

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BIANCA LUCCHESI TARGHETTA

**TOLERÂNCIA DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E PLANTAS
ASSOCIADAS A NÍVEIS TÓXICOS DE METAIS**

Florianópolis, 30 de Junho de 2008

BIANCA LUCCHESI TARGHETTA

**TOLERÂNCIA DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E PLANTAS
ASSOCIADAS A NÍVEIS TÓXICOS DE METAIS**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.
Orientadores: Prof.^a Dr.^a Vetúria Lopes de Oliveira e Prof. Dr. Márcio José Rossi.**

Florianópolis, 30 de Junho de 2008

TOLERÂNCIA DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E PLANTAS ASSOCIADAS A NÍVEIS TÓXICOS DE METAIS

BIANCA LUCCHESI TARGHETTA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Vetúria Lopes de Oliveira (Presidente)
Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFSC

Prof.^a Leyza Paloschi Oliveira (Membro Titular)

Dr. Eduardo Cargin Ferreira (Membro Titular)

Prof. Dr. Márcio José Rossi (Membro Suplente)

Florianópolis, 30 de Junho de 2008.

*“Menor que meu sonho não posso ser”
(Lindolf Bell)*

*Trabalho dedicado à memória de minha avó,
Aladir Maia Ribeiro Gomes.*

Agradecimentos

- Acima de tudo a Deus, por toda sua grandeza e seu amor.
- Aos meus pais, Patrícia e Lauro. Por todo o amor, atenção e sacrifícios a mim dedicados. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, mesmo quando foi difícil compreender meus motivos, meus sonhos, minhas ausências tão longas, minha distância. Obrigada por me aceitarem como sou e por fazerem de mim sempre uma pessoa melhor.
- À minha família, por todo o apoio e todo o amor, por aceitarem minha ausência nos momentos de reunião familiar.
- Aos meus irmãos, Lucas, Pedro, Nathália, Amanda e Igor. Pelos momentos divertidos, pelas conversas, pelo amor, por serem, simplesmente. Obrigada por fazerem minha vida tão mais feliz.
- À minha madrastra Mônica, pelo carinho e atenção.
- À minha orientadora, Prof.^a Vetúria, pelos dois anos de imenso aprendizado. Pela enorme paciência, dedicação, atenção, confiança e carinho. Pela oportunidade, e por me ensinar a ser uma microbiologista organizada, disciplinada e dedicada. Por ser exigente e ao mesmo tempo me dar liberdade para discutir e sugerir coisas novas ao trabalho realizado.
- Ao meu co-orientador, Prof. Márcio, pela atenção aos pequenos detalhes, sugestões e pelas conversas sempre tão agradáveis.
- Ao amigo Luiz Afonso, pela companhia e pela disposição em ajudar, sempre e muito, em todos os momentos deste trabalho e por aturar com paciência minhas reclamações.
- Aos amigos Pedro, Paulo, Gisela e Everton, por todos os momentos de cooperação, de descontração, de estresses e de trabalho que passamos juntos. Obrigada por fazerem do laboratório um lugar mais agradável e alegre. Sem vocês, não teria sido tão bom.
- Aos colegas Luciano, Marina, Carla, Aline e Gabriel, pela companhia e pela colaboração.
- Aos meus incríveis companheiros do Quarteto Fantástico e o Surfista Prateado: Fabiana, Elis, Ricardo, Kauê, e Ronan, nosso agregado. Obrigada por todos os momentos divertidos, as conversas, os abraços, o apoio. Obrigada por me permitirem seguir adiante. Ric, obrigada pela companhia no MSN nas madrugadas de estudo e de trabalho, obrigada pelas risadas escancaradas nos corredores do MIP.
- Aos meus amigos biológicos tão preciosos: Marília, Jacó, Paulo, Thalita, Anajara, Bruno, Eliana, Rebeca, Mariana e Ezequiel.
- Aos meus monitorados, sempre alegres e divertidos.
- Aos meus irmãozinhos, Gabriela e George. Obrigada por todas as bizarrices, conversas, brigas, cervejas, dancinhas e tosquices compartilhadas. Vocês são muito especiais.
- Aos amigos não-biológicos, que tanto engrandeceram minha vida: Rafaela, Livia, Luise, Fernanda, Madoka, Damian, Isabela e todos os outros que passaram por mim, deixando um pedacinho de si.
- À amiga Suellen, por ser tão presente, mesmo ausente. Por ser companheira, compreensiva e por todas as conversas esclarecedoras.
- Aos meus colegas formandos, pela companhia nesse momento final.
- Aos professores que foram muito além de sua disciplina e da sala de aula: Prof.^a Margherita, Prof. Aguinaldo, Prof. Paulo Hofmann, Prof. Paulo Simões-Lopes, Prof. Kay, Prof. Danilo e Prof. Sheila. Obrigada por me ensinarem a pensar além, e ser muito mais do que uma reprodutora de idéias.

- Às amigas de sempre, Danielle e Bruna, por toda a grandeza de seu amor, de sua amizade. Pela compreensão (não sem reclamações) da minha ausência, do meu sumiço. Por me aturarem nos momentos felizes demais e tristes demais. Obrigada pela companhia, pela confiança, pelo apoio, pelos puxões de orelha. Vocês dão mais sentido à minha vida.
- Aos amigos presentes-ausentes: Marina, Natália, Luana, Fabiano e Bianca.
- Às amigas Gisele e Viviane, por serem tão graciosas, tão gentis e amigas. Por se preocuparem e estarem presentes mesmo distantes. Gi, obrigada pelas conversas, passeios, risadas, idéias mirabolantes, pela torcida, pelo ocupado nunca ocupado. Obrigada por ser minha tulipa amarela.
- Ao amigo Santana, que foi capaz de mostrar além do aqui e agora de maneira inteligente, sempre com palavras sábias.
- Ao recém amigo Michel, pela agradável companhia no MSN nas últimas semanas e por me permitir lembrar que o mundo é pequeno, dá muitas voltas e que todos nós merecemos uma segunda chance.
- Aos integrantes do meu Universo Paralelo e seus agregados: Adriano, Amanda, Amanda Bia, Ana, Ana Bia, Bruno, Cacau, Cadu, Carlos, Carol, Caroll, Ciba, Deise Fê, Elisa, Érika, Fábio, Flávia, Flávio, Flora, Gabi, Guzz, Isabela, Julinha, Ju, Kika, Kiko, Lari, Leandro, Luci, Lynha, Mariana, Rafa, Renata, Renata IDB, Robs, Tani, Tati, Thaís, Thiago, Tici, Victor, Wagner, Werden, Wilson, Ygor e aos nossos pequenos Arthur e Valentina. Obrigada por fazerem os meus dias muito mais alegres e divertidos, por tamanha riqueza em sotaques, lugares, pensamentos, idéias, sugestões e broncas. Obrigada por me ensinarem a quebrar barreiras, a amar as diferenças. Obrigada por tanto amor, por tanta apaezice e alegrias bozolinhas. Com vocês eu vou (literalmente) mais longe. O mundo é melhor com vocês ao meu lado. Amo muito!!!
- Um agradecimento especial àquelas que nos últimos meses me aturaram falando mais de mim do que escutando: Caroll, Cacau, Julinha, Tici e Gi. Vocês valem ouro.
- Wagner, você não merece, mas apesar de ser o amigo mais corno, chato, egoísta, bebum, reclamão, mal-agradecido, teimoso, velho e rabugento de todos, mora no meu coração. Obrigada por tudo, sempre.
- Obrigada a todos os outros que não foram citados, mas que passaram pela minha vida e me cativaram.
- A todos vocês, meu amor. *“Porque a amizade é um amor que nunca morre” (Mário Quintana).*

“(...) E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências. A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida. É delicioso que eu saiba e sinta que os adoro, embora não declare e não os procure. (...) Se alguma coisa me consome e me envelhece é que a roda furiosa da vida não me permite ter sempre ao meu lado, morando comigo, andando comigo, falando comigo, vivendo comigo, todos os meus amigos (...)

A gente não faz amigos, reconhece-os.”

