

Efetividade de *Pisolithus* sp. em *Eucalyptus urophylla*, através da síntese *in vitro* ⁽¹⁾

Débora Cíntia dos Santos Avelar ⁽²⁾; **Ângela Laís Fernandes Gomes** ⁽³⁾; **Paulo Henrique Graziotti** ⁽⁴⁾; **Lidiomar Soares da Costa** ⁽⁵⁾; **Arley José Fonseca** ⁽⁶⁾; **Priscila Fernandes de Souza** ⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos de Fapemig.

⁽²⁾ Estudante de Agronomia; Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri; Rodovia MGT 367, km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000; Diamantina; MG; deborasantosavelar@gmail.com; ⁽³⁾ Estudante de Engenharia Florestal; Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri; ⁽⁴⁾ Professor Associado do Departamento Engenharia Florestal; Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri; ⁽⁵⁾ Menstrando em Ciência Florestal; Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri; ⁽⁶⁾ Menstrando em Produção Vegetal; Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri; ⁽⁷⁾ Professora do Departamento de Engenharia Florestal; Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri.

RESUMO: A seleção *in vitro* é essencial para verificar a compatibilidade de fungos ectomicorrízicos com o hospedeiro. Objetivou-se avaliar isolados de *Pisolithus* sp. que possam colonizar e promover o crescimento de plântulas de *E. urophylla in vitro*. Os isolados avaliados foram D10, D15, D63, D95, D243, D244, D252, D253 e D262 de *Pisolithus* sp., com cinco repetições. Tubos de ensaio foram revestidos internamente com papel de germinação, onde foram adicionados 56 cm³ da mistura turfa:vermiculita, umedecido com 10 mL de água, adicionado de 10 mL meio de cultura Melin-Norkrans modificado – MNM e esterilizado. Uma plântula de *E. urophylla* com duas semanas de idade foi transferida para cada tubo, colocada com as raízes dispostas entre a folha de papel de germinação e a parede do tubo. O sistema foi mantido por 40 dias em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Inoculou-se as plântulas com dois discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro cobertos de micélio dos isolados, sendo distribuídos em cada tubo, um de cada lado da raiz das plântulas. A altura das plântulas foi avaliada a cada 10 dias, totalizando quatro medições. Os isolados *Pisolithus* sp. não diferiram quanto a altura das plântulas, massa fresca e massa seca da parte aérea. A maior porcentagem de pontas colonizadas foi observada nas plântulas inoculadas com o D95 (61%). O isolado D95 de *Pisolithus* sp. coloniza mais as plântulas de *Eucalyptus urophylla* e tendeu a proporcionar uma maior produção de massa para o hospedeiro.

Termos de indexação: fungos ectomicorrízicos, ectomicorriza, micorrização.

INTRODUÇÃO

A formação de micorrizas, associação simbiótica mutualística entre fungos e raízes de plantas, é uma importante adaptação radicular que auxilia as

plantas na absorção de nutrientes e água do solo (Herrman et al., 2004).

As associações ectomicorrízicas comumente apresentam especificidade fungo-hospedeiro, manifestadas principalmente entre gêneros e, em alguns casos, até mesmo entre espécies (Molina et al., 1992; Oliveira et al., 1994).

O crescimento de *Eucalyptus dunii*, *E. citriodora*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* e *E. cloesiana* varia quando mudas dessas espécies são inoculadas com diferentes isolados de fungos ectomicorrízicos dos gêneros *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Paxillus* e *Amanita* (Comerlato, 1991).

Os FEM têm capacidade diferenciada em colonizar e promover benefícios às espécies vegetais. Em condições específicas, há diferentes respostas, variando em compatibilidade e eficiência (Garbaye, 1990; Sawyer et al., 2003).

O controle da micorrização consiste na inoculação de fungos específicos do solo em plantas, baseando-se na relação mutualística entre esses organismos (Garbaye, 1990). O processo tem início com a seleção de isolados fúngicos mais eficientes e envolve uma etapa importante que é o isolamento e a manutenção *in vitro* de uma coleção de isolados (Garbaye, 1990).

Assim, o estudo teve o objetivo de avaliar FEM que efetivamente colonizem e que promovam o crescimento de plântulas de *E. urophylla* por meio da síntese *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com 9 fungos e 5 repetições, sendo o isolado D15 o tratamento controle.

Os isolados *Pisolithus* sp. utilizados foram: D10, D15, D63, D95, D243, D244, D252, D253, D262, obtidos da coleção de FEM do Laboratório Microbiologia do Solo – UFVJM.

