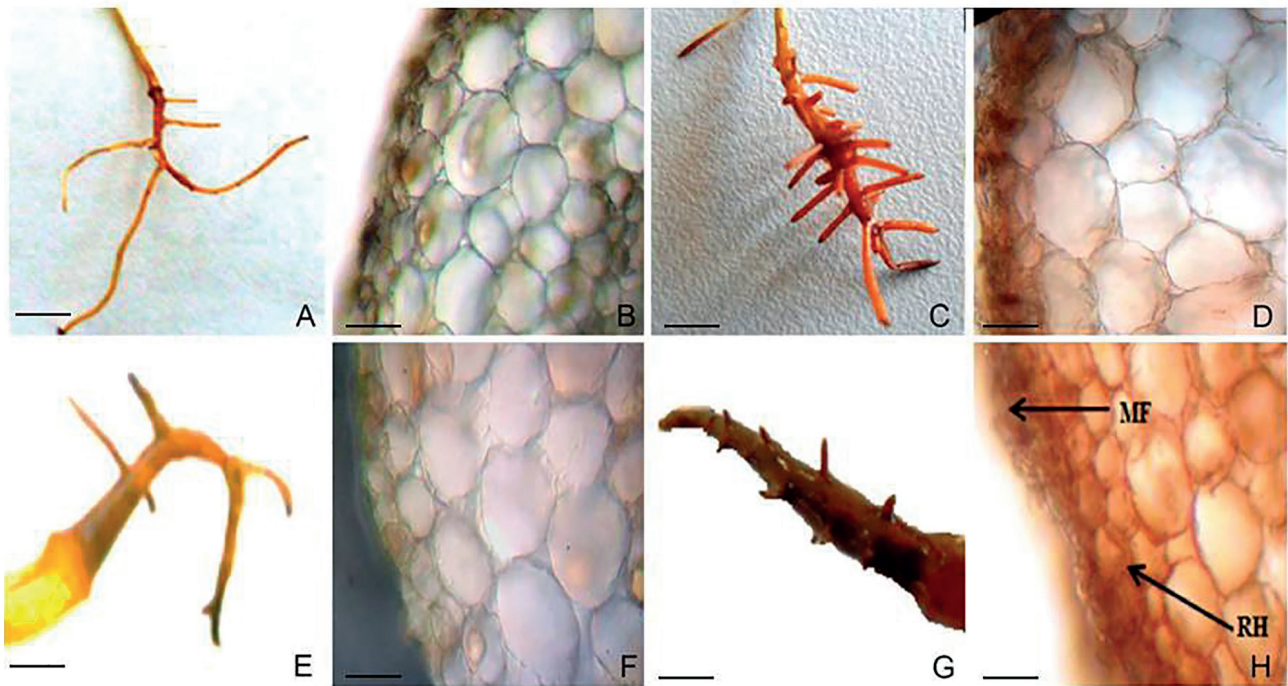


Figura 1. Morfologia externa (A, E) e interna (B, F) de raízes não micorrizadas (controle) de Bracatinga e Grápia, respectivamente. Morfologia externa (C, G) e interna (D, H) de raízes micorrizadas (tratamento inoculado + óleo) de Bracatinga e Grápia, respectivamente. Abreviaturas: MF, manto fúngico; RH, rede de Hartig. Inóculo: UFSC – Pt116. Escalas: 1 cm (A, C, E e G) e 1 μm (B, D, F e H).

colonização radicular (Steffen *et al.* 2012). Desse modo, a adição de óleo essencial de eucalipto parece contribuir, mesmo com valores baixos, no percentual de colonização radicular das plântulas de Bracatinga e Grápia.

A presença de estruturas fúngicas na morfologia externa foi observada nas plântulas de Bracatinga, que apresentaram espessamento dos pelos radiculares com a inoculação do fungo ectomicorrízico (Fig. 1C). Essas alterações na morfologia externa se devem a presença de estruturas como manto fúngico (Brundrett *et al.* 1996), mas, devem ser confirmadas pela análise da morfologia interna das raízes (Smith & Read 2008). Contudo, não foi possível detectar, por meio da morfologia interna das raízes, a formação de rede de Hartig e a ocorrência do manto fúngico no sistema radicular da Bracatinga (Fig. 1D). Dessa forma, não é possível confirmar que as porcentagens de colonização radiculares obtidas neste trabalho (Tab. 2), sejam efetivamente da formação de

ectomicorriza na Bracatinga.