(Vinicius de Moraes)

Sumário

Lista de Quadros e Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Obtenção e manutenção dos isolados de fungos ectomicorrízicos.....	17
3.2. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido contendo diferentes concentrações de metais.....	17
3.3. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações de metais.....	18
3.4. Crescimento de plantas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em substrato contendo diferentes concentrações de metais, sob condições de casa de vegetação.....	19
3.5. Efeito da associação simbiótica entre plantas de <i>Eucalyptus dunnii</i> e fungos ectomicorrízicos selecionados, na sobrevivência e crescimento das plantas em substrato contaminado com metais, sob condições de casa de vegetação.....	21
4. Resultados e Discussão.....	23
4.1. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido contendo diferentes concentrações de metais.....	23
4.2. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações de metais.....	26
4.3. Crescimento de plantas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em substrato contendo diferentes concentrações de metais, sob condições de casa de vegetação.....	32
4.4. Efeito da associação simbiótica entre plantas de <i>Eucalyptus dunnii</i> e fungos ectomicorrízicos selecionados, na sobrevivência e crescimento das plantas em substrato contaminado com metais, sob condições de casa de vegetação.....	34
5. Considerações Finais.....	46
Referências Bibliográficas.....	47

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1	Lista dos isolados fúngicos ectomicorrízicos com seus respectivos hospedeiros e procedência.....	17
Tabela 1	Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de alumínio.....	23
Tabela 2	Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de cádmio.....	24
Tabela 3	Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de cromo.....	25
Tabela 4	Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de manganês.....	25
Tabela 5	Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de alumínio.....	27
Tabela 6	Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de cádmio.....	28
Tabela 7	Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de cromo.....	28
Tabela 8	Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de manganês.....	29

Lista de Figuras

Figura 1	Visão geral das plantas no início do período experimental em casa de vegetação.....	20
Figura 2	Aspecto da unidade de colonização de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> in vitro.....	22
Figura 3	Visão geral dos experimentos em meio sólido contendo diferentes doses de Cd (a) e Mn (b).....	24
Figura 4	Aspecto do crescimento do isolado UFSC-Pt116 em meio líquido com doses crescentes de Cd. Observar a intensa coloração presente.....	30
Figura 5	Aspecto do crescimento do isolado UFSC-Ch163 crescendo em meio líquido com doses crescentes de Cd.....	30
Figura 6	Peso seco total de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em substrato contendo diferentes doses de metal, sob condições de casa de vegetação.....	32
Figura 7	Altura de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em substrato contendo diferentes doses de metal, sob condições de casa de vegetação.....	33
Figura 8	Plantas com sintomas de deficiência nutricional. Clorose e manchas avermelhadas (a), manchas secas (b).....	34
Figura 9	Peso seco total de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de alumínio, sob condições de casa de vegetação.....	36
Figura 10	Altura de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de alumínio, sob condições de casa de vegetação.....	36
Figura 11	Peso seco total de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cádmio, sob condições de casa de vegetação.....	37
Figura 12	Altura de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cádmio, sob condições de casa de vegetação.....	37
Figura 13	Peso seco total de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cromo, sob condições de casa de vegetação.....	39
Figura 14	Altura de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cromo, sob condições de casa de vegetação.....	39
Figura 15	Peso seco total de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de manganês, sob condições de casa de vegetação.....	40
Figura 16	Altura de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> , inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de manganês, sob condições de casa de vegetação.....	40

Resumo

As ectomicorrizas são associações entre raízes de plantas e fungos, que surgiram há milhões de anos. Elas são um importante fator para a sobrevivência e crescimento das plantas, pois aumenta o aporte nutricional para o hospedeiro e protege contra patógenos. Os fungos ectomicorrízicos são capazes de quelar íons de metais tóxicos, retirando-os do solo e diminuindo os danos ao hospedeiro. Quatro isolados de fungos ectomicorrízicos de *Eucalyptus dunnii* foram selecionados para a realização desse trabalho: *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc68), *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116), *Chondrogaster angustisporus* (UFSC-Ch163) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188). Os isolados foram testados quanto à sua tolerância ao alumínio (Al), cádmio (Cd), cromo (Cr) e manganês (Mn), adicionados individualmente ao meio de cultura MNM em sua forma sólida e líquida. Mudanças de *E. dunnii* foram testadas quanto à sua tolerância a esses mesmos metais, em dois diferentes experimentos: em ausência dos fungos e em associados a eles. Ambos os experimentos foram conduzidos sob condições de casa de vegetação. Os metais mais tóxicos, tanto para os isolados quanto para as plantas, foram o Cd e o Cr. No experimento em meio sólido nenhum isolado foi capaz de crescer nas duas doses mais altas de Cd e Cr (1000 e 10000 mg.L⁻¹). O crescimento foi mais expressivo em todas as doses dos tratamentos com Al e Mn. No experimento em meio líquido, o Cd e o Cr inibiram o crescimento dos isolados já na dose de 1 mg.L⁻¹. Em ambos os experimentos, os isolados UFSC-Pt116 e -Ch163 foram aqueles que apresentaram maior crescimento nas doses testadas. Também foi observada a produção de pigmentos pelos isolados UFSC-Sc68, -Pt116 e -Pt188. No experimento com plantas não inoculadas, o metal mais tóxico foi o Cr. Nenhuma planta foi capaz de crescer nas duas doses mais altas desse metal (1000 e 10000 mg.kg⁻¹). Para os outros metais, a matéria seca diminuiu com o aumento da dose. Para o tratamento com plantas inoculadas, o Cd foi o metal mais tóxico, que reduziu de maneira significativa a sobrevivência e o crescimento das plantas. Os isolados UFSC-Pt188 e -Ch163 foram os mais eficientes na proteção contra os metais, melhorando a sobrevivência e a produção de matéria seca das plantas. O isolado UFSC-Ch163 foi o mais eficiente na tolerância aos metais, *in vitro* e também em associação com plantas de *E. dunnii*, indicando bom potencial para utilização em solos contaminados. Para os isolados UFSC-Pt116 e -Pt188 a tolerância *in vitro* pode ser parcialmente explicada pela produção de pigmentos, que tem importante papel na imobilização de íons. Para o isolado UFSC-Ch163, não foi detectada a produção de pigmentos, indicando que outro mecanismo, de origem intracelular, pode estar envolvido.

Palavras-chave: ectomicorrizas, metais pesados, tolerância, *Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus*.

Abstract

Ectomycorrhizas are associations between plant roots and fungi, which have arisen millions of years ago. They are an important factor for plant survival and growth since they increase nutrient uptake and protect plants against pathogens. Ectomycorrhizal fungi are able to chelate toxic metals ions, removing them from the soil and reducing damages to the host. Four isolates of ectomycorrhizal fungi from *Eucalyptus dunnii* were selected for use in this study: *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc68), *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116), *Chondrogaster angustisporus* (UFSC-Ch163) and *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188). The isolates were evaluated for their resistance to aluminium (Al), cadmium (Cd), chromium (Cr) and manganese (Mn), both on solid and liquid MNM medium. Seedlings of *E. dunnii* were evaluated in terms of their response to the same metals, in two different experiments: in absence of the fungi, and when associated to them. Both experiments were conducted under greenhouse conditions. The most toxic metals, both for fungal isolates and plants, were Cd and Cr. In the experiment with solid medium no isolate was able to grow in the two highest concentrations of Cd and Cr (1000 and 10000 mg.L⁻¹). Growth was more significant in all concentrations of Al and Mn. In the experiment with liquid MNM, Cd and Cr inhibited the growth of isolates when added at 1 mg.L⁻¹. In both experiments, isolates UFSC-Pt116 and –Ch163 were those presenting more intensive growth in the concentrations tested. Also it was observed the production of pigments by the isolates UFSC-Sc68, -Pt116 and -Pt188. In the experiment with non-inoculated seedlings, Cr was the most toxic metal. No seedling grew when submitted to the highest concentrations of this metal (1000 and 10000 mg.kg⁻¹). For the other metals seedlings dry matter decreased as the concentration increased. In the experiment with inoculated seedlings, Cd was the most toxic metal, having significantly decreased survival and growth of plants. The isolates UFSC-Pt188 and –Ch163 were the most efficient in protecting against metals, improving the survival and the production of dry matter by the plants. The isolate UFSC-Ch163 was the most efficient in terms of tolerance *in vitro* as well as in association with *E. dunnii* seedlings, indicating a good potential for utilization in contaminated soil. Although for isolates UFSC-Pt116 and –Pt188 the *in vitro* tolerance to metals could be partially explained by the production of pigments, which have an important role in ion immobilization, for isolate UFSC-Ch163, pigments were not detected, indicating that another mechanism, of intracellular origin, could be involved.

Keywords: ectomycorrhizas, heavy metals, tolerance, *Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus*.

Lista de Abreviaturas

®	marca registrada
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	micrograma(s) por mililitro
μM	micromolar
$\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$	micromol(s) por segundo por metro quadrado
°C	grau(s) Celsius
Al	alumínio
BOD	demanda bioquímica de oxigênio
Ca	cálcio
Cd	cádmio
cf.	conforme
cm	centímetro(s)
CO ₂	gás carbônico
Cr	cromo
Cu	cobre
Fe	ferro
fECM	fungo(s) ectomicorrízico(s)
g	grama(s)
g.planta ⁻¹	grama(s) por planta
Hg	mercúrio
K	potássio
L	litro(s)
LSD	least significant difference
mg.kg^{-1}	miligrama(s) por quilograma
mg.L^{-1}	miligrama(s) por litro
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
MNM	meio Melin-Norkrans modificado
Mn	manganês
$p \leq$	probabilidade menor ou igual
P	fósforo
Pb	chumbo
pH	potencial hidrogeniônico
PVC	policloreto de vinila
S	enxofre
s	segundo(s)
V/V	volume/volume
Zn	zinco

1. Introdução

As micorrizas são associações entre raízes de plantas e fungos, que surgiram há milhões de anos. Elas são de grande importância para o crescimento dos vegetais que participam da simbiose. As micorrizas podem ser classificadas em diferentes categorias, dependendo da planta, do fungo e da característica da simbiose (SMITH & READ, 1997).