Cada isolado foi repicado para placas de Petri

contendo 15 mL meio de cultura Melin-Norkrans Modificado sólido – MNM (Marx, 1969) e incubados a 25 °C por 21 dias.

Sementes de *E. urophylla* foram superficialmente desinfetadas em álcool 50% e em seguida foram lavadas em água destilada esterilizada, imersas em solução 0,5 % de hipoclorito de sódio por um minuto e novamente lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram semeadas em placas de Petri contendo três folhas de papel de germinação umedecido e esterilizadas. As sementes foram incubadas por duas semanas à 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Tubos de ensaio de 20 x 2,5 cm foram revestidos internamente com papel de germinação, e adicionou-se 56 cm³ da mistura turfa:vermiculita na proporção de 1:20 (V:V), umedecido com 10 mL de água. O conjunto foi esterilizado duas vezes em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se ao substrato 10 mL meio de cultura líquido Melin-Norkrans modificado (Marx, 1969) e depois os tubos foram fechados com duas camadas de papel celofane e novamente esterilizado nas mesmas condições.

As plântulas de *E. urophylla* com duas semanas de idade foram selecionadas por tamanho de 0,6 a 1 cm, e transferiu-se uma plântula para cada tubo, sendo colocada com as raízes dispostas entre a folha de papel de germinação e a parede do tubo, de modo a permitir a visualização periódica do sistema radicular. Os tubos foram envoltos em papel alumínio até a altura do substrato e então incubados por 40 dias à 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

Discos de 5 mm de diâmetro contendo de micélio, foram retirados das bordas das colônias com de 21 dias de crescimento e foram dispostos, um de cada lado da raiz das plântulas, também entre o papel de germinação e a parede do tubo. Os tubos foram novamente fechados e as plântulas incubadas à 25 °C com fotoperíodo de 12 h. Aos 20 e 30 dias após o transplante das plântulas para os tubos, foram adicionados em cada tubo 1 mL de solução nutritiva de Clark menos P (Clark, 1975). A altura das plantas foi avaliada a cada 10 dias, totalizando quatro medições.

Após 40 dias de incubação as plantas foram removidas dos tubos, a parte aérea foi separada do sistema radicular pesada para determinação da massa fresca da parte aérea (MFPA) e seca à 65 °C por 72 horas para determinação da massa seca (MSPA). As raízes foram imersas em um becker com água durante alguns minutos, para facilitar a separação do substrato de plantio, e então lavadas cuidadosamente utilizando-se de uma pisseta com água destilada, em seguida o sistema radicular de cada planta foi colocada em solução de 50 % de álcool. A colonização ectomicorrízica foi avaliada pela

porcentagem de pontas de raízes colonizadas no total de pontas (Brundret et al. 1996).

Análise estatística

Os dados de todas as variáveis foram submetidos à análise de variância e quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A altura, MFPA, MSPA não foram influenciadas pelos isolados fúngicos (Figuras 1 e 2). Apesar de não significativo ocorreram grandes diferenças para essas características das plântulas inoculadas com os diferentes isolados. Para a altura aos 40 dias, as plântulas inoculadas com o D95 apresentaram a altura da PA 83 % maior que as inoculadas com o D243. A MFPA das plântulas inoculadas com o D95 foi 3,8 vezes maior que as plântulas inoculadas com o D243. A MSPA das plântulas inoculadas com o D95 foi 3,7 vezes maior que aquelas inoculadas com D243.

Os isolados de *Pisolithus* sp. diferiram quanto a capacidade de colonizarem as raízes de *Eucalyptus urophylla* (Figura 3), sendo que a maior porcentagem de pontas colonizadas foi observada nas plântulas inoculadas com o D95 (61%). Estas plantas apresentaram uma porcentagem de pontas de raízes colonizadas 3,7 vezes maior do que a média das plantas inoculadas com os demais isolados. Com a inoculação de mudas seminais de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus globulus* com esporos de *Scleroderma* spp. em condições controladas, observou-se uma colonização de até 100 % das raízes finas (Chen et al., 2006c).

É interessante observar que as plântulas inoculadas com o D95, maior porcentagem de pontas de raízes colonizadas, tendeu a apresentar as maiores MFPA, MSPA e altura.

CONCLUSÕES

O isolado D95 de *Pisolithus* sp. coloniza mais as plântulas de *Eucalyptus urophylla* e tendeu a proporcionar uma maior produção de massa para o hospedeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Henrique Graziotti pelo incentivo acadêmico, à UFVJM pela infraestrutura, e à FAPEMIG pela bolsa de iniciação científica e recursos financeiros.