Entretanto, as plântulas de Grápia apresentaram alterações na morfologia externa (Fig. 1G) e interna (Fig. 1H) do sistema radicular com o tratamento inoculado + óleo, evidenciada pela formação do manto fúngico e rede de Hartig. Os óleos essenciais possuem diversos constituintes que atuam no metabolismo vegetal (Bakkali *et al.* 2008), muitos destes, estão envolvidos nas interações entre plantas e microrganismos (Simionatto 2004). Trabalhando com ectomicorrização *in vitro* (Andreazza *et al.* 2011) evidenciaram que o fungo *Suillus* sp favoreceu o desenvolvimento de plântulas de Grápia, porém, não detectou a formação de ectomicorriza pelo isolado UFSC–Pt116. Este resultado indica que o óleo essencial de eucalipto pode ser uma estratégia para o estabelecimento de ectomicorriza em Grápia e, contribui com a possibilidade do desenvolvimento de pesquisa em plantas que tenham dificuldades em estabelecer essa associação.

Os tratamentos inoculado e inoculado + óleo proporcionaram os maiores valores para a altura, comprimento radicular, número de folhas, massa fresca radicular e massa seca aérea das plântulas de Bracatinga quando comparados aos tratamentos sem inoculação (Tab. 3). Resultados semelhantes também foram obtidos por Steffen *et al.* (2012) o qual observou que o uso de óleo essencial e inoculação do isolado UFSC–Pt116 favoreceu o desenvolvimento de mudas de Sibipiruna. Contudo, convém destacar que não foi possível confirmar, neste trabalho, a formação de ectomicorriza na Bracatinga, sendo obtido apenas, um efeito da presença do fungo. Possivelmente, em decorrência dos fungos ectomicorrízicos serem capazes de produzir hormônios que contribuem

Tabela 2. Presença/ausência de associação ectomicorrízica e percentual de pêlos radiculares colonizados (%PRC) em Bracatinga e Grápia inoculadas com o isolado UFSC–Pt116, *in vitro*.

Tratamentos	Presença/ausência		%PRC	
	Bracatinga	Grápia	Bracatinga	Grápia
Controle	-	-	0	0
Óleo	-	-	0	0
Inoculado	+	-	6	0
Inoculado + Óleo	+	+	9	2

+, Presença de manto fúngico, rede de Hartig, pelotões de hifas. -, ausência de estruturas fúngicas.

Tabela 3. Altura de planta, comprimento radicular (CR), número de folhas (NF), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca radicular (MFR) e massa seca da parte aérea (MSPA) de plântulas de Bracatinga e Grápia.

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

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

ns, não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

para o crescimento vegetal como auxinas, giberelinas e citoquininas (Ditengou & Lapeyrie 2000).

Os tratamentos inoculado e inoculado + óleo aumentaram significativamente a massa fresca radicular e altura das plântulas de Grápia, não sendo observada diferença nos demais parâmetros analisados (Tab. 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Andrezza *et al.* (2011) que relataram aumento na altura das plântulas de Grápia quando inoculadas com fungos ectomicorrízicos das espécies *Suillus* sp, *Pisolithus microcarpus* e *Scleroderma citrinum*. Diante da baixa porcentagem de colonização radicular obtido na Grápia (Tab. 2), é provável que esse resultado também seja o efeito indireto da presença do fungo ectomicorrízico, estimulando o crescimento da planta, por meio da disponibilização de fitormônios (Smith e Read 2008).

A contribuição efetiva para produção de massa seca da parte aérea dos tratamentos óleo, inoculado e inoculado + óleo foram respectivamente de 56, 219 e 144 %

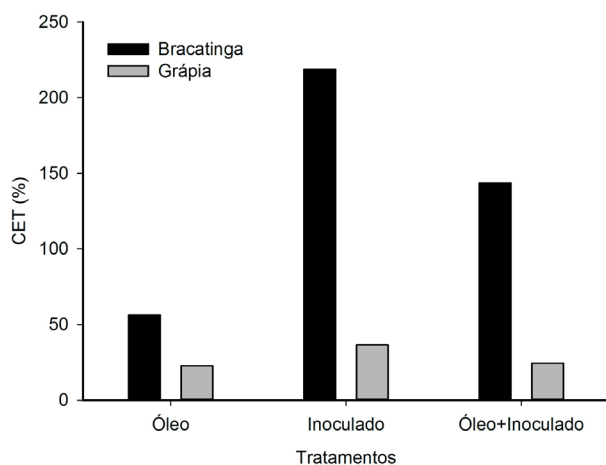


Figura 2. Contribuição efetiva dos tratamentos (CET %) óleo, inoculado e inoculado + óleo para a massa seca da parte aérea das plântulas de Bracatinga e Grápia.