As ectomicorrizas constituem uma dessas associações benéficas e são de grande importância econômica, notadamente para o setor silvicultural. Nesse tipo de simbiose, estão envolvidas plantas Angiospermas e Gimnospermas e fungos dos Filos Basidiomycota (principalmente) e Ascomycota (ALEXOPOULOS et al., 1996). Estima-se que as ectomicorrizas sejam encontradas em cerca de 2000 espécies de plantas com a participação de mais de 5000 espécies de fungos. Em grande parte dos casos, uma única espécie de planta pode se associar a um grande número de micobiontes, ou uma única espécie de fungo pode se associar a um grande número de fitobiontes. Existem, porém, casos em que essa união é espécie-específica (KENDRICK, 2000).

As ectomicorrizas são encontradas principalmente em florestas de regiões temperadas, tendo papel decisivo no sucesso do crescimento do vegetal (SMITH & READ, 1997). No caso de espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, muito usadas nas indústrias de papel e celulose e de móveis, a interação é de importância econômica e ambiental, pois aumenta a produtividade e reduz os gastos com adubação.

A interação é caracterizada pela formação de um manto de hifas ao redor das raízes que, a partir desse ponto, penetram o tecido radicular sem, contudo, haver invasão das células vegetais. A estrutura externa é chamada manto fúngico e a estrutura interna ao tecido é conhecida como rede de Hartig (SMITH & READ, 1997; PETERSON et al., 2004). Esta região permite um íntimo contato entre as células dos dois organismos. A partir do manto, as hifas projetam-se externamente para o solo, espalhando-se e aumentando a área de contato entre raiz e solo. O aumento da superfície de contato permite que maior quantidade de nutrientes (como fósforo, nitrogênio e elementos-traço) e água sejam retirados do solo, incrementando seu aporte tanto para o fungo como para a planta.

Os fungos ectomicorrízicos produzem substâncias capazes de inibir o crescimento de agentes patogênicos, como bactérias e outros fungos, e protegem a planta contra doenças. Além disso, também são capazes de produzir substâncias que beneficiam a planta e auxiliam seu crescimento, como hormônios de crescimento vegetal, que estimulam o crescimento e ramificação das raízes. São capazes de armazenar metabólitos e nutrientes e assim, funcionam como sistema de reserva para situações de escassez nutricional ou crescimento ativo de ambos (SMITH & READ, 1997; KENDRICK, 2000).

Os fungos ectomicorrízicos são, ainda, capazes de quelar íons de metais no interior de suas células ou em exsudatos, retirando-os do solo e impedindo que sejam absorvidos pelas raízes dos vegetais. Dessa maneira, a associação do tipo ectomicorrízica traz benefícios à planta, pois evita sua contaminação com esses metais e melhora o aporte de nutrientes ao mesmo tempo em que biorremedia o solo. Já foi demonstrado (TURNAU, 1991) que os fungos são capazes de acumular altas concentrações de metais em seus corpos de frutificação, embora essa habilidade difira entre as espécies. Colpaert & Van Assche (1987), Gadd (1993) e Blaudez et al. (2000) também comprovaram o acúmulo de metais em tecidos fúngicos, tanto na parede celular, quanto em compartimentos internalizados e mucos.

A poluição do solo por níveis tóxicos de metais pode ocorrer naturalmente ou ser derivada da atividade humana, em processos das indústrias, de mineração e agricultura (MULLER et al., 2004) e, em geral, traz sérios problemas aos ecossistemas. Os metais, quando presentes sob a forma de íons solúveis no solo são absorvidos pelas plantas e inibem o crescimento das raízes, diminuem a integridade das membranas biológicas e alteram o funcionamento normal das enzimas (KRUPA & KOZDRÓJ, 2004). Com isso, as árvores não conseguem se desenvolver normalmente e a produção de madeira fica prejudicada.

Os efeitos tóxicos dos metais incluem o bloqueio de moléculas de grande importância biológica, como enzimas e transportadores, o deslocamento ou substituição de nutrientes essenciais das biomoléculas e unidades funcionais, mudança conformacional, desnaturação de proteínas e quebra da integridade de membranas e organelas celulares.

A presença de alumínio acidifica o solo e, assim, restringe o crescimento das plantas. O alumínio se encontra sob forma mineral, freqüentemente insolúvel, e sua liberação acarreta diminuição do pH do solo, que influi sobre a solubilidade dos íons necessários ao desenvolvimento normal dos vegetais. Acredita-se que em países desenvolvidos, a incidência de chuva ácida acelere o processo de quebra dos minerais ricos em alumínio e a lixiviação dos cátions, empobrecendo o solo (MOYER-HENRY et al., 2005). Já o cádmio é um elemento não-essencial e é altamente tóxico, mesmo em pequenas concentrações. Sua presença é característica de áreas contaminadas com resíduos de mineração e de indústrias. O cromo é utilizado nas etapas de curtimento do couro pela indústria e seu descarte contamina solos e cursos d'água. Da mesma maneira que o cádmio, o cromo é tóxico em pequenas quantidades (BLAUDEZ et al., 2000).

O Estado de Santa Catarina apresenta uma importante atividade de mineração de carvão, gerando áreas de solo contaminadas com manganês e com baixos valores de pH. Sua recuperação passa pela revegetação com plantas capazes de tolerar as condições

adversas. A associação ectomicorrízica poderia ajudar a sobrevivência das plantas nessas áreas e contribuir para sua recuperação.

Além da mineração do carvão, a indústria do couro é muito forte no oeste do Estado e a contaminação do solo e dos mananciais por cromo é muito comum. Esse processo interfere diretamente no equilíbrio do ecossistema e na utilização desses recursos para fins econômicos e/ou sociais.

Portanto, o estudo que será descrito nesse trabalho é de grande importância ambiental e econômica, pois busca trazer novas informações aos atuais conhecimentos na área.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Selecionar isolados fúngicos ectomicorrízicos com potencial para proteger as plantas em solos contaminados com níveis tóxicos de metais, contribuindo, assim, para a biorremediação dos solos e o aproveitamento de áreas contaminadas.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o crescimento de isolados de fungos ectomicorrízicos aos metais alumínio, cádmio, cromo e manganês, em meio de cultura sólido e líquido contendo doses crescentes desses metais;
2. Estabelecer as doses dos metais que afetam o crescimento das plantas de *Eucalyptus dunnii*, a espécie de *Eucalyptus* mais plantada em Santa Catarina;
3. Avaliar o crescimento de plantas de *E. dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos, em presença de diferentes concentrações de metais no substrato de plantio.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção e manutenção dos isolados de fungos ectomicorrízicos:

As culturas dos isolados fúngicos ectomicorrízicos (fECM) foram obtidas junto à coleção de culturas de fungos ectomicorrízicos do Laboratório de Ectomicorrizas da UFSC. Esses isolados são provenientes de plantações de *Eucalyptus* spp. (Quadro 1).

Quadro 1. Isolados fúngicos ectomicorrízicos com seus respectivos hospedeiros e procedência.

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Procedência
UFSC-Sc68	<i>Scleroderma</i> sp.	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Três Barras-SC
UFSC-Sc92	<i>Scleroderma bougheri</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Três Barras-SC
UFSC-Pt116	<i>Pisolithus microcarpus</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Três Barras-SC
UFSC-Ch163	<i>Chondrogaster angustisporus</i>	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Correia Pinto-SC
UFSC-Pt188	<i>Pisolithus microcarpus</i>	<i>Eucalyptus</i> spp.	Lavras-MG

Esses fungos foram selecionados para este trabalho com base em sua eficiência na promoção do crescimento de *E. dunnii* em estudo conduzido por Souza et al. (2004, 2008).

Os fungos foram repicados a partir de culturas da coleção para o meio sólido Melin-Norkrans modificado (MNM) (MARX, 1969), em placas de Petri, e foram mantidos em incubadora BOD a 25 ± 1 °C, com repicagens periódicas para meio de mesma composição a cada 20-30 dias, durante o período da realização dos experimentos.

3.2. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido contendo diferentes concentrações de metais

Para avaliar a tolerância dos isolados fECM a metais, foram empregados o alumínio, na forma de hidróxido de alumínio; o manganês, na forma de sulfato de manganês; o cádmio, na forma de sulfato de cádmio; e o cromo, na forma de cromato de potássio. As concentrações testadas foram 0, 1, 10, 100 e 1000 mg.L⁻¹, com exceção do manganês, para o qual foram utilizadas as concentrações de 0, 1, 10, 100 e 200 mg.L⁻¹ e do cádmio, para o qual foram utilizadas as concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000 e 10000 mg.L⁻¹. O sulfato de manganês não solubilizou quando empregado em concentração acima de 200 mg.L⁻¹.

