



Departamento de Paisagem, Ambiente e Ordenamento

Licenciatura em Ecologia e Ambiente

Estratégia para a Micorrização por Fungos Micorrizicos Arbusculares de Plantas de Eucalipto Produzidas em Viveiro

Relatório de Trabalho Final

Realizado por Íris dos Santos Ribeiro nº55199

Supervisora e Orientadora: Prof^ª. Doutora Isabel Brito

Évora

2025



Departamento de Paisagem, Ambiente e Ordenamento

Licenciatura em Ecologia e Ambiente

Estratégia para a Micorrização por Fungos Micorrizicos Arbusculares de Plantas de Eucalipto Produzidas em Viveiro

Relatório de Trabalho Final

Realizado por Íris dos Santos Ribeiro nº55199

Supervisora e Orientadora: Prof^ª. Doutora Isabel Brito

Évora

2025

Agradecimentos

A conclusão deste relatório de estágio representa um marco importante na minha trajetória académica e profissional. Este percurso não teria sido possível sem o apoio, a orientação e a colaboração de várias pessoas, a quem deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional ao longo de todo este processo.

Ao meu namorado, Bruno, pela paciência, motivação constante e por estar sempre ao meu lado, especialmente nos momentos mais desafiantes.

À Professora Doutora Isabel Brito, minha orientadora, pelo acompanhamento dedicado, pela partilha de conhecimento e pela disponibilidade constante durante todas as fases deste estágio.

À Lúcia e à Dona Gertrudes, pelo auxílio prestado com tanto cuidado e generosidade.

Ao Luís Brites e ao João Fanha, pelo tempo, disponibilidade e toda a ajuda.

À empresa The Navigator Company, pelo acolhimento e pela disponibilização dos materiais e recursos essenciais ao bom desenvolvimento das atividades do estágio.

A todos, o meu profundo agradecimento.

Resumo

A produção de *Eucalyptus globulus* enfrenta desafios consideráveis no contexto florestal português, especialmente durante a fase de transplante do viveiro para o campo, momento em que ocorre o denominado choque de transplante. Esse fenómeno compromete frequentemente o enraizamento, a sobrevivência e o crescimento inicial das plantas, principalmente em solos pobres ou sujeitos a stresse abiótico. Uma alternativa sustentável e promissora para mitigar este problema consiste na utilização de fungos micorrízicos arbusculares (AMF), que estabelecem simbioses benéficas com as raízes das plantas. Os AMF promovem melhorias fisiológicas e nutricionais, como a eficiência na absorção de fósforo, a tolerância ao stresse hídrico e a fotossíntese.

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da micorrização precoce em mudas de eucalipto produzidas em viveiro, por meio do uso de plantas “*Developer*” (*Lolium multiflorum* e *Ornithopus compressus*), capazes de desenvolver uma rede micelial extrarradicular (ERM) no solo antes da introdução das estacas de eucalipto. Foram comparados cinco tratamentos distintos que variaram quanto à presença de diferentes plantas “*Developer*”, e após a destruição da sua biomassa aérea, à perturbação ou não para verificação o efeito do ERM na colonização das jovens plantas de eucalipto e seu desenvolvimento. Para além da taxa de colonização micorrízica, avaliaram-se vários indicadores morfológicos (altura e peso seco das plantas, comprimento e peso fresco das raízes) e fisiológicos (Fv/Fm, índice de performance fotossintética e teor de clorofila).

Os resultados mostraram que os tratamentos com micorrização precoce, especialmente aqueles em que o ERM foi mantido intacto (sem perturbação do solo), apresentaram maiores valores nos parâmetros fisiológicos, indicando plantas mais bem preparadas para suportar condições adversas. No entanto, os melhores resultados morfológicos foram observados no tratamento controlo, sem qualquer tipo de micorrização, sugerindo que os benefícios fisiológicos da simbiose ainda não se haviam traduzido em ganhos de crescimento visível no curto prazo.

Este trabalho evidencia o potencial da micorrização precoce para fortalecer a resiliência das plantas e destaca a importância da manutenção da integridade do solo e da rede micelial no sucesso da inoculação. A sua aplicação em viveiros florestais pode representar uma estratégia ecológica eficaz para aumentar a sustentabilidade, reduzir o uso de fertilizantes e melhorar a taxa de sobrevivência das mudas após o transplante.

Abstract

The production of *Eucalyptus globulus* seedlings faces considerable challenges in the Portuguese forestry context, especially during the transplanting phase from the nursery to the field, when the so-called transplant shock occurs. This phenomenon often compromises the rooting, survival and initial growth of plants, especially in poor soils or those subject to abiotic stress. A sustainable and promising alternative to mitigate this problem is the use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which establish beneficial symbiosis with plant roots. AMF promote physiological and nutritional improvements, such as phosphorus absorption efficiency, water stress tolerance and photosynthesis.

This study aimed to evaluate the effects of early mycorrhization on eucalyptus seedlings produced in a nursery, through the use of 'Developer' plants (*Lolium multiflorum* and *Ornithopus compressus*), capable of developing an extraradicular mycelial network (ERM) in the soil before the introduction of eucalyptus cuttings. Five different treatments were compared, varying in the presence of different 'Developer' plants, and after the destruction of their above-ground biomass, with or without disturbance to verify the effect of ERM on the colonisation of young eucalyptus plants and their development. In addition to the mycorrhizal colonisation rate, several morphological (plant height and dry weight, root length and fresh weight) and physiological (F_v/F_m , photosynthetic performance index and chlorophyll content) indicators were evaluated.

The results showed that treatments with early mycorrhization, especially those in which the ERM was kept intact (without soil disturbance), had higher values in physiological parameters, indicating plants that were better prepared to withstand adverse conditions. However, the best morphological results were observed in the control treatment, without any type of mycorrhization, suggesting that the physiological benefits of symbiosis had not yet translated into visible growth gains in the short term.

This work highlights the potential of early mycorrhization to strengthen plant resilience and emphasizes the importance of maintaining soil integrity and the mycelial network for successful inoculation. Its application in forest nurseries may represent an effective ecological strategy to increase sustainability, reduce fertilizer use, and improve seedling survival rates after transplantation.

Palavras-chave:

Micorrizas, ERM, AMF, Solo, Eucalipto, Fungos Micorrízicos Arbusculares, Viveiro, Resiliência, Transplante, Sustentabilidade florestal.

Índice

<i>Agradecimentos:</i>	<i>iv</i>
<i>Resumo</i>	<i>v</i>
<i>Abstract</i>	<i>vi</i>
<i>Palavras-chave</i>	<i>vii</i>
<i>Introdução</i>	<i>9</i>
<i>Metodologia</i>	<i>12</i>
<i>Resultados</i>	<i>20</i>
<i>Discussão de resultados</i>	<i>28</i>
<i>Conclusão</i>	<i>30</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>32</i>

Introdução

A exploração de *Eucalyptus globulus* representa uma das principais atividades do setor florestal em Portugal, com impactos significativos a nível económico, social e ambiental. Esta espécie constitui a base da indústria nacional de pasta e papel, na qual Portugal assume uma posição de destaque a nível europeu. Neste contexto, a The Navigator Company desempenha um papel central enquanto um dos principais operadores industriais do setor. O cultivo desta espécie integra-se numa cadeia de valor estratégica, que alia a produção florestal à transformação industrial e à internacionalização dos produtos derivados (The Navigator, 2025).

No entanto, a instalação e manutenção das plantações de eucalipto enfrentam desafios relevantes, sendo o choque de transplante um dos mais críticos. Este fenómeno, caracterizado pela elevada mortalidade e fraco enraizamento após a transferência das plantas do viveiro para o campo, é particularmente agravado em solos pobres e sujeitos a stresse abiótico como seca, salinidade ou deficiência nutricional. Neste contexto, a associação simbiótica com fungos micorrízicos arbusculares (AMF), tal como descrito por Abdel Latef *et al.* (2016), revela-se uma estratégia promissora para atenuar os efeitos negativos do choque de transplante. Os AMF promovem uma melhor absorção de água e nutrientes, aumentam a tolerância ao stresse oxidativo, fortalecem o crescimento radicular e melhoram a integridade das membranas celulares — fatores cruciais para o sucesso do estabelecimento das mudas em ambientes adversos. Assim, a inoculação micorrízica pode ser uma ferramenta ecológica e eficaz para melhorar a adaptação do eucalipto ao campo, aumentando a taxa de sobrevivência e o vigor inicial das plantas (Abdel Latef *et al.*, 2016).

Neste contexto, as micorrizas arbusculares (MA) assumem um papel central na promoção da sustentabilidade e produtividade dos sistemas florestais e agrícolas. As MA são simbioses estabelecidas entre fungos do filo *Glomeromycota* e as raízes da maioria das plantas terrestres, caracterizando-se pela formação de estruturas especializadas denominadas arbúsculos no interior das células radiculares. Estes arbúsculos constituem o principal local de troca de nutrientes entre o fungo e a planta, permitindo ao fungo fornecer nutrientes à planta, sobretudo os pouco móveis no solo, como o fósforo, bem como água, em troca de compostos carbonados e lípidos derivados da fotossíntese da planta hospedeira (Parniske, 2008; Brito *et al.*, 2008).