para as plântulas de Bracatinga e de 22, 37 e 25% para a Grápia, em relação ao tratamento testemunha contendo somente planta (Fig. 2). A contribuição do óleo para o crescimento das plantas esta relacionado à presença de terpenos e compostos fenólicos nos óleos essenciais que estimulam o crescimento vegetal (Taiz & Zeiger 2013). Efeitos de inibição ou bioestímulo do crescimento vegetal e microbiano tem sido atribuído principalmente ao eucalipto, seguido pelo citral, timol, α e β -pineno, cetonas e compostos flavônicos (García *et al.* 2009). Enquanto, os fungos ectomicorrízico, por meio das suas atividades bioquímicas, produzem e excretam para o meio de cultura fitormônios biodisponíveis, como ácido indol acético e auxinas, responsáveis pelo crescimento da planta (Smith & Read 2008).

Esses resultados são importantes para o setor florestal, pois se vislumbra a possibilidade do desenvolvimento de pesquisas que envolvam a estimulação do crescimento de espécies arbóreas nativas de clima tropical pela adição de moléculas orgânicas oriundas de plantas, ou microrganismos simbiotes como os fungos ectomicorrízico. No entanto, devem ser realizados estudos envolvendo o uso do óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização e seus efeitos no estabelecimento e desenvolvimento de arbóreas nativas em condições de campo.

CONCLUSÕES

A adição de óleo essencial e do isolado *Pisolithus microcarpus* não possibilita a formação de estruturas típicas de ectomicorriza nas plântulas de Bracatinga.

A utilização de óleo essencial de eucalipto pode contribuir para o estabelecimento de associação de *Pisolithus microcarpus* nas raízes das plântulas de Grápia.