Inicialmente, preparou-se uma solução com a concentração máxima desejada do metal e, a partir dessa solução, prepararam-se diluições para obter as menores concentrações.

Culturas matrizes de cada isolado fúngico foram feitas e mantidas a 25 ± 1 °C, sem luminosidade, por cerca de 30 dias, até as colônias atingirem cerca de 3 cm de diâmetro. Dessas colônias, discos de 6 mm de diâmetro foram feitos assepticamente com o auxílio de um cortador previamente esterilizado. Para testar a viabilidade do micélio, os discos foram colocados em meio de cultura MNM sólido e mantidos, durante 2-3 dias, em incubadora BOD, à temperatura de 25 ± 1 °C, antes de ser empregados no estudo.

O meio de cultura utilizado foi o meio MNM, ao qual foram adicionadas as soluções dos diferentes metais de modo a obter as concentrações desejadas, antes da esterilização.

O meio de cultura foi distribuído em tubos (20 mL/tubo) e esterilizado em autoclave (121 °C durante 20 min.). Logo após, o conteúdo de cada tubo foi transferido para uma placa de Petri, previamente esterilizada.

Após a solidificação e resfriamento do meio, colocou-se um disco contendo micélio viável no centro de cada placa. Foram feitas três repetições (placas) para cada combinação fungo-concentração do metal. As culturas foram mantidas em incubadora BOD a 25 ± 1 °C, na obscuridade, durante 30 dias. Durante esse período, observaram-se, a cada 2-3 dias o crescimento, a aparência das colônias e do meio de cultura e, ao final do período, mediu-se o diâmetro da colônia.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de LSD ($p\leq 0,05$) utilizando-se o programa STATGRAPHICS®.

3.3. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações de metais

Os metais utilizados foram os mesmos do experimento anterior em meio sólido. No caso do alumínio, por questões de solubilidade, foi utilizado o cloreto de alumínio, ao invés do hidróxido de alumínio. Para todos os metais, as concentrações testadas foram de 0, 1, 10 e 100 mg.L⁻¹.

As soluções-estoque e as culturas matrizes foram preparadas seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para o experimento anterior (item 3.2). O meio de cultura líquido foi o MNM, com adição da solução do metal na concentração correspondente durante o preparo. As unidades experimentais constaram de um volume de 100 mL de meio em frasco erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Após o preparo e distribuição nos frascos, os meios de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave nas mesmas condições de temperatura e pressão descritas anteriormente (item 3.2).

Em cada frasco, foi colocado um disco de meio com micélio previamente testado quanto à viabilidade do fungo e à ausência de contaminações, com três repetições para cada combinação fungo-dose de metal, num total de 48 frascos. Nesse momento, 10 discos de cada isolado foram retirados, colocados sobre pedaços de papel de filtro de peso conhecido, e secados em estufa a 75 °C, para determinação da biomassa seca inicial. As culturas foram mantidas em incubação a 25±1 °C em incubadora BOD, na obscuridade, durante 30 dias. No decorrer desse período, foram observados o crescimento, a aparência do micélio e do meio de cultura e, ao final, a biomassa fúngica foi separada do meio, seca em estufa a 75 °C, até peso constante, para determinação da biomassa seca em cada tratamento, diminuindo-se desse valor, o valor da biomassa seca inicial relativa ao peso dos discos de inoculação.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa STATGRAPHICS®.

3.4. Crescimento de plantas de *Eucalyptus dunnii* em substrato contendo diferentes concentrações de metais, sob condições de casa de vegetação

Para este estudo foram empregados os mesmos metais utilizados nos experimentos *in vitro* e para cada metal, foram testadas as concentrações 0, 1, 10, 100, 1000 e 10000 mg.kg⁻¹ de substrato.

Foram utilizadas sementes de *E. dunnii* provenientes da empresa RIGESA, Três Barras, SC. O substrato para crescimento das plantas foi constituído de uma mistura de turfa e vermiculita, na proporção de 1:3 (V/V).

O substrato foi preparado misturando-se a turfa e a vermiculita na proporção definida em sacos de 1 L, submetendo-se, a seguir, a dois ciclos de autoclavagem (120 °C por 60 min) num intervalo de 24 h. Após esse processo, o substrato foi adubado com os macro e micronutrientes, de acordo com Souza et al. (2004), e com a solução do metal, de modo a atingir as diferentes concentrações. Após secagem, o substrato foi misturado vigorosamente a fim de distribuir uniformemente os adubos e o metal.

Esse substrato foi distribuído em recipientes cônicos de PVC, de 60 mL de capacidade, que foram empregados como recipiente de cultivo das mudas. Os recipientes tinham sido previamente desinfetados por imersão numa solução de hipoclorito de sódio 1%, durante cerca de 12 horas, e enxaguados várias vezes em água.

Cada um deles recebeu duas plântulas de *E. dunnii*, previamente germinadas numa solução esterilizada contendo ácido bórico (3 µM), glicose (2 g.L⁻¹) e sulfato de cálcio (500 µM), pH 5,7, sob agitação constante durante 2-3 dias, à temperatura ambiente. Antes da

solução de germinação, as sementes foram desinfectadas em álcool 70% por 30 s e lavadas em água destilada esterilizada três vezes consecutivas. Após germinação, foram lavadas com água destilada estéril e transferidas para o substrato de plantio.

Foram feitas três séries de cinco recipientes por dose de metal, mais três repetições da testemunha, num total de 195 recipientes. O substrato semeado foi, em seguida, irrigado com água destilada e, a partir de então, as regas foram feitas diariamente com água destilada. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante dois meses, com temperatura e umidade controladas (Figura 1).



Figura 1. Visão geral das plantas no início do período experimental em casa de vegetação.

Durante o experimento, foram monitorados o crescimento e a aparência da parte aérea das plantas (coloração das folhas) e, ao término do período experimental, foi feita a avaliação da altura e da matéria seca.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa STATGRAPHICS®.

As doses de metais 10, 100 e 1000 mg.kg⁻¹ que promoveram efeitos nocivos nas plantas, como redução do crescimento, mudanças na coloração das folhas e outros sintomas que apontaram toxicidade, foram testadas no estudo seguinte, onde se verificou a capacidade dos isolados fECM selecionados de contribuir para a resistência das plantas a esses níveis de metais. A dose de 10000 mg.kg⁻¹ foi considerada muito tóxica para as plantas e não foi utilizada no próximo estudo.

3.5. Efeito da associação simbiótica entre plantas de *Eucalyptus dunnii* e fungos ectomicorrízicos selecionados, na sobrevivência e crescimento das plantas em substrato contaminado com metais, sob condições de casa de vegetação

A preparação deste experimento seguiu os mesmos procedimentos descritos para o experimento anterior (item 3.4), exceto no que diz respeito à germinação das sementes e à inoculação dos fungos ectomicorrízicos para a associação simbiótica.

A micorrização foi realizada *in vitro* em frascos de conserva contendo 50 mL de meio MNM semi-sólido (5% de ágar), onde foram inoculados 2-3 discos de micélio (Figura 2), previamente testados quanto à viabilidade e mantidos em incubação a 25 ± 1 °C em incubadora BOD, na obscuridade durante 15 dias.

As sementes tiveram sua superfície desinfetada em etanol 70% por 30 s, seguida de lavagem em água destilada estéril. Em seguida, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (1%) durante 20 min e lavadas 3 vezes em água destilada estéril sob condições assépticas de capela de fluxo laminar. A germinação foi feita em meio de germinação sólido, contendo ácido bórico ($3 \mu\text{M}$), glicose (2 g.L^{-1}), sulfato de cálcio ($500 \mu\text{M}$), ágar (4 g.L^{-1}) e pH 5,7, mantendo-se por 7 dias na obscuridade.

Após esse período, as sementes germinadas foram transferidas para os frascos contendo o micélio fúngico, para colonização e mantidas por 1 mês em câmara de crescimento, com foto-período de 14 horas e intensidade luminosa variando de $28,53 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ a $36,83 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Foi necessária uma segunda etapa de germinação, uma vez que muitas das primeiras sementes germinadas não conseguiram crescer após serem transferidas para os frascos com os isolados fúngicos. A germinação foi feita em meio líquido com a mesma composição do meio anteriormente utilizado, exceto com relação à ausência de ágar-ágar, mantendo-se as sementes sob condições de capela de fluxo laminar por 3 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para os frascos com micélio fúngico para colonização.



Figura 2. Aspecto da unidade de colonização de mudas de *Eucalyptus dunnii* *in vitro*.