A rede micélio extrarradicular dos AMF pode atingir mais de 100 metros por centímetro cúbico de solo, aumentando consideravelmente o volume de solo explorado pelas raízes

e, consequentemente, a eficiência na absorção de nutrientes e água (Parniske, 2008). Esta simbiose é particularmente relevante em condições de limitação nutricional, seca, salinidade ou toxicidade por metais pesados, situações frequentes nos solos portugueses onde se instalam plantações de eucalipto (Abdel Latef *et al.*, 2016); (Brito *et al.*, 2008).

A micorrização arbuscular contribui, assim, para a melhoria do crescimento e desenvolvimento das plantas, promovendo uma série de benefícios: maior aquisição de nutrientes, especialmente fósforo, aumento da tolerância a stresses abióticos (salinidade, seca, temperaturas extremas, metais pesados), proteção contra patógenos do solo, melhoria da estrutura do solo através da estabilização dos agregados e aumento da sua capacidade de retenção de água (Brito *et al.*, 2008);(Abdel Latef *et al.*, 2016)(Parniske, 2008).

A integridade do micélio extraradicular (ERM) dos AMF é um fator determinante para a precocidade no estabelecimento da simbiose micorrízica em sistemas agrícolas, Brito, *et al.* (2012) demonstraram que a perturbação do solo, ao romper a estrutura do ERM, reduz significativamente a colonização inicial da planta hospedeira, assim como, a diversidade das comunidades de AMF que a colonizam, o que pode comprometer sua funcionalidade. Em estudos subsequentes, verificou-se que a presença de um ERM intacto, previamente desenvolvido por plantas micotróficas e a que se chamou “*Developer*”, favoreceu a colonização mais precoce e eficaz das raízes de culturas como trigo, trevo subterrâneo, milho e tomate (Brito *et al.*, 20221) tendo-se traduzido na proteção destas culturas contra stresses bióticos e abióticos.

A micorrização precoce, ou seja, o estabelecimento da simbiose micorrízica ainda em viveiro, antes do transplante para o campo, pode revelar-se fundamental para o sucesso das plantações de eucalipto. A presença no solo de uma rede ERM intacta no momento da instalação das estacas em viveiro permite uma colonização mais rápida e eficaz das raízes das plantas jovens, facilitando a absorção de nutrientes e água e reduzindo significativamente os efeitos negativos do choque de transplante (Rietveld, 1989).

Estudos experimentais demonstram que, em culturas como trigo, trevo-subterrâneo e milho, a micorrização precoce proporciona aumentos expressivos na biomassa, maior eficiência no uso de fósforo e redução da acumulação de metais tóxicos, como o manganês, nos tecidos vegetais (Brito *et al.*, 2021; Alho *et al.*, 2015). Por exemplo, no caso do trigo, a colonização precoce permitiu uma biomassa aérea 2,7 vezes superior e uma redução de 45% na concentração de manganês nas folhas; no trevo-subterrâneo, a biomassa aumentou 4,7 vezes e a concentração de manganês nas raízes diminuiu

30%. No caso do milho, mesmo com aplicação de doses elevadas de fósforo, a colonização manteve-se elevada (até 58%), permitindo maior eficiência no uso do nutriente e crescimento ótimo com menores doses de fertilizante (Brito *et al.*, 2013b). Estes resultados evidenciam o potencial da micorrização precoce para aumentar a resiliência das plantas a diversos tipos de stresse, incluindo défices nutricionais e toxicidade por metais, e apontam para a sua aplicação vantajosa em eucalipto, onde o choque de transplanteo é uma das principais limitações ao sucesso das plantações.

Para potenciar a eficácia da micorrização precoce, recorre-se à utilização de espécies “*Developer*”, que são plantas altamente micotróficas e capazes de desenvolver rapidamente uma rede ERM no solo.

No presente trabalho, foram utilizadas a Serradela (*Ornithopus compressus* L.), uma leguminosa adaptada a solos pobres, e o Lolium (*Lolium multiflorum*), uma gramínea de crescimento rápido. Estas espécies, quando cultivadas previamente no solo e posteriormente destruídas quimicamente sem mobilização do solo, deixam uma rede micelial intacta que serve de inóculo eficiente para as culturas subsequentes (Brito *et al.*, 2013). O conceito de “*Developer*” baseia-se precisamente nesta capacidade de preparar o solo, promovendo uma colonização micorrízica rápida e eficaz das plantas de interesse económico, aproveitando a diversidade e funcionalidade dos fungos micorrízicos indígenas.

A escolha das espécies “*Developer*” é estratégica, pois permite a manutenção de uma rede micelial ativa e funcional no solo, mesmo após a eliminação das plantas “*Developer*”s, garantindo assim uma rápida colonização das culturas seguintes. A Serradela, enquanto leguminosa, contribui ainda para a fixação biológica de azoto, melhorando a fertilidade do solo, enquanto o Lolium, devido ao seu rápido desenvolvimento radicular, proporciona uma extensa rede de micélio extrarradicular em pouco tempo (Brito *et al.*, 2013). Esta abordagem permite também reduzir a necessidade de mobilização do solo, o que, por sua vez, preserva a estrutura do solo e a diversidade da comunidade micorrízica (Brito *et al.*, 2012).

Os objetivos do presente trabalho centram-se em: verificar a influência da micorrização prévia sobre o vigor inicial de culturas subsequentes, como o eucalipto; analisar a resposta morfofisiológica das plantas inoculadas, com especial foco no crescimento aéreo e radicular; observar se as plantas em estudo saem do viveiro com melhores condições para ir para o campo; e contribuir para o desenvolvimento de práticas de produção mais eficientes em viveiros florestais, recorrendo a simbioses micorrízicas funcionais.

A importância deste trabalho reside na possibilidade de aumentar a sustentabilidade e eficiência dos sistemas de produção florestal, reduzindo a necessidade de fertilizantes químicos, minimizando perdas associadas ao choque de transplante e promovendo a resiliência das plantas face a condições adversas.

Estes avanços são particularmente relevantes para empresas como a Navigator, que tem investido em práticas florestais inovadoras e sustentáveis, alinhadas com os princípios da bioeconomia circular e da conservação dos recursos naturais, procurando soluções que aumentem a eficiência e a sustentabilidade das suas plantações. A adoção de técnicas inovadoras, como a micorrização precoce e a utilização de espécies “*Developer*”, poderá inserir-se numa estratégia mais ampla de sustentabilidade, que visa garantir a competitividade da fileira do eucalipto a longo prazo, minimizando os impactos ambientais e maximizando os benefícios económicos e sociais para as comunidades envolventes. (The Navigator Company, 2025)

Em síntese, a exploração do *Eucalyptus globulus* em Portugal enfrenta desafios que podem ser superados através da integração de estratégias baseadas na biotecnologia micorrízica. A micorrização precoce, suportada por espécies “*Developer*” como a Serradela e o Lolium, poderá emergir como uma solução eficaz para aumentar o sucesso das plantações, promover a resiliência das plantas a stresse abiótico e reduzir a dependência de produtos químicos.

O presente relatório procura demonstrar, com base em evidências experimentais e bibliográficas, a viabilidade e os benefícios desta abordagem, contribuindo para o desenvolvimento de sistemas florestais mais produtivos, resilientes e sustentáveis.

Metodologia

A metodologia deste estudo foi concebida para avaliar o impacto da pré-micorrização mediada por plantas “*Developer*” na colonização micorrízica e no desempenho inicial de mudas de eucalipto, sob diferentes condições de solo e plantas “*Developer*”. O ensaio decorreu entre 14 de fevereiro e de 20 julho de 2025, utilizando cinco tabuleiros com 60 alvéolos cada, organizados de acordo com os seguintes tratamentos (Figura 1):

Os tratamentos variaram quanto à presença de plantas “*Developer*” e à perturbação do solo.

A perturbação mecânica teve como principal objetivo a destruição da rede EMR preexistente devido à presença das plantas “*Developer*”, comprometendo a continuidade das hifas, proporcionando a reconstrução das mesmas. Este cenário

permite testar a eficácia da micorrização precoce na ausência e presença de estruturas micorrízicas funcionais já estabelecidas.

Ao aplicar o herbicida de forma controlada, procurou-se ainda simular condições passíveis de ser usadas em sistemas de produção agroflorestal, onde o controlo de das plantas “*Developer*” terá que ser feito em larga escala, caso a estratégia se revele útil e possa ser implementada.