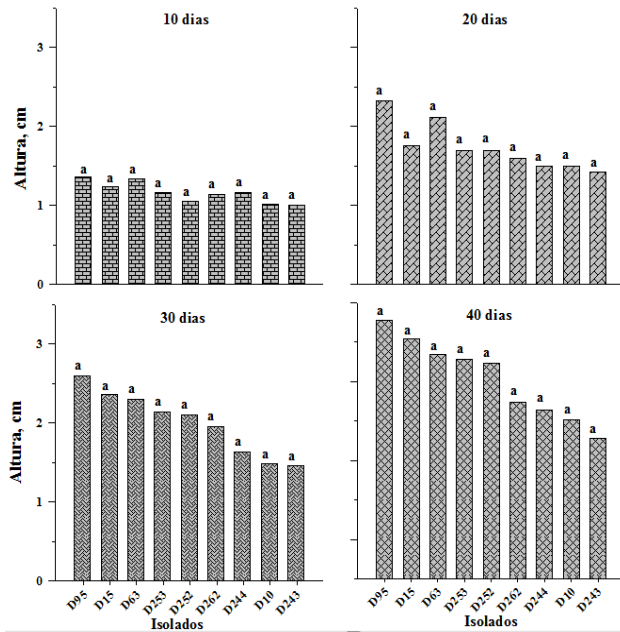


Figura 1: Altura aos 10, 20, 30 e 40 dias das plântulas de *Eucalyptus urophylla* inoculadas com isolados de *Pisolithus* sp.. As barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

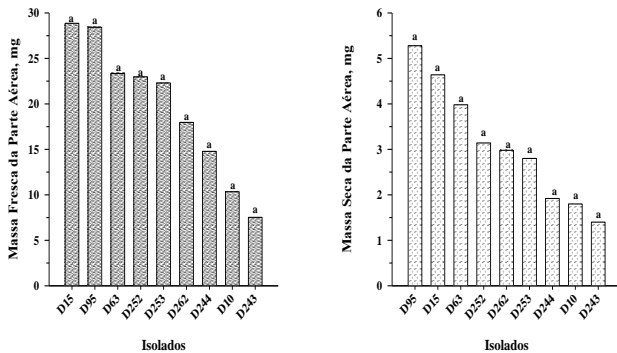


Figura 2: Massa fresca e seca da parte aérea, das plântulas de *Eucalyptus urophylla*, inoculadas com isolados de *Pisolithus* sp. . As barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

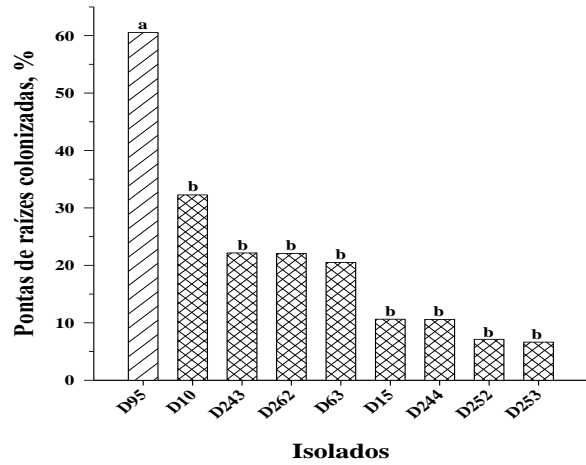


Figura 3: Porcentagem de pontas de raízes colonizadas das plântulas de *Eucalyptus urophylla* inoculadas com isolados de *Pisolithus* sp. As barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

REFERÊNCIAS

BRUNDRET, M.; BOUGHER, N.L.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. 1996. 374p.

CLARK, R.B. Characterization of phosphates in intact maize roots. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v.23, p.458-460, 1975.

CHEN, Y.L.; KANG, L.H.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in South China: effect of *Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E urophylla*, *Pinus elliotii*, and *P. radiata*. *Mycorrhiza*, Berlin, n.16, p.251-259, 2006c.

COMERLATO, A.G. Especificidade e eficiência de fungos ectomicorrízicos para *Eucalyptus*. 1991. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 2002.

GARBAYE, J. Utilisation des mycorrhizes en sylviculture. In: STRULLU, D.G. 8 (Ed). *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées*. Paris: Lavoisier, 1990, p. 197-248.

HERRMAN, S.; OELMULLER, R.; BUSCOT, F. Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum* influence on plant development and photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, v.161, p.509-17, 2004.



MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, St. Paul, v.59, n.2, p.153-163, 1969.

MOLINA, R. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and Lodgepole Pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest science*, v.25, n.4, p.585-90, 1979.

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

SAWYER, N.A.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. *Australian Journal of Botany*, v.51, p.151-158, 2003.