O substrato já preparado com as doses dos metais foi distribuído em recipientes cônicos de PVC de 60 mL, previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio 1%. Os recipientes foram distribuídos em bandejas de poliestireno e cada um recebeu 2 plântulas de *E. dunnii* colonizadas com fungos ectomicorrízicos, com as raízes colocadas a aproximadamente 1 cm de profundidade. O conteúdo dos recipientes foi, em seguida, irrigado com água destilada esterilizada. Após a inoculação e o plantio, as plantas foram mantidas durante dois meses em casa de vegetação e regadas diariamente com água destilada esterilizada. Após esse período, as plantas foram colhidas e analisadas quanto à altura, peso de matéria fresca e seca da parte aérea e raiz.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa STATGRAPHICS®.

4. Resultados e Discussão

4.1. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido contendo diferentes concentrações de metais

Os metais que mais afetaram o crescimento dos fungos foram o Cd e o Cr. O Cd apresentou efeito inibitório para a maioria dos fungos já na dose de 10 mg.L⁻¹, enquanto o Cr inibiu fortemente o crescimento fúngico a 100 mg.L⁻¹. Nenhum dos isolados foi capaz de crescer nas duas doses mais altas de Cd, 1000 mg.L⁻¹ e 10000 mg.L⁻¹. Nas doses mais altas de Al e Mn (1000 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹, respectivamente), houve crescimento dos isolados, mesmo com uma tendência a redução em relação às menores doses (Tabelas 1 a 4).

Tabela 1. Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de alumínio (Al)*

Isolado	Concentração de Al (mg.L ⁻¹)					Média
	0	1	10	100	1000	
UFSC-Pt116	6,4	7,0	6,367	7,033	7,533	6,867 a
UFSC-Ch163	6,667	7,2	7,233	7,533	5,7	6,867 a
UFSC-Pt188	8,0	7,933	8,066	6,533	5,6	7,227 a
Média	7,022 A	7,378 A	7,222 A	7,033 A	6,278 A	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

O isolado UFSC-Pt116 apresentou maior diâmetro de colônia na dose mais alta de Al, enquanto os isolados UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188 apresentaram diminuição do crescimento com o aumento da dose do metal, atingindo um diâmetro semelhante. Para o isolado UFSC-Ch163, o crescimento aumentou com o aumento da concentração do metal até 100 mg.L⁻¹, quando atingiu seu maior diâmetro. A partir dessa dose, o crescimento desse fungo se reduziu (Tabela 1). Na média geral, os isolados não diferiram entre si.

No tratamento com Cd (Tabela 2), a média geral de crescimento reduziu-se significativamente com o aumento da dose, passando de 3,04 cm, na dose 0 para 0,6 cm nas doses de 100 a 10000 mg.L⁻¹. Os isolados UFSC-Pt188 e UFSC-Sc68 apresentaram ligeiro aumento no diâmetro na dose de 1 mg.L⁻¹ em relação ao tratamento sem metal, seguido de queda na dose de 10 mg.L⁻¹. Os isolados UFSC-Sc92, UFSC-Pt116 e UFSC-Ch163 tiveram o crescimento reduzido já em 1 mg.L⁻¹, embora a queda tenha sido menos acentuada para o UFSC-Sc92. O Cd foi bastante tóxico para o isolado UFSC-Ch163, que não cresceu em nenhuma das placas nas doses acima de 1 mg.L⁻¹. Na dose de 100 mg.L⁻¹

os isolados que foram capazes de crescer tiveram crescimento bastante semelhante (Figura 3a). Quando comparados entre si, os isolados apresentaram diferenças significativas, com destaque aos isolados de *Pisolithus microcarpus*, UFSC-Pt116 e -Pt188.

Tabela 2. Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de cádmio (Cd)*

Isolado	Concentração de Cd (mg.L ⁻¹)						Média
	0	1	10	100	1000	10000	
UFSC-Sc68	1,4	1,583	1,167	0,8	0,6	0,6	1,025 c
UFSC-Sc92	1,167	0,9	0,867	0,716	0,6	0,6	0,808 c
UFSC-Pt116	5,467	3,2	1,917	0,683	0,6	0,6	2,078 a
UFSC-Ch163	3,733	2,03	0,6	0,6	0,6	0,6	1,361 b
UFSC-Pt188	3,416	3,88	3,333	0,6	0,6	0,6	2,072 a
Média	3,037 A	2,32 B	1,577 C	0,68 D	0,6 D	0,6 D	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

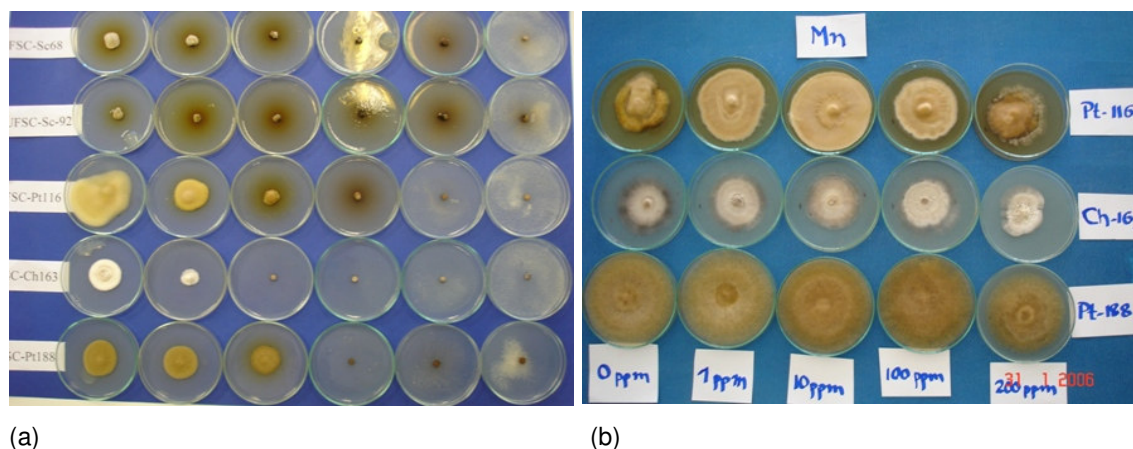


Figura 3. Visão geral dos experimentos em meio sólido contendo diferentes doses de Cd (a) e Mn (b).

Quando os fungos foram cultivados na presença de Cr (Tabela 3), seu crescimento foi reduzido a partir da dose 10 mg.L⁻¹. O único isolado que apresentou crescimento na maior dose (1000 mg.L⁻¹) foi o UFSC-Sc68, porém, o diâmetro foi menor nessa dose pois passou de 2,69 cm na dose 1 mg.L⁻¹ para 0,75 cm na dose 1000 mg.L⁻¹. Os isolados UFSC-Pt116, UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188 não diferiram entre si na dose de 10 mg.L⁻¹ e a redução em seu crescimento foi semelhante para a dose de 100 mg.L⁻¹. Dos quatro isolados, o UFSC-Pt188 foi aquele que apresentou maior tolerância ao cromo.

No tratamento com Mn (Tabela 4), o crescimento apresentou redução a partir de 10 mg.L⁻¹. Porém, os isolados UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188 apresentaram maior tolerância, pois

não houve diferença entre o tratamento sem Mn (dose 0) e o tratamento a 10 mg.L⁻¹, Porém, a partir de 10 mg.L⁻¹, o crescimento foi reduzido. O isolado UFSC-Ch163 apresentou comportamento instável e mostrou-se mais sensível ao metal quando comparado aos outros dois isolados (Figura 3b). Como no caso do experimento com cromo, o isolado mais tolerante foi o UFSC-Pt188.

Tabela 3. Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de cromo (Cr)*

Isolado	Concentração de Cr (mg.L ⁻¹)					Média
	0	1	10	100	1000	
UFSC-Sc68	3,03	2,69	2,1	0,933	0,75	1,9 c
UFSC-Pt116	5,3	4,8	4,967	0,633	0,6	3,26 b
UFSC-Ch163	4,7	4,63	4,833	0,75	0,6	3,10 b
UFSC-Pt188	5,9	5,88	4,983	0,667	0,4	3,57 a
Média	4,73 A	4,5 A	4,221 B	0,746 C	0,588 C	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Diâmetro miceliano (cm) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido, contendo doses crescentes de manganês (Mn)*

Isolado	Concentração de Mn (mg.L ⁻¹)					Média
	0	1	10	100	200	
UFSC-Pt116	6,4	6,97	7,1	6,6	6,13	6,640 b
UFSC-Ch163	6,67	5,63	6,93	5,83	3,1	5,633 c
UFSC-Pt188	8,0	8,33	7,87	7,2	6,43	7,567 a
Média	7,02 A	6,98 A	7,3 A	6,54 A	5,22 B	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

Tam (1995) testou a tolerância de isolados de fungos ectomicorrízicos, entre eles um isolado de *Scleroderma* sp. e um de *Pisolithus tinctorius*, em meio MNM sólido e verificou que ambos são tolerantes a altas concentrações de Al (200 µg.mL⁻¹). Porém, mostraram-se pouco tolerantes ao Cd mesmo em baixas concentrações (10 µg.mL⁻¹). Esse autor verificou, também, que na presença dos metais, o crescimento das hifas se tornava irregular, mais escasso e com pontas intumescidas, o que indica toxicidade dos metais utilizados.