A presença de *Pisolithus microcarpus* aumenta altura das plântulas de Bracatinga e Grápia e a massa seca da parte aérea da Bracatinga produzidas *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo, e à FE-PAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária), pela disponibilização das sementes para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, K., MATSUZAKI, K. & HAYASHI, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435: 824-827.
- ANDREAZZA, R., ANTONIOLLI, Z. I., LEAL, L. T., MORO JUNIOR, C. & SILVA, R. F. 2011. Ectomicorrizas em Grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride) e Canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) in vitro. *Ciência Florestal*, 21: 727-734.
- BÂ, A. M., DIÉDHIU, A. G., PRIN, Y., GALIANA, A. & DUPONNOIS, R. 2010. Management of ectomycorrhizal symbionts associated to useful exotic tree species to improve reforestation performances in tropical Africa. *Annals of Forest Science*, 67: 298-307.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. & IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- BÉCARD, G., KOSUTA, S., TAMASLOUKHT, M., SÉJALON-DELMAS, N. & ROUX, C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1186-1197.
- BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., DELL, B., GROVE, T. & MALAJCZUK, N. 1996. *Working with mycorrhizal in forestry and agriculture*. Canberra: ACIAR. 400 p.
- CAMPOS, D. T. S., SILVA, M. C. S., LUZ, J. M. R., TELESFORA, R. J. & KASUYA, M. C. M. 2011. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. *Revista Árvore*, 35: 965-974.
- CARPANEZZI, A. A., LAURENT, J. E., CARVALHO, P. E. R., PEGORARO, A., BAGGIO, A. J., ZANON, A., OLIVEIRA, E. B., IEDE, E. T., RÖTTA, E., STURION, J. A., PEREIRA, J. C. D., GRAÇA, L. R., RAUEN, M. J., CARPANEZZI, O. T. B. & OLIVEIRA, Y. M. M. 1988. *Manual técnico da Bracatinga (Mimosa scabrella Benth.)*. Curitiba. 70 p.
- CHILVERS, G.A., DOUGLASS, P.A. & LAPEYRIE, F.F. 1986. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 103: 397-402.
- DITENGOU, F. A. & LAPEYRIE, F. 2000. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in *Eucalyptus* seedlings. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 13: 151-158.
- ELAISSI, A., MEDINI, H., KHOUJA, M. L., SIMMONDS, M., LYNEN, F., FARHAT, F., CHEMLI, R. & HARZALLAH-SKHIRI, F. 2011. Variation in Volatile Leaf Oils of Five *Eucalyptus* Species Harvested from Jbel Abderrahman Arboreta (Tunisia). *Chemistry & Biodiversity*, 8: 352-361.
- FABROWSKI, F. J., MUÑIZ, G. I. B., NAKASHIMA, T., NISGOSKI, S. & KLOCK, U. 2003. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* r.t. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. *Ciência Florestal*, 13: 95-106.
- FERREIRA, D. F. 2011. SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35: 1039-1042.
- GARCÍA, C., RODRÍGUEZ, P., DÍAS, E., HEINZEN, H. & MENÉNDEZ, P. 2009. Biooxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, 59: 171-176.
- JOURAND, P., HANNIBAL, L., MAJOREL, C., MENGANT, S., DU-COUSSO, M. & LEBRUN, M. 2014. Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *Journal of Plant Physiology*, 171: 164-172.
- LORENZI, H. 2008. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. 5ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo. 368 p.
- LUDLEY, K. E., ROBINSON, C. H., JICKELLS, S., CHAMBERLAIN, P. M. & WHITAKER, J. 2009. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forest is revealed by novel experimental system. *Soil Biology & Biochemistry*, 41: 117-124.
- MARX, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163.
- MATTOS, R. B. 2002. *Características qualitativas e possibilidade de ganho de fuste em espécies euxilóforas nativas da região central do Rio Grande do Sul*. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria—Santa Maria, 2002.
- OLIVEIRA, V. L., ROSSI, M. J. & TARGHETTA, B. L. 2008. Avanços na aplicação de ectomicorrizas. In: FIGUEIREDO, M. V. B., BURITY, H. A., STAMFORD, N. P. & SANTOS, C. E. R. S. *Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros. p. 297-331.
- PEREIRA, M. F., BETANCOURTH, M. L., TEIXEIRA, J. A., ZUBIETA, M. P., QUEIROZ, M. V., KASUYA, M. C. M., COSTA, M. D. & ARAÚJO, E. F. 2014. In vitro *Scleroderma laeve* and *Eucalyptus grandis* mycorrhization and analysis of atp6, 17S rDNA, and ras gene expression during ectomycorrhizal formation. *Journal of Basic Microbiology*, 54: 1358-1366.
- SILVA, M. A., COSTA, M. D., ROCHA, R. B. & BORGES, A. C. 2007. Formação de ectomicorrizas por monócários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptus grandis*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 917-929.
- SILVA, R. F., ANTONIOLLI, Z. I., LEAL, L. & SILVA, A. S. 2009. Ocorrência de fungos micorrízicos em espécies florestais na região central do estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, 15: 65-70.
- SIMIONATTO, E. 2004. *Estudo dos constituintes químicos de óleos voláteis de plantas medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação e modificação estrutural e atividade biológica*. 193f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.
- SMITH, S. E. & READ, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. San Diego: Academic Press. 787p.
- STEFFEN, R. B., ANTONIOLLI, Z. I., STEFFEN, G. P. K., JACQUES, R. J. S., ECKARDT, D. P., SANTOS, M. L. & SANTANA, N. A. 2011. Óleo essencial de eucalipto como bioestimulador da micorrização e do estabelecimento de mudas de eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 31: 235-243.
- STEFFEN, R. B., ANTONIOLLI, Z. I., STEFFEN, G. P. K. & SILVA, R. F. 2012. Óleo essencial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden no estímulo à micorrização de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). *Ciência Florestal*, 22: 69-78.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed. 918p, 2013.
- VITTI, A. M. S. & BRITO, J. O. 2003. *Óleo essencial de Eucalipto*. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 26 p. (Documentos, 17).
- ZANGARO, W., NISIZAKI, S. M. A., DOMINGOS, J. C. B. & NAKANO, E. M. 2003. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 19: 315-324.
- ZHI-LIN, Y., CHUAN-CHAO, D. & LIAN-QING, C. 2007. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1266-1271.