Foram testadas duas abordagens de micorrização precoce composta por duas plantas distintas:

- O uso de Lolium, uma gramínea de crescimento rápido.
- A combinação de Lolium com Serradela, uma leguminosa que contribui para o aumento da diversidade funcional do solo, podendo favorecer a instalação de AMF.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes:

- **LHD (Lolium + herbicida + solo perturbado):** Onde o eucalipto terá de restabelecer comunidades micorrízicas num solo mecanicamente perturbado.
- **LHU (Lolium + herbicida + solo não perturbado):** A rede ERM preservada, interações biológicas pré-existent e capacidade de micorrização precoce.
- **SLHD (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado):** Estudo do efeito combinado de uma gramínea e uma leguminosa “*Developer*” num solo perturbado.
- **SLHU (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado):** Com as duas espécies “*Developer*” com o solo e rede EMR preservado.
- **C (Controlo – sem plantas “*Developer*” nem herbicida):** Tratamento de referência sem intervenção, permitindo isolar o efeito das variáveis testadas.
- **Lolium; Lolium+Serradela:** Controlo da micorrização das plantas “*Developer*”.

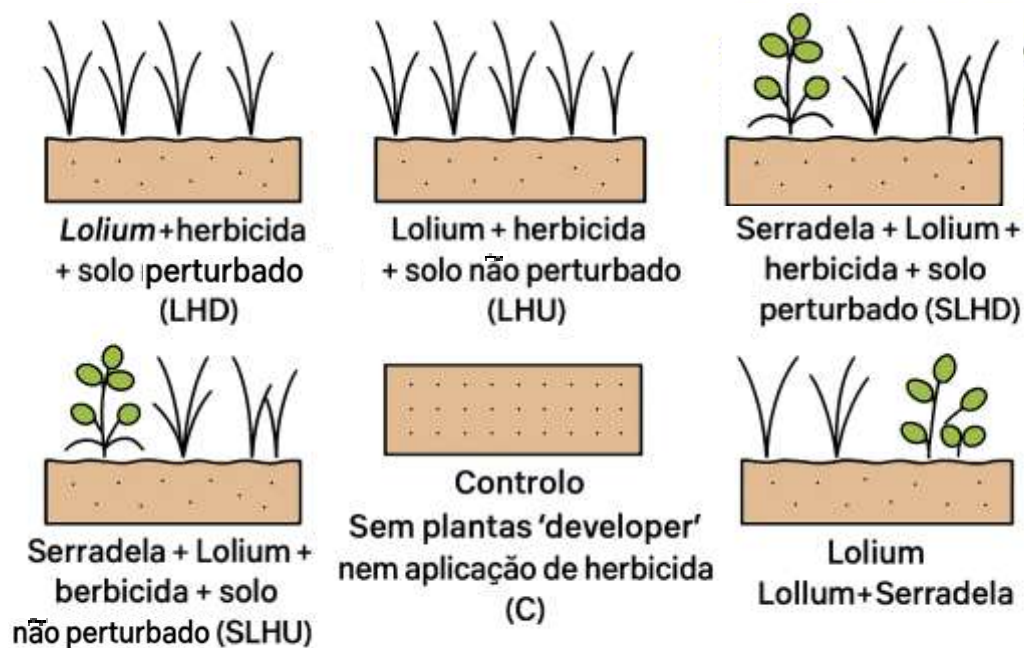


Figura 1- Tabuleiros com o tipo de tratamento

Fonte: Acervo Pessoal

As sementes de *Lolium* e Serradela foram inicialmente submetidas a germinação em condições controladas (Figura 2). Para tal, utilizou-se um tabuleiro forrado com papel humedecido, sobre o qual as sementes foram distribuídas de forma uniforme. O tabuleiro foi então coberto com película aderente, para manter a humidade necessária ao processo germinativo.



Figura 2- Sementes Serradela (*Ornithopus compressus* L.) (Tabuleiro da Direita) e de Lolium (*Lolium multiflorum*) (Tabuleiro da Esquerda) a germinar.

Fonte: Acervo Pessoal

Após a germinação e desenvolvimento (Figura 3 e 4), das plântulas procedeu-se ao seu transplante para os alvéolos dispostos em tabuleiros previamente preparados (Figura 6) com uma mistura homogênea (1/1) de solo crivado (Figura 7) e o substrato normalmente usado em fase de viveiro pela empresa Navigator.



Figura 3- Sementes *Lolium* (*Lolium multiflorum*) germinadas

Fonte: Acervo Pessoal



Figura 4 - Sementes Serradela (*Ornithopus compressus* L) germinadas

Fonte: Acervo Pessoal



Figura 5- Serradela (*Ornithopus compressus* L) e de *Lolium* (*Lolium multiflorum*) plantadas.

Fonte: Acervo Pessoal



Figura 6- Enchimento alvéolos

Fonte: Acervo Pessoal



Figura 7- Crivação do solo

Fonte: Acervo Pessoal

As plantas *Developer* foram mantidas em estufa e devidamente suplementadas, em termos hídricos, e cresceram durante 43 dias. Nesta altura, foi aplicado um herbicida polivalente à base de ácido pelargónico (43 g/L) (Figura 8), com o objetivo de eliminar a biomassa aérea das plantas “*Developer*”. Em seguida, nos tratamentos LHD e SLHD, o solo foi sujeito a uma perturbação mecânica, crivagem num crivo com uma malha de 4mm e novamente colocado nos respectivos alvéolos. Desta forma o ERM desenvolvido pelas plantas “*Developer*” foi destruído, funcionando assim este tratamento como controlo negativo do efeito da rede de ERM intacta. Nos tratamentos LHU e SLHU o solo não sofreu qualquer tipo de perturbação, pelo que o ERM previamente desenvolvido pelas plantas “*Developer*” permaneceu intacto e capaz de gerar a colonização micorrizica precoce na planta seguinte.



Figura 8- Herbicida utilizado.

Fonte: Acervo Pessoal

Antes da introdução do eucalipto, foram recolhidas amostras de raízes das plantas “*Developer*” (Figura 9) com o objetivo de avaliar a colonização micorrízica arbuscular.



Figura 9- Serradela (*Ornithopus compressus* L.) e de Lolium (*Lolium multiflorum*), recolha de raízes.

Fonte: Acervo Pessoal

Após um período de sete dias para estabilização e degradação dos resíduos do herbicida, as estacas de *Eucalyptus spp.* (clone 1002), fornecido pela The Navigator Company, foram colocadas nos alvéolos dos respetivos tabuleiros. As estacas utilizadas foram obtidas por propagação vegetativa, uma prática comum em viveiros florestais. Esta técnica envolve a utilização de segmentos de ramos jovens com gemas ativas, que são enraizados em ambiente controlado.

Durante todo o período experimental, foi mantido um regime de irrigação diária de modo a garantir uma disponibilidade hídrica constante e reduzir as variações associadas ao stress hídrico. Complementarmente à rega dos alvéolos, recorreu-se ao humedecimento

das folhas com pulverizador, com o objetivo de assegurar a manutenção da humidade nas folhas de eucalipto por um período prolongado. Foi igualmente incorporado adubo de libertação controlada, na mesma dosagem utilizada habitualmente em viveiro, de forma a garantir a disponibilidade gradual de nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas (*Osmocote Bloom*), com uma fórmula equilibrada rica em azoto (N), fósforo (P) e potássio (K), de forma a garantir os nutrientes essenciais ao crescimento das plantas.

A monitorização incluiu o registo sistemático da taxa de mortalidade das mudas de eucalipto e dos rebentos formados, variáveis fundamentais, para avaliar o vigor inicial e a capacidade de recuperação pós-transplante.

Para avaliar o estabelecimento inicial das estacas de eucalipto, foi realizada uma primeira observação, (Fig. 10), onde as plantas foram classificadas como: mortas, duvidosas e vivas. Uma nova avaliação foi efetuada numa fase posterior, 1 mês e 5 dias após a plantação, mantendo-se a divisão em três classes, mas com critérios ajustados: classe 0 (mortas), classe 1 (inferior a 1 cm), classe 2 (superior a 1 cm).



Mortas



“Duvidosas”



Viva

Figura 10- Classificação inicial

Fonte: Acervo Pessoal



Classe 0



Classe 1



Classe 2

Figura 11- Classificação por classes

Fonte: Acervo Pessoal

No dia 7 de julho de 2025, 3 meses após plantação, foi realizada a colheita das plantas de eucalipto, procedendo-se à avaliação dos seguintes parâmetros:

- Peso seco da parte aérea, altura, peso fresco e comprimento das raízes;
- Parâmetros fotossintéticos;
- Colonização micorrízica das raízes de eucalipto, seguindo o protocolo aplicado também às plantas “*Developer*”.



Figura 12- Colheita Eucalipto

Fonte: Acervo Pessoal

Para a medição dos parâmetros fotossintéticos, foram utilizados dois equipamentos da *Hansatech Instruments*. O *CL-01 Chlorophyll Content Meter* foi utilizado para quantificar a clorofila, pigmento fundamental na captação de luz pela planta. Já o *Pocket PEA (Plant Efficiency Analyzer)* permitiu a obtenção dos parâmetros F_v/F_m e PI .