Outros estudos, como os de Ray et al. (2005) e Colpaert & Van Assche (1992a), também em meio de cultura sólido, mostraram redução no crescimento radial dos isolados em presença de doses crescentes de metais. No primeiro estudo, onde foram usados dois isolados de *P. tinctorius* e três de *Scleroderma* (*S. cepa*, *S. flavidum* e *S. verrucosum*),

dentre outros, verificou-se que o crescimento dos isolados de *P. tinctorius* foi significativamente maior em doses elevadas de metais, enquanto o crescimento dos isolados de *Scleroderma* spp. foi mais escasso na presença dos metais. O estudo de Colpaert & Van Assche (1992a) incluiu um isolado de *S. citrinum*, que teve crescimento fortemente inibido pela concentração de 1 mg.L^{-1} de Cd, mostrando que essa é uma espécie bastante sensível à presença do metal em meio de cultura.

O diâmetro da colônia é um parâmetro de difícil comparação com a produção de matéria seca. Porém, apesar de não ser possível extrapolar com alto nível de confiança os dados da tolerância *in vitro* para situações *in vivo*, devido ao grande número de variáveis envolvidas, essa metodologia é bastante válida para a pesquisa básica. Parâmetros como morfologia de hifas, aparência do micélio, localização intracelular de metais, mecanismos de proteção e características do meio de cultura pós-experimento podem ser avaliados e ser utilizados para um melhor entendimento de processos que ocorrem nos outros níveis experimentais.

4.2. Crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações de metais

Como no caso do estudo anterior em meio sólido, os metais que mais afetaram o crescimento dos isolados fúngicos foram o Cd e o Cr. Porém, no presente estudo seu efeito já se fez sentir na concentração de 1 mg.L^{-1} . O Al e o Mn tiveram menor efeito tóxico. Não foram observadas grandes variações no crescimento dos fungos nas diferentes doses de Al. No caso do tratamento com Mn, houve variação no crescimento em função da dose (Tabelas 5 a 8).

Para o Al (Tabela 5), os isolados que se mostraram mais tolerantes e com maior produção de matéria seca foram o UFSC-Pt116 e o UFSC-Ch163. O primeiro apresentou uma queda na dose de 1 mg.L^{-1} , seguida de elevação na produção de matéria seca, atingindo maior peso na dose mais elevada. O segundo variou pouco, porém a menor matéria seca foi atingida na dose mais alta. O isolado UFSC-Sc68 teve diminuição na matéria seca quando o metal estava presente e sua variação foi pequena entre as diferentes doses. O isolado UFSC-Pt188 teve um aumento nas duas doses mais altas, porém seu crescimento foi escasso.

O isolado que produziu menos matéria seca em todos os tratamentos foi o UFSC-Pt188, que também mostrou pouca variação no crescimento. Essa parece ser uma característica inerente a este isolado e não parece estar relacionada somente à presença do metal no meio de cultura, já que o crescimento desse fungo também foi menor mesmo no tratamento sem metal.

Tabela 5. Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de alumínio (Al)*

Isolado	Concentração de Al (mg.L ⁻¹)				Média
	0	1	10	100	
UFSC-Sc68	0,081	0,017	0,015	0,020	0,033 b
UFSC-Pt116	0,193	0,111	0,142	0,201	0,162 a
UFSC-Ch163	0,194	0,174	0,190	0,170	0,182 a
UFSC-Pt188	0,017	0,018	0,046	0,029	0,028 b
Média	0,121 A	0,08 B	0,098 AB	0,105 AB	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

No tratamento com Cd (Tabela 6), o isolado UFSC-Pt116 se destacou como aquele de maior crescimento. Isso foi observado tanto no tratamento testemunha, sem metal, quanto na dose de 1 mg.L⁻¹. A matéria seca produzida foi muito superior àquela dos outros isolados. Porém, a 10 mg.L⁻¹, observou-se uma brusca queda de crescimento. A 100 mg.L⁻¹, o crescimento ainda diminuiu um pouco mais, porém sem grande diferença em relação à concentração anterior. Os isolados UFSC-Sc68, UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188 tiveram crescimento similar em todas as doses desse metal, com redução significativa já na menor dose (1 mg.L⁻¹), permanecendo estáveis em baixos níveis de crescimento até a dose mais alta. O crescimento dos isolados fúngicos nas doses de 10 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ foram muito próximos de zero, indicando pouca tolerância a doses mais altas desse metal, nas condições experimentais.

O isolado UFSC-Pt116 também se destacou no tratamento com Cr (Tabela 7), pois na média geral apresentou uma elevada produção de matéria seca, quando comparado aos demais fungos. Porém, sua superioridade se fez sentir até a dose de 1 mg.L⁻¹, pois na dose de 10 mg.L⁻¹, a matéria seca caiu a níveis muito baixos e manteve-se assim na dose mais alta (100 mg.L⁻¹). A matéria seca do isolado UFSC-Ch163 apresentou ligeiro aumento na dose de 1 mg.L⁻¹, quando comparada à do tratamento sem metal, mas na dose seguinte caiu acentuadamente. Os demais isolados cresceram pouco e já em 1 mg.L⁻¹ a produção de matéria seca foi bastante afetada.

Tabela 6. Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de cádmio (Cd)*

Isolado	Concentração de Cd (mg.L ⁻¹)				Média
	0	1	10	100	
UFSC-Sc68	0,102	0,01	0,007	0,014	0,033 b
UFSC-Pt116	0,279	0,218	0,027	0,012	0,134 a
UFSC-Ch163	0,077	0,008	0,006	0,010	0,025 b
UFSC-Pt188	0,052	0,015	0,008	0,010	0,021 b
Média	0,128 A	0,063 B	0,012 C	0,011 C	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de cromo (Cr)*

Isolado	Concentração de Cr (mg.L ⁻¹)				Média
	0	1	10	100	
UFSC-Sc68	0,064	0,026	0,014	0,017	0,030 bc
UFSC-Pt116	0,242	0,195	0,017	0,009	0,116 a
UFSC-Ch163	0,084	0,135	0,009	0,013	0,060 b
UFSC-Pt188	0,011	0,019	0,007	0,009	0,012 c
Média	0,100 A	0,093 A	0,011 B	0,012 B	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

Assim como para o Al, os isolados UFSC-Pt116 e UFSC-Ch163 foram os mais tolerantes em relação ao Mn (Tabela 8). Os isolados UFSC-Sc68 e UFSC-Pt188 apresentaram crescimento escasso e pouco variável entre as diferentes doses utilizadas. Houve um aumento na produção de matéria seca do isolado UFSC-Pt116 quando este foi cultivado na dose de 10 mg.L⁻¹ em relação ao tratamento com 1 mg.L⁻¹. Porém, na dose mais elevada (100 mg.L⁻¹), o crescimento tenha sido muito baixo. Situação oposta ocorreu com o isolado UFSC-Ch163, que manteve crescimento semelhante a 0 e 1 mg.L⁻¹, seguindo-se uma queda a 10 mg.L⁻¹ e voltando a aumentar sua matéria seca no meio com 100 mg.L⁻¹.

Tabela 8. Matéria seca miceliana (g) de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura líquido, contendo doses crescentes de manganês (Mn)*

Isolado	Concentração de Mn (mg.L ⁻¹)				Média
	0	1	10	100	
UFSC-Sc68	0,012	0,017	0,016	0,022	0,017 bc
UFSC-Pt116	0,12	0,058	0,171	0,015	0,091 a
UFSC-Ch163	0,049	0,054	0,009	0,124	0,060 ab
UFSC-Pt188	0,015	0,011	0,014	0,005	0,015 c
Média	0,049 A	0,035 A	0,053 A	0,042 A	

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste LSD ($p \leq 0,05$).

Neste experimento, observou-se uma intensa produção de pigmentos pelos isolados, de *Pisolithus microcarpus* e pelo isolado de *Scleroderma* sp. A intensidade da pigmentação tendeu a aumentar com o aumento da dose do metal. O isolado UFSC-Ch163, porém, não apresentou pigmentação detectável. A produção de pigmentos acontece normalmente quando esses isolados são mantidos em meio sólido na coleção do Laboratório de Ectomicorrizas, mas ela foi mais visível e intensa no meio líquido (Figuras 4 e 5).

Diversos estudos apontam para a utilização desses pigmentos fúngicos, principalmente melaninas, na imobilização de metais presentes no meio de cultura, indicando uma capacidade de tolerância a metais, mesmo antes do contato fungo-metal (GRAZZIOTTI et al., 2001a,b). Para o isolado UFSC-Pt116, esse fenômeno se confirmou, pois o fungo produziu grande quantidade de pigmentos e teve melhor crescimento que os outros isolados mesmo em doses elevadas de metais.

Conclusão semelhante não pode ser estabelecida para os outros fungos estudados, pois os isolados UFSC-Sc68 e UFSC-Pt188, que produziram intensa pigmentação, apresentaram crescimento reduzido, mesmo em presença de doses baixas dos metais. Além disso, o isolado UFSC-Ch163, que também se destacou na tolerância aos metais, não produziu pigmentos, o que indica a utilização de mecanismos outros que a imobilização por melaninas em sua tolerância aos metais.

Os resultados apontam para os isolados UFSC-Pt116 e UFSC-Ch163 como aqueles mais tolerantes aos metais testados. O isolado UFSC-Pt116, um *Pisolithus microcarpus*, mostrou-se particularmente interessante por seu desempenho superior na presença de Cd e de Cr. Fungos desse gênero são conhecidos por sua ampla distribuição geográfica e por sua notável adaptação a condições desfavoráveis de solo (MARX et al., 1992; MARTIN et al., 2002).

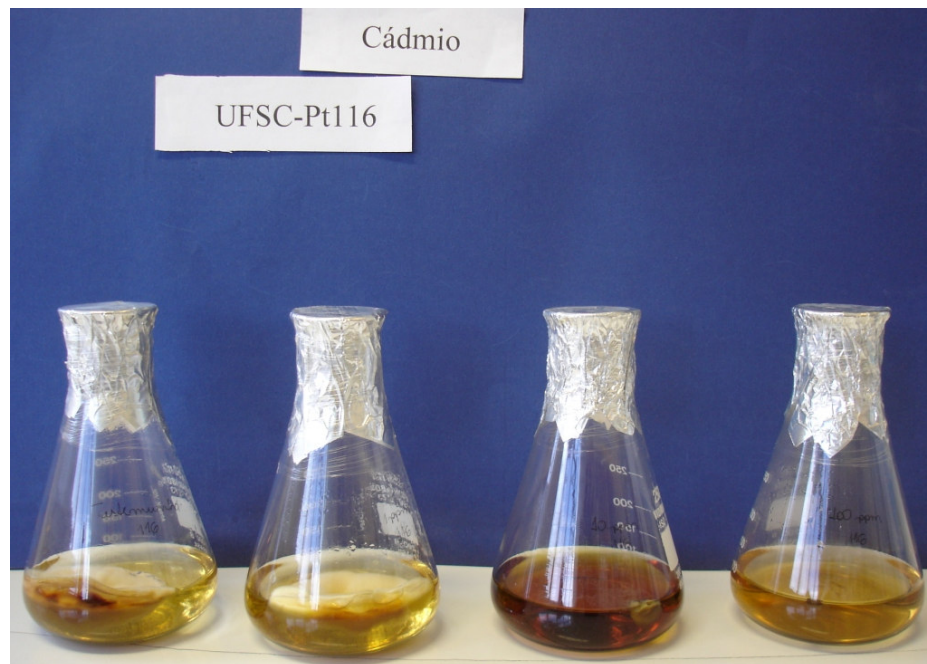


Figura 4. Aspecto do crescimento do isolado UFSC-Pt116 em meio líquido com doses crescentes de Cd. Observar a intensa coloração presente.

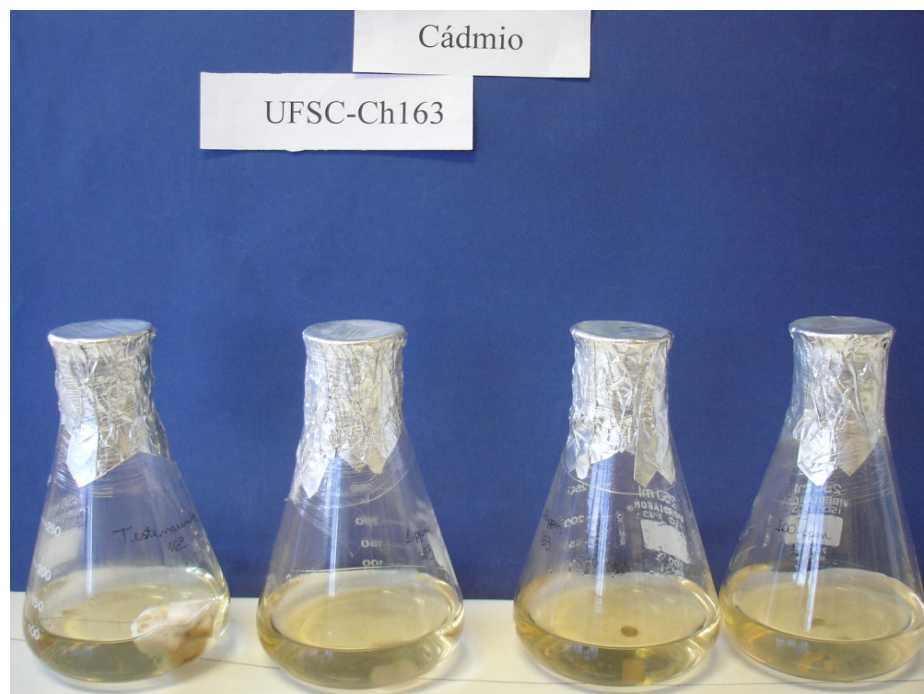


Figura 5. Aspecto do crescimento do isolado UFSC-Ch163 crescendo em meio líquido com doses crescentes de Cd.

Tam (1995) também verificou a capacidade de um isolado de *P. tinctorius* na tolerância a diferentes metais presentes em meio de cultura, dado que pode explicar sua ampla distribuição geográfica. O isolado UFSC-Ch163 pertence a uma nova espécie,

recentemente descrita por Giachini et al. (2000), a partir de corpos de frutificação coletados em Santa Catarina. Sendo uma nova espécie, há poucos relatos na literatura sobre sua distribuição. Sabe-se que foi encontrado no Brasil, Uruguai e Austrália (GIACHINI et al., 2000) e, mais recentemente, essa espécie foi observada na Espanha (ALVAREZ & CERCEDA, 2005). Menos ainda se conhece sobre sua eficiência na simbiose (SOUZA et al., 2004; 2008) ou frente a condições desfavoráveis de ambiente. Resta, portanto, averiguar se esse desempenho desses dois isolados se repete em presença das plantas hospedeiras, como será discutido no item 4.4.

No meio de cultura, quando na sua forma sólida, o fungo cresce em menores velocidades, pois os nutrientes estão de certa forma, imobilizados e sua difusão no meio é bastante lenta. Da mesma maneira que os nutrientes, o metal, quando adicionado, pode levar algum tempo para se difundir, à medida em que é absorvido pelas hifas. Isso faz com que a disponibilidade, tanto dos nutrientes, quanto do metal testado, seja menor nesse tipo de meio de cultura. Além disso, durante o preparo, antes da solidificação, pode ocorrer ligação entre o metal e íons adicionados ao meio, formando precipitados que também afetam a disponibilidade do metal.

O meio de cultura líquido, por sua vez, é mais dinâmico e sofre alterações freqüentes em seu balanço químico, seja pela retirada de nutrientes, seja pela secreção e/ou excreção de substâncias dos fungos. Com a adição de metais, é muito comum a formação de precipitados, pois esses se ligam a grupos fosfatos e sulfatos, formando complexos. O pH e a solução usada como tampão também interferem na disponibilidade do metal. Quando isso acontece, o metal se torna menos disponível para o fungo e sua concentração no meio diminui. Estimar exatamente quanto metal está disponível para o fungo é difícil, porém esses erros podem ser minimizados utilizando-se menores concentrações de íons no preparo do meio e também pela substituição por compostos menos reativos com metais.

Apesar disso, a área de contato do micélio fúngico com o meio líquido é maior do que a área de contato com o meio sólido. Freqüentemente, o disco de micélio afunda, fazendo com que as hifas cresçam submersas até que atinjam a superfície. Quando isso ocorre, maior quantidade de nutrientes e do metal pode ser absorvida. Isso pode permitir maior eficiência dos exsudatos liberados que, então, podem atuar na quelação dos compostos tóxicos.

Como já foi dito no item anterior (cf. item 4.1), é difícil extrapolar os resultados obtidos *in vitro* para as condições *in vivo*. Porém, é necessário que se saiba qual a relação individual de cada fungo com os metais para que os mecanismos sejam esclarecidos, principalmente na utilização do meio de cultura líquido. Parâmetros como pH, mecanismos de compartimentalização, caracterização de precipitados, absorbância e outros podem ser

analisados, esclarecendo de que forma os fungos são capazes de detoxificar o meio de cultura.