O parâmetro F_v/F_m indica a eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII) sob condições de adaptação ao escuro, sendo amplamente utilizado como indicador do potencial fotossintético. Esse parâmetro é essencial para compreender o estado fisiológico das plantas, pois mede a capacidade de conversão da energia luminosa em

energia química, oferecendo informações relevantes sobre a saúde e a produtividade das culturas (Wu, Q., *et al.* 2023). Já o *PI* (*Performance Index*) é um índice mais abrangente, que reflete a eficiência funcional do PSII, tendo em conta a absorção de luz (Çiçek, Nuran *et al.* 2015)

As raízes foram submetidas ao processo de coloração segundo o método de Phillips e Hayman (1970), com adaptações. Inicialmente, as amostras foram lavadas com água corrente para remover o solo aderente e, posteriormente, colocadas em cassetes de histologia devidamente numeradas. Foram clarificadas em solução de hidróxido de potássio (KOH a 10%) (Figura 14) a 121°C durante 15 minutos na autoclave. Após a lavagem com água, as raízes são coradas com azul de tripano (0,1%) (Figura 13) em banho-maria a 70 °C durante cerca de 15 minutos. As amostras foram depois conservadas em glicerol (Figura 15) até observação.



Figura 13- Cassetes em solução de hidróxido de potássio (KOH a 10%)

Fonte: Acervo Pessoal



Figura 14- Cassetes coradas com azul de tripano (0,1%)

Fonte: Acervo Pessoal



Figura 15- Cassetes conservadas em glicerol

Fonte: Acervo Pessoal

A quantificação da colonização micorrízica foi realizada de acordo com o protocolo de McGonigle *et al.* (1990), através do método das interseções. Fragmentos de raiz com cerca de 1 cm foram montados em lâminas e observados ao microscópio ótico com uma ampliação de 200x. A presença de estruturas micorrízicas (hifas, arbúsculos e vesículas) foi registada em pontos de interseção definidos por uma grelha sobre o campo de visão, avaliando-se no mínimo 100 pontos por amostra. Com base nesses dados, foi calculada a percentagem de colonização micorrízica.

Os dados obtidos foram organizados em Excel e analisados estatisticamente no software SPSS.

Foram analisadas as plantas classificadas como classe 1 e classe 2, por se considerarem estabelecidas com sucesso e com maior relevância para a avaliação do desenvolvimento.

Para cada tratamento, foram utilizadas 60 repetições (1 planta por alvéolo), totalizando 300 plantas nos cinco tratamentos. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) do tipo One Way para comparação dos tratamentos, seguida do teste de Tukey para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as médias (nível de significância de $p \leq 0,05$).

Esta abordagem metodológica permitiu avaliar, de forma integrada e rigorosa, a eficácia da micorrização precoce mediada por plantas “*Developer*” no estabelecimento inicial de *Eucalyptus spp.*, tendo em consideração as interações entre perturbação do solo, composição vegetal e simbioses micorrízicas funcionais nestes tipos de sistemas.

Resultados:

Nesta etapa do trabalho, são descritos os efeitos dos diferentes tratamentos aplicados. A análise estatística revelou diferenças significativas entre os tratamentos, permitindo inferir a eficácia das estratégias utilizadas. Letras diferentes nas colunas dos gráficos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, conforme determinado pelo teste de Tukey após ANOVA.

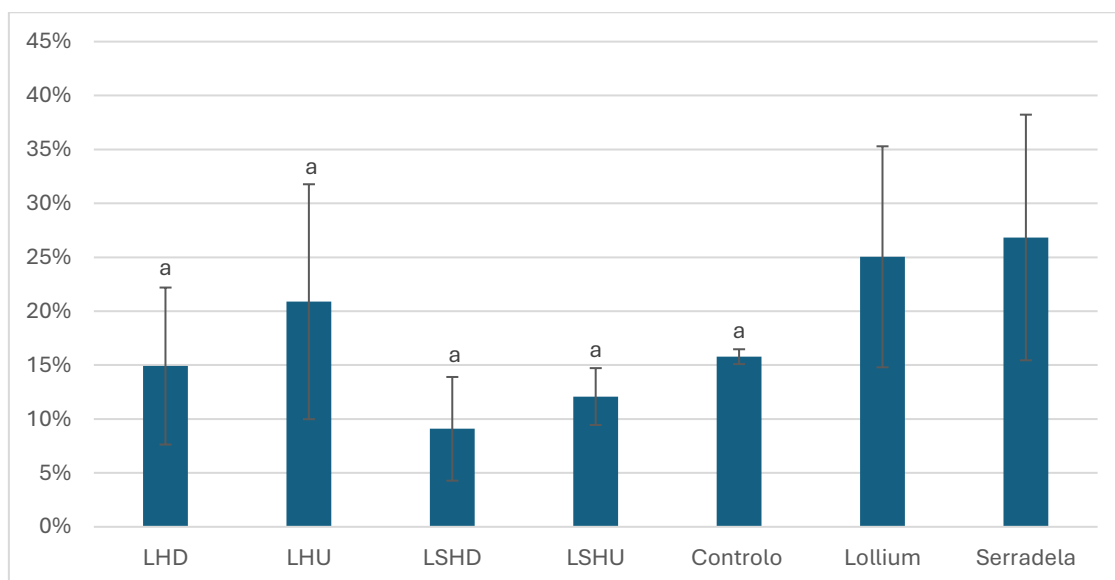


Figura 16- Taxa de colonização arbuscular.

LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.

O gráfico apresentado na Figura 16 confirma que as plantas 'Developer', tanto o *Lolium multiflorum* como a *Ornithopus compressus* (serradela), estavam efetivamente colonizadas por AMF, sendo assim capazes de desenvolver no solo ERM, conforme o objetivo do ensaio.

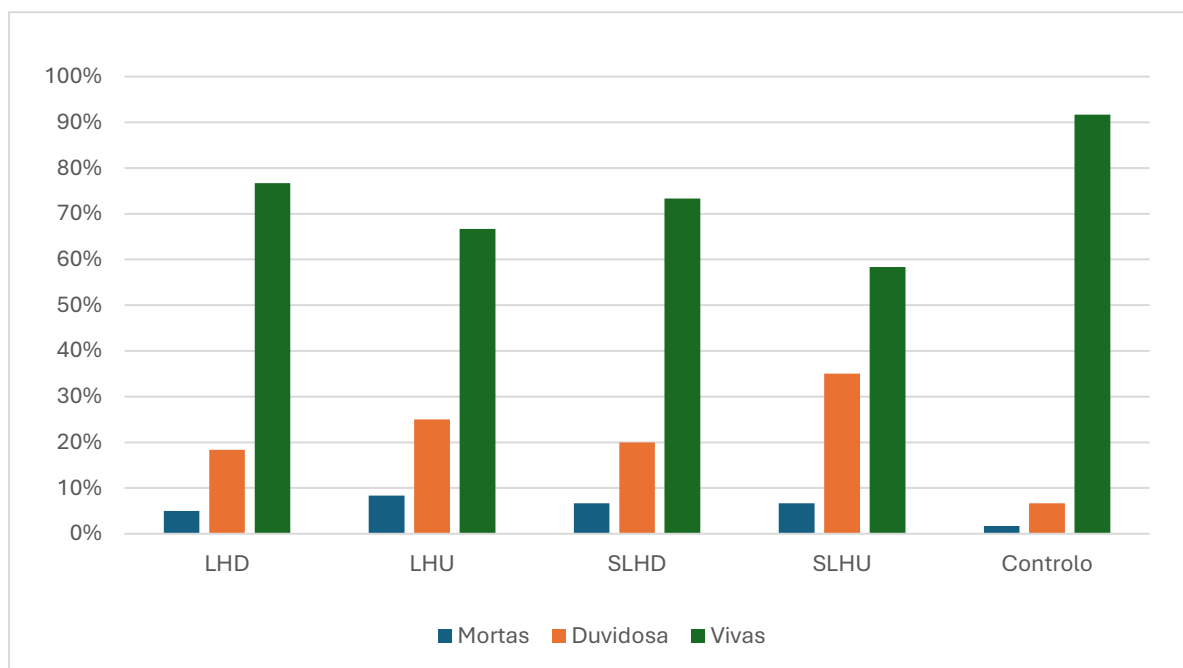


Figura 17- Desenvolvimento Parte Aérea, 15/05/2025, 1 mês e 7 dias após plantação.

LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); SLHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); SLHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Controlo: sem plantas "Developer" nem herbicida.

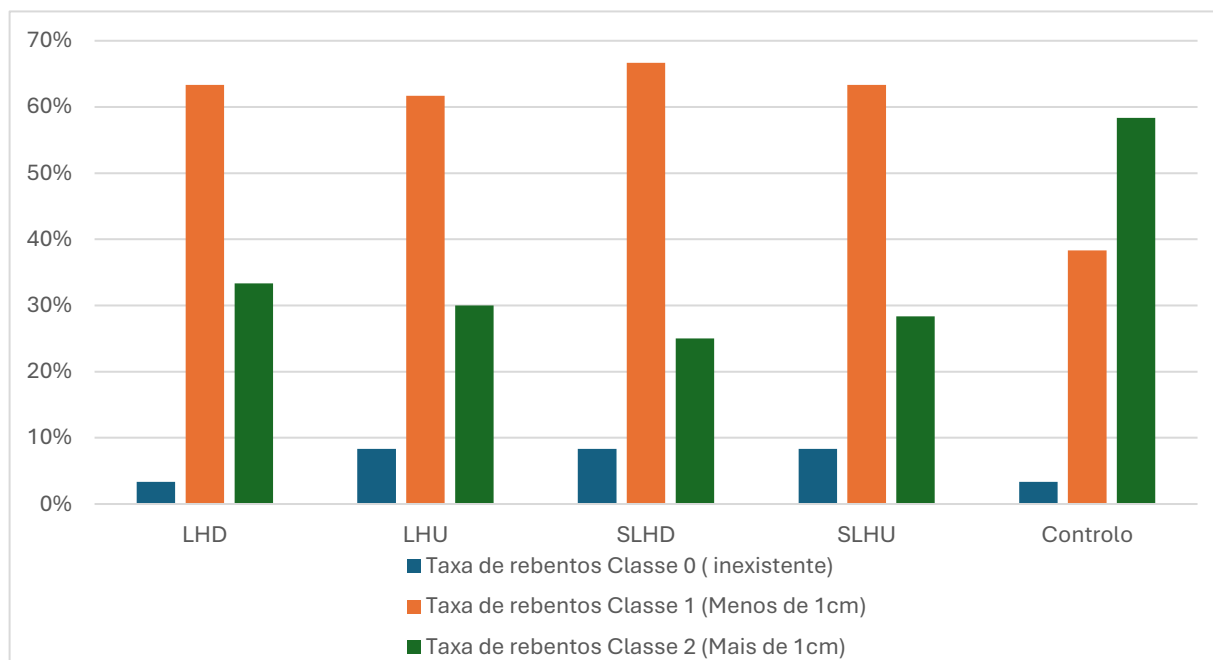


Figura 18- Desenvolvimento Parte Aérea, 13/06/2025, 2 Meses após plantação.

LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); SLHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); SLHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Controlo: sem plantas “Developer” nem herbicida.

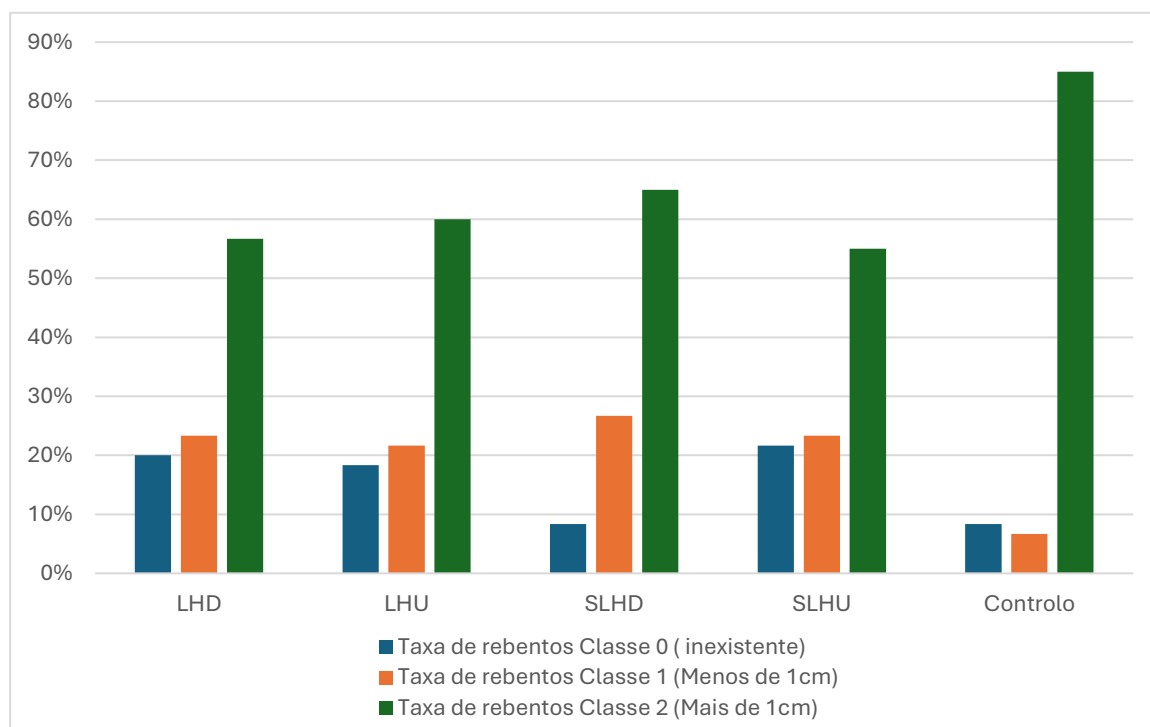


Figura 19- Desenvolvimento Parte Aérea, 07/07/2025, 3 Meses após plantação.

LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.

No primeiro mês, (Figura 17) as plantas de eucalipto encontravam-se maioritariamente em estado vivo e duvidoso, sem grande crescimento. No segundo mês, (Figura 18) registou-se um aumento da Classe 1 em todos os tratamentos, indicando um pico no desenvolvimento vegetativo, com destaque para o Controlo, que atingiu os valores mais elevados. No terceiro mês, (Figura 19) verificou-se uma inversão desta tendência, com um aumento da Classe 2 e redução da Classe 1. Ainda assim, o Controlo manteve o melhor desempenho geral ao longo dos três períodos.

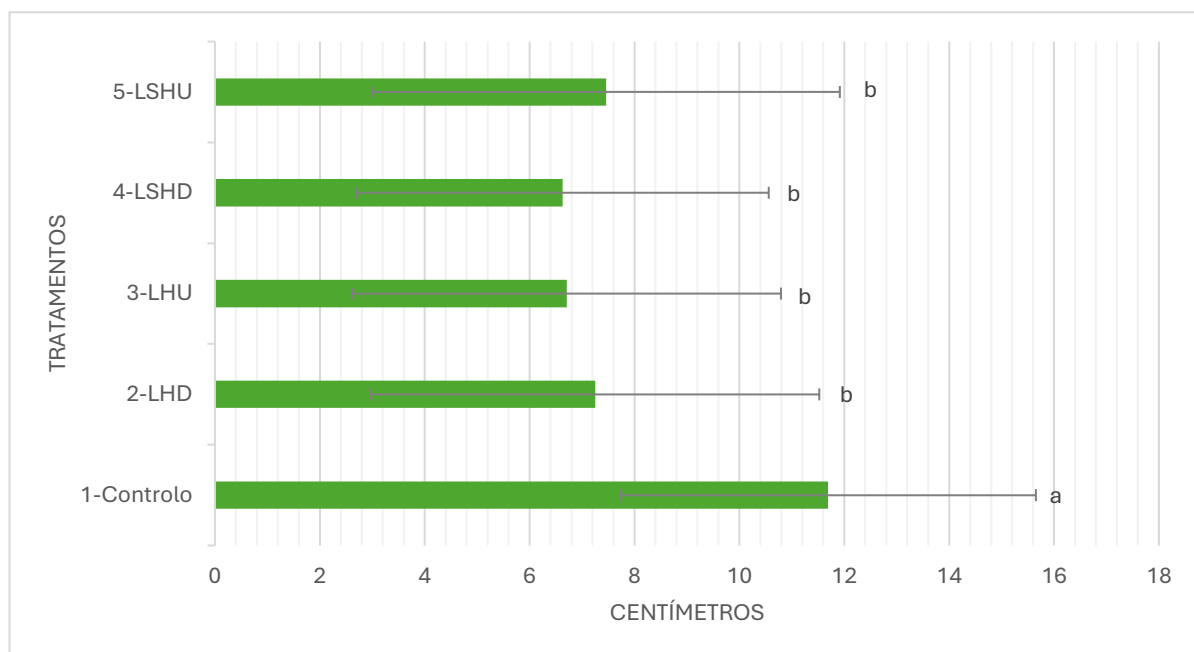


Figura 20- Altura (em cm) das plantas de eucalipto com 3 meses.

1-Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.; 2- LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); 3-LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); 4-LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); 5-LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Com base no gráfico apresentado (Figura 20) o tratamento controlo apresentou a altura média mais elevada, superando todos os restantes tratamentos. Seguiram-se os tratamentos LSHU e LHD. As menores alturas médias registaram-se nos tratamentos LHU e LSHD.

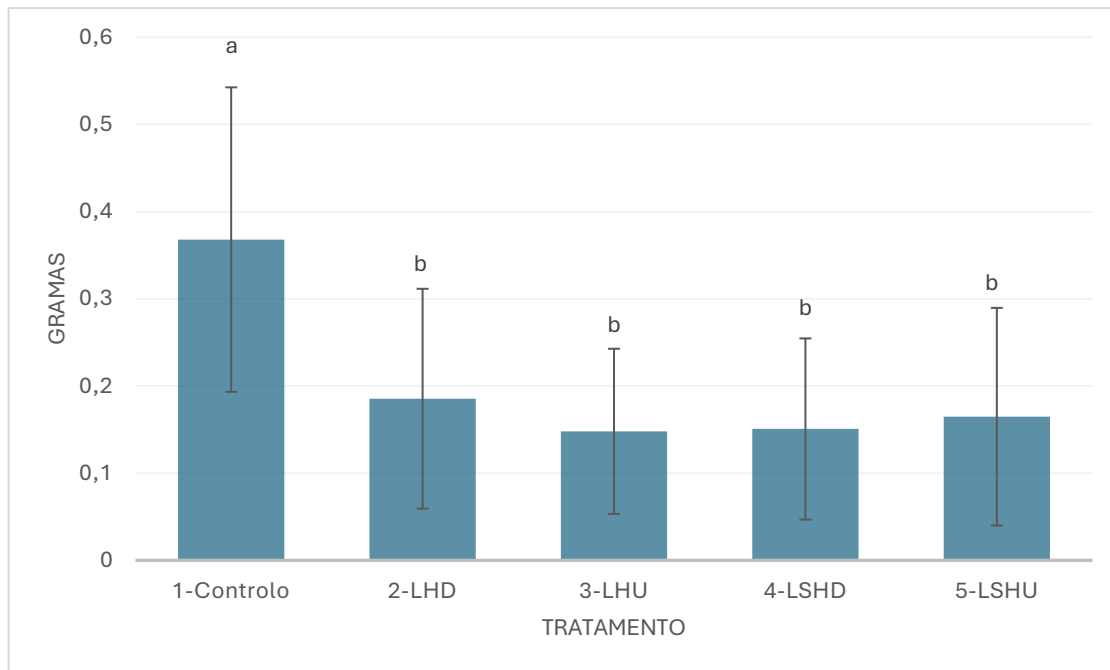


Figura 21- Peso seco da parte aérea, 3 Meses após plantação.

1-Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.; 2- LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); 3-LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); 4-LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); 5-LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

O peso seco é o indicador mais confiável de crescimento real, pois elimina a variabilidade do conteúdo hídrico, refletindo diretamente a eficiência na conversão de recursos em biomassa estrutural.

O Controlo manteve a supremacia também na acumulação de biomassa, com todos os restantes tratamentos apresentando valores substancialmente menores: LHD, LSHU, LSHD e LHU (Figura 21).

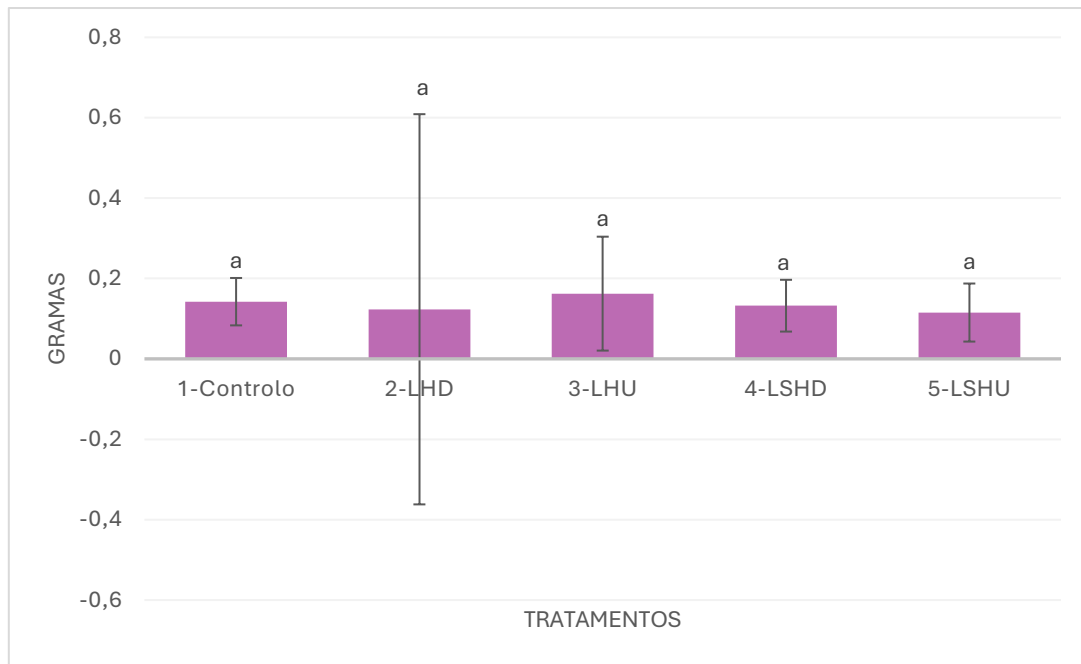


Figura 22- Peso fresco, 3 Meses após plantação.

1-Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.; 2- LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); 3-LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); 4-LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); 5-LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Está associado à capacidade de absorção de água pela planta. O peso fresco é bastante equilibrado entre todos os tratamentos, não se observando diferenças significativas entre qualquer dos tratamentos (Figura 22). Destaca-se a grande variabilidade observada no tratamento LHD.

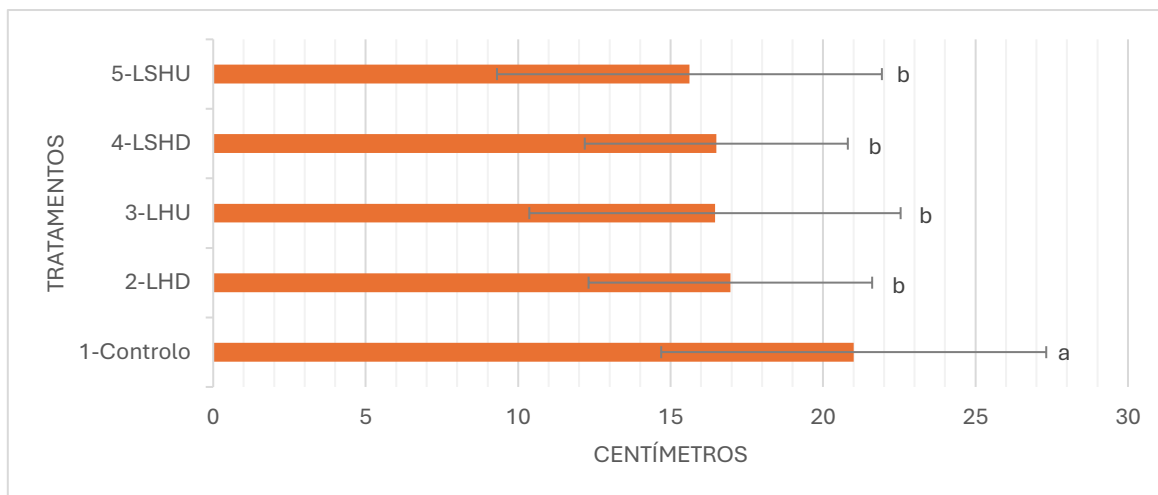


Figura 23- Comprimento da raiz, 3 Meses após plantação.

1-Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.; 2- LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); 3-LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); 4-LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); 5-LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Novamente, o Controlo apresentou o maior desenvolvimento radicular, seguido pelos tratamentos LHD, LSHD, LHU e LSHU (Figura 23). O padrão mantém-se consistente com os parâmetros anteriores.

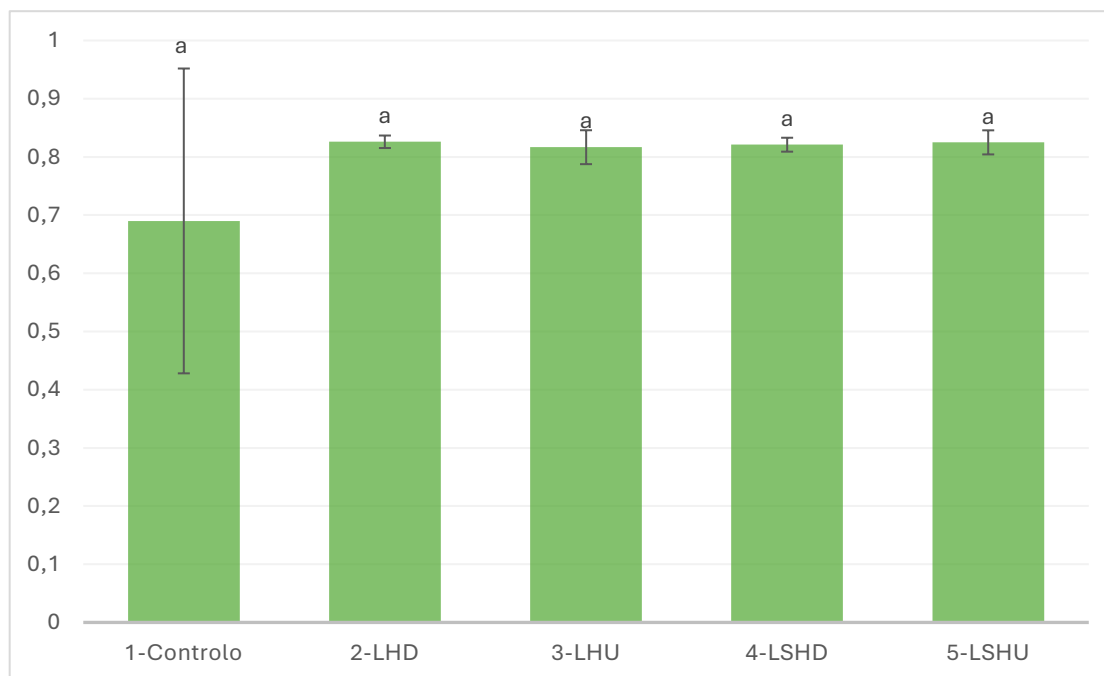


Figura 24 - Fv/Fm, 3 Meses após plantação.

1-Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.; 2- LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); 3-LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); 4-LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); 5-

LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Neste parâmetro é possível observar (Figura 24) uma inversão significativa do padrão anterior. Os tratamentos onde houve “*Developer*”, independentemente da perturbação do solo, apresentaram valores muito superiores ao controlo: LSHU, LHD, LSHD, LHU, enquanto o Controlo apresentou o valor mais baixo. Este é o primeiro parâmetro onde os tratamentos com “*Developer*” demonstram superioridade. Os valores de F_v/F_m próximos a 0,82-0,83 nos tratamentos com “*Developer*” mostram melhor eficiência fotossintética, quando comparados com o controlo.

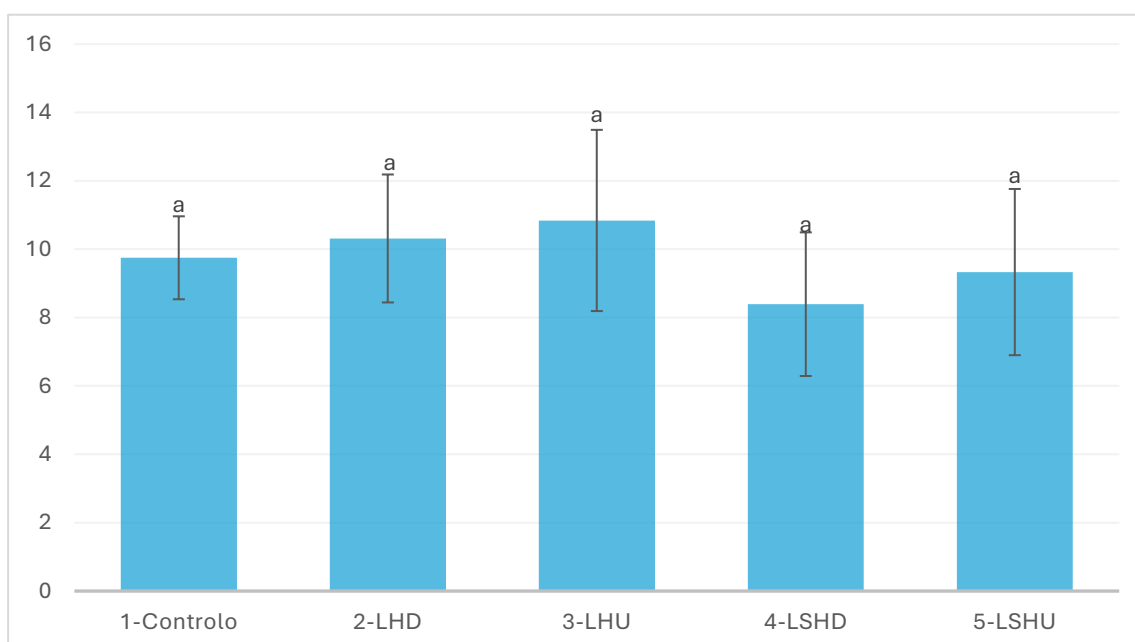


Figura 25- Clorofila (chlorophyll content index), 3 Meses após plantação.

1-Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.; 2- LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); 3-LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); 4-LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); 5-LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

O tratamento LHU registou um *chlorophyll content index* de clorofila, em média, mais elevado entre todos os tratamentos avaliados, destacando-se dos demais, embora não de forma estatisticamente significativa (Figura 25).

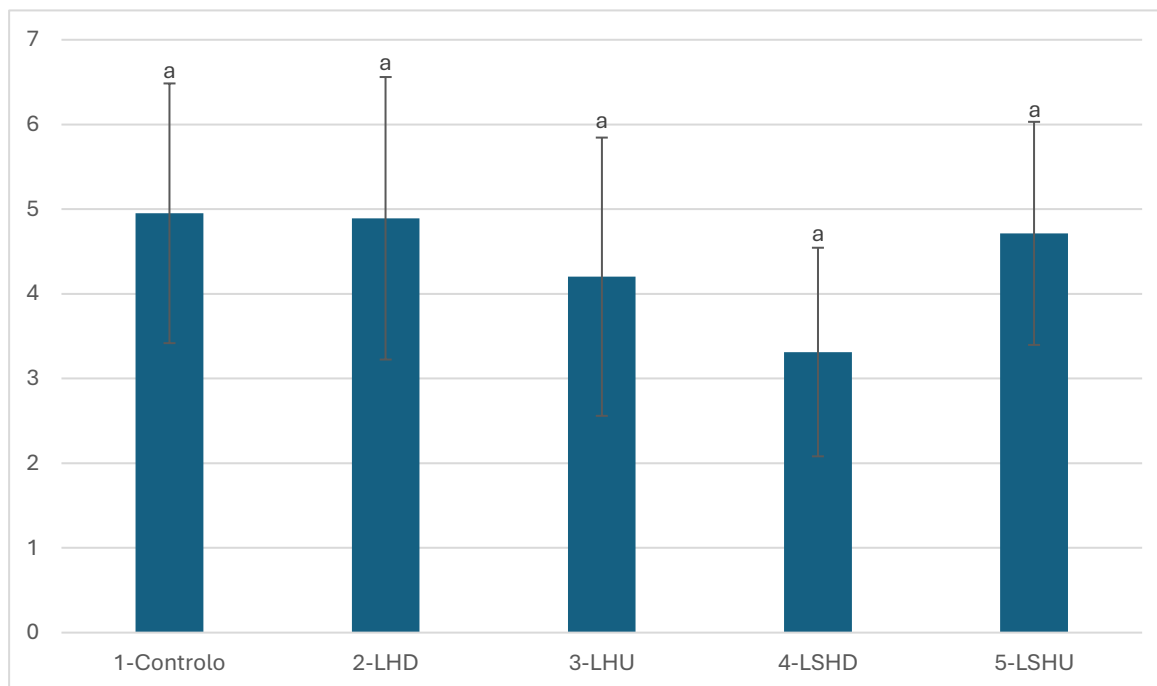


Figura 26- PI (performance index), 3 Meses após plantação.

1-Controlo: sem plantas “*Developer*” nem herbicida.; 2- LHD: (Lolium + herbicida + solo perturbado); 3-LHU: (Lolium + herbicida + solo não perturbado); 4-LSHD: (Serradela + Lolium + herbicida + solo perturbado); 5-LSHU: (Serradela + Lolium + herbicida + solo não perturbado); Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

O PI (*performance index*), é um índice mais abrangente da performance fotossintética e mostra resultados diferentes entre tratamentos, ainda que sem diferenças significativas. Embora o controlo tenha o valor mais alto, a diferença entre os tratamentos é relativamente pequena, exceto para LSHD que apresentou valor ligeiramente menor (Figura 26).

Discussão de resultados

Os resultados obtidos neste ensaio confirmam a relevância da aplicação de plantas “*Developer*” para a promoção de colonização micorrízica precoce em mudas de *Eucalyptus globulus*. Em particular, destaca-se que os tratamentos onde o ERM foi mantido intacto (LHU e LSHU) demonstraram taxas tendencialmente superiores de colonização em comparação com os tratamentos com solo perturbado. Este padrão está de acordo com estudos anteriores que indicam que a continuidade do ERM no solo é crucial para a eficácia da micorrização, uma vez que facilita o contacto direto e rápido entre as hifas e as raízes das plantas hospedeiras (Brito et al., 2012).

O tratamento LHU, que utilizou exclusivamente *Lolium multiflorum* como planta “*Developer*”, revelou uma taxa de colonização micorrizica, tendencialmente mais elevada, acompanhada por um valor também tendencialmente mais elevado de peso fresco das raízes e teor de clorofila (CCI), em comparação aos restantes tratamentos, mesmo que em alguns casos a diferença não seja estatisticamente significativa. Esta correlação positiva sugere que a presença de uma espécie eficiente de “*Developer*” e a presença do ERM criaram condições ideais para uma simbiose funcional, promovendo uma maior absorção de nutrientes e, por consequência, uma maior atividade metabólica da planta. A literatura confirma esta tendência, referindo que as plantas micorrizadas tendem a apresentar um sistema radicular mais funcional e eficiente na absorção de nutrientes essenciais como o fósforo (Parniske, 2008).

Por sua vez, o tratamento LSHU, que envolveu a mistura de *Lolium multiflorum* com *Ornithopus compressus*, também apresentou uma taxa de colonização tendencialmente mais elevada, mas os efeitos fisiológicos e morfológicos foram distintos. Neste tratamento, verificou-se que a altura das plantas de eucalipto foi tendencialmente mais elevada, em comparação com os demais. Este resultado pode ser atribuído à maior diversidade funcional dos fungos micorrízicos arbusculares (AMF) associados às duas espécies “*Developer*”, conferindo maior amplitude de resposta simbiótica. A diversidade de AMF pode contribuir para a promoção de uma simbiose mais robusta, embora nem sempre resulte em efeitos aditivos diretos no crescimento morfológico inicial (Alho et al., 2015).

É ainda relevante considerar que o comprimento das raízes foi inferior nos tratamentos mais micorrizados (LHU e LSHU). Tal fenómeno, longe de ser negativo, está em linha com a teoria ecológica da micorrização, que afirma que a planta, ao estabelecer uma relação simbiótica eficaz, reduz o investimento energético na expansão do sistema radicular, beneficiando da rede de hifas para a absorção de água e nutrientes (Brito et al., 2008). Esta redistribuição de recursos internos pode explicar o maior vigor observado em outros parâmetros fisiológicos, como o teor de clorofila e o PI.

Os dados fisiológicos complementam esta análise. O parâmetro F_v/F_m , que reflete a eficiência máxima do fotossistema II (PSII), manteve-se próximo de 0,83 nos tratamentos com “*Developer*” e ERM intacto, o que é indicativo de plantas em condição saudável, sem sinais de stresse fisiológico relevante. Já os valores de PI situaram-se na faixa de 5 a 15, considerada ótima para plantas com boa performance fotossintética, confirmando a influência benéfica da micorrização sobre o metabolismo fotossintético.

Outro aspecto importante foi o teor de clorofila (CCI), particularmente elevado em LHU, atingindo valores na faixa ideal de 20–35 unidades para folhas medianas em eucaliptos jovens. Este valor reflete uma elevada atividade fotossintética e uma adequada nutrição azotada, reforçando a eficiência do sistema simbiótico estabelecido neste tratamento. Por comparação, os valores mais baixos de CCI nos tratamentos com solo perturbado (LHD e LSHD) indicam uma menor eficiência fisiológica, demonstrando que a destruição da ERM comprometeu o potencial simbiótico.

Finalmente, embora os efeitos no crescimento morfológico total (altura, peso seco total) ainda não sejam estatisticamente significativos entre os tratamentos, observa-se uma tendência clara de melhoria fisiológica nos tratamentos micorrizados. Esta tendência sugere que os benefícios da micorrização se manifestam primeiro ao nível funcional, como já indicado por Rietveld (1989), e apenas posteriormente se traduzem em diferenças visíveis em termos de crescimento estrutural. Assim, o tempo limitado de crescimento (3 meses) pode não ter sido suficiente para que estas vantagens se refletissem plenamente em parâmetros biométricos, reforçando a necessidade de continuidade do ensaio.

Conclusão:

O presente estudo confirma que a estratégia de micorrização precoce com plantas “*Developer*”, associada à manutenção do ERM, tem um impacto significativo na colonização radicular e na qualidade fisiológica das plantas de *Eucalyptus globulus*. Os resultados foram, de forma geral, coerentes com as expectativas iniciais, demonstrando que a presença de uma rede fúngica contínua e funcional pode acelerar o estabelecimento da simbiose e potenciar benefícios fisiológicos relevantes.

O tratamento LHU (com *Lolium multiflorum* apenas e ERM preservada) revelou-se o mais promissor em termos de eficiência simbiótica, promovendo a maior taxa de colonização micorrízica, maior peso fresco da raiz e teor ótimo de clorofila. Estes indicadores apontam para um sistema radicular funcionalmente mais ativo, capaz de sustentar uma maior capacidade de absorção e metabolismo fotossintético, mesmo com menor comprimento de raiz. Este resultado reforça a eficiência da micorrização como ferramenta para reduzir a dependência das plantas de estratégias morfológicas extensivas, substituindo-as por mecanismos fisiológicos mais eficientes.

O tratamento LSHU (mistura de *Lolium* e *Serradela*), embora ligeiramente inferior em alguns aspectos morfológicos, destacou-se pela maior altura das plantas e índice PI superior, sugerindo um benefício mais acentuado sobre o crescimento vegetativo inicial

e a performance fotossintética. Tal comportamento pode estar relacionado com a diversidade funcional de AMF promovida pela combinação de plantas “*Developer*”, o que sugere que a composição da comunidade simbiótica influencia diretamente o tipo de benefício observado na planta hospedeira.

A redução do comprimento da raiz em ambos os tratamentos com ERM intacta reforça a hipótese de que a micorrização eficiente permite à planta otimizar os seus recursos, reduzindo o investimento energético em crescimento radicular extensivo e canalizando-o para processos mais estratégicos, como a produção de biomassa aérea e a atividade fotossintética. Adicionalmente, os valores ótimos de F_v/F_m (0,83) e de PI (entre 5 e 15) validam o bom estado fisiológico das plantas micorrizadas.

Apesar dos benefícios observados, salienta-se que as diferenças entre tratamentos ainda são, em alguns parâmetros, apenas tendências. Esta limitação é, em parte, atribuída ao curto período de duração do ensaio (3 meses), que poderá ter sido insuficiente para que os efeitos fisiológicos se refletissem em diferenças morfológicas significativas. Assim, recomenda-se a continuação do ensaio por um período mais prolongado, de forma a avaliar o impacto da micorrização no longo prazo, nomeadamente após o transplante para campo, onde o stresse hídrico e nutricional é maior.

Em suma, os resultados aqui apresentados suportam a inclusão da micorrização precoce como uma prática viável, ecológica e sustentável nos viveiros florestais, contribuindo para a produção de mudas mais resilientes, com maior eficiência fisiológica e potencial de adaptação a ambientes adversos.

Bibliografia

- Abdel Latef, A. A. H., Hashem, A., Rasool, S., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Egamberdieva, D., Jan, S., Anjum, N. A., & Ahmad, P. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: A review. *Journal of Plant Biology*, 59(5), 407–426.
- Alho, L., Carvalho, M., Brito, I., & Goss, M. J. (2015). The effect of arbuscular mycorrhiza fungal propagules on the growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) under Mn toxicity in ex situ experiments. *Soil Use and Management*, 31, 337–344.
- Brito, I., Antunes, P. M., Carvalho, M., van Tuinen, D., & Goss, M. J. (2008). Agronomic management of indigenous mycorrhizas. In A. Varma (Ed.), *Mycorrhiza* (pp. 375–400). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Brito, I., Carvalho, M., Alho, L., & Goss, M. J. (2013). Managing arbuscular mycorrhizal fungi for bioprotection: Mn toxicity. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 78–84.
- Brito, I., Carvalho, M., Alho, L., Caseirio, M., & Goss, M. J. (2013). Practical exploitation of mycorrhizal fungi in agricultural systems. *Aspects of Applied Biology*, 121, 25–30.
- Brito, I., Goss, M. J., Carvalho, M., Chatagnier, O., & van Tuinen, D. (2012). Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research*, 121, 63–67.
- Çiçek, N., Arslan (Turan), Ö., Çulha Erdal, Ş., Eyidogan, F., & Ekmekci, Y. (2015). Are the photosynthetic performance indexes and the drought factor index satisfactory selection criterion for stress? *Fresenius Environmental Bulletin*.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115(3), 495–501.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161.
- Rietveld, W. J. (1989). Transplanting shock in bareroot conifer seedlings. *USDA Forest Service, North Central Forest Experiment Station. Proceedings of the Intermountain Nurserymen's Association Meeting*.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed.). Academic Press.

Stirbet, A., & Govindjee. (2011). On the relation between the fluorescence parameters Fv/Fm and Φ PSII: A comparison of physiological and historical perspectives. *Photosynthesis Research*, 109(1–2), 101–122.

Wu, Q., Zhang, Y., Xie, M., Zhao, Z., Yang, L., Liu, J., & Hou, D. (2023). Estimation of Fv/Fm in spring wheat using UAV-based multispectral and RGB imagery with multiple machine learning methods. *Agronomy*, 13(4), 1003.

Xia, D., An, X., López, I. F., Ma, C., & Zhang, Q. (2023). Enhancing alfalfa photosynthetic performance through arbuscular mycorrhizal fungi inoculation across varied phosphorus application levels. *Frontiers in Plant Science*, 14.