4.3. Crescimento de plantas de *Eucalyptus dunnii* em substrato contendo diferentes concentrações de metais, sob condições de casa de vegetação

Neste estudo observou-se que o Cr foi o metal que mais afetou o crescimento e a produção de matéria seca das plantas. Nenhuma planta foi capaz de crescer na dose de 1000 mg.kg⁻¹. Na presença dos outros metais, o crescimento só foi inibido a 10000 mg.kg⁻¹. Na dose mais alta de Mn, apenas uma planta foi capaz de crescer, atingindo, porém, um peso de matéria seca muito baixo.

A queda na produção de matéria seca das plantas, com o aumento da concentração do metal no substrato de plantio, seguiu um mesmo padrão para os metais Al, Cd e Mn. As plantas cultivadas em substrato com Cr tiveram um padrão de queda mais acentuado (Figura 6).

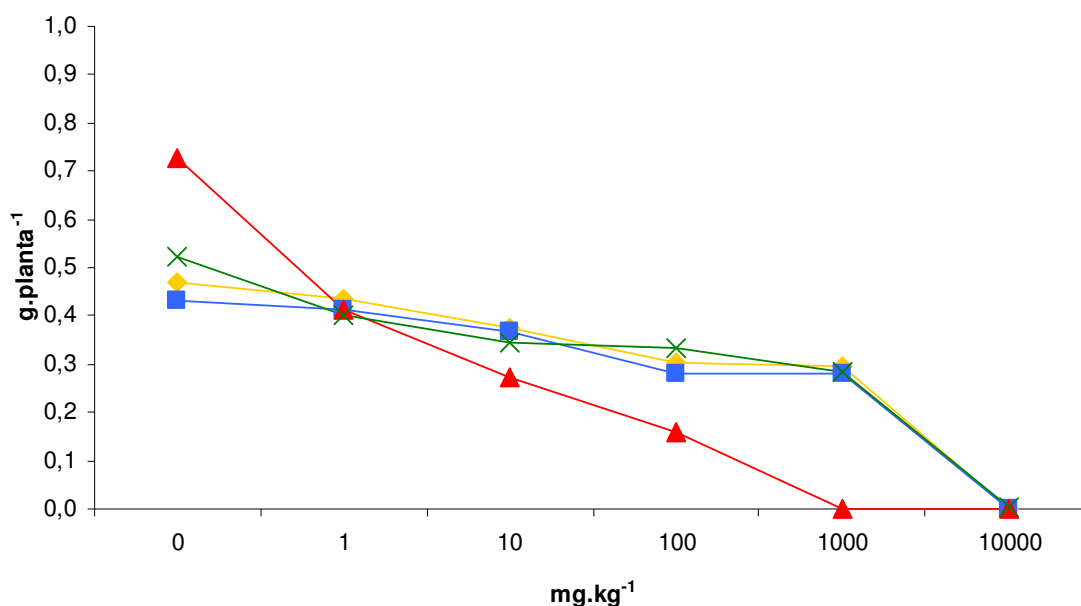


Figura 6. Peso seco total de mudas de *Eucalyptus dunnii* em substrato contendo diferentes doses de metal, sob condições de casa de vegetação. Alumínio (◆), Cádmi (■), Cromo (▲) e Manganês (×).

A altura das plantas foi menos afetada que a matéria seca pelo aumento da dose do metal. Nos tratamentos com Al, Cd e Mn, a altura manteve-se praticamente constante até a dose de 100 mg.kg⁻¹ (Figura 7). Para o tratamento com Cr a altura já começou a diminuir na dose de 10 mg.kg⁻¹ em relação à dose sem metal, caindo rapidamente à medida que

aumentava a dose de metal no substrato. As respostas das plantas às doses crescentes de metal foram de certa forma, condizentes com as respostas observadas na produção de matéria seca.

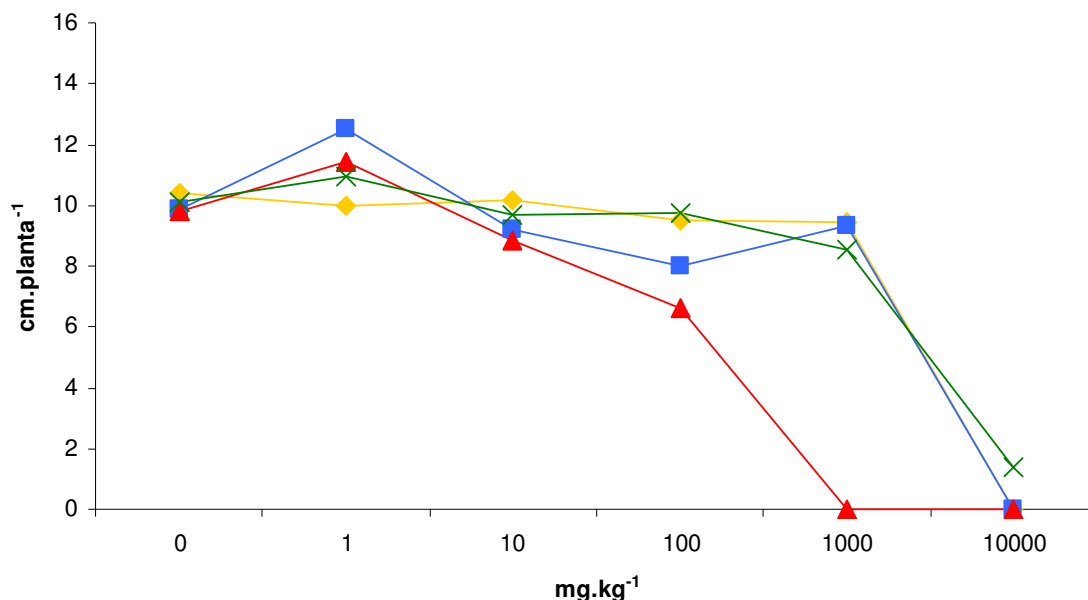


Figura 7. Altura de mudas de *Eucalyptus dunnii* em substrato contendo diferentes doses de metal, sob condições de casa de vegetação. Alumínio (◆), Cádmiio (■), Cromo (▲) e Manganês (×).

No período experimental, observaram-se vários sintomas foliares que indicaram a toxicidade do metal para as plantas (BRUNDRETT et al., 1996). Ocorreu queda precoce de algumas folhas e também perda de textura. O metal que proporcionou sintomas mais diversos e mais intensos foi o Cr, que causou clorose acentuada na dose 10 mg.kg⁻¹, sendo mais grave conforme o aumento da dose. O aparecimento desse sintoma foi precoce, logo que as primeiras folhas começaram a aparecer. O amarelecimento causado pela clorose foi seguido de manchas avermelhadas nas bordas foliares. Manchas vermelhas também apareceram já no tratamento a 1 mg.kg⁻¹ nas pontas das folhas (Figura 8a). Nas plantas do tratamento com Cd, a clorose só foi visível a partir de 100 mg.kg⁻¹. Porém, formaram-se manchas roxas espalhadas pelas folhas já nas plantas das menores doses. Na presença do Al, as plantas apresentaram manchas avermelhadas, bem como manchas amarelo pálidas, a partir de 1 mg.kg⁻¹, inclusive nas folhas mais jovens. As pontas das folhas do tratamento com 100 mg.kg⁻¹ de Al apresentaram manchas que começaram a secar rapidamente (Figura 8a). No tratamento com Mn, uma leve clorose teve início na dose de 10 mg.kg⁻¹, também com a presença de pequenas manchas avermelhadas. Acima de 100 mg.kg⁻¹, a clorose foi

mais acentuada e as folhas mais novas já apresentavam leve coloração avermelhada na base e manchas amareladas espalhadas.



(a)

(b)

Figura 8. Plantas com sintomas de deficiência nutricional. Clorose e manchas avermelhadas (a) e manchas secas (b).

4.4. Efeito da associação simbiótica entre plantas de *Eucalyptus dunnii* e fungos ectomicorrízicos selecionados, na sobrevivência e crescimento das plantas em substrato contaminado com metais, sob condições de casa de vegetação

À semelhança do que foi observado no experimento anterior, o crescimento das plantas foi reduzido com o aumento da dose do metal. Mas observou-se uma melhoria substancial do crescimento, em termos de altura e produção de matéria seca nos tratamentos inoculados. Esse efeito, porém, dependeu do isolado fúngico inoculado.

De maneira geral os metais menos tóxicos para as plantas, tanto inoculadas quanto não-inoculadas, foram o Al e o Mn, corroborando os resultados do experimento anterior (cf. item 4.3). Nas plantas testemunhas não-inoculadas, o metal que mais afetou o crescimento foi o Cr, cujos valores de peso de matéria seca foram os menores obtidos. Nesse tratamento não inoculado, na concentração de 100 mg.kg^{-1} , não houve sobreviventes, colocando esse metal como aquele que proporcionou a menor taxa de sobrevivência. Esses resultados também corroboram os resultados observados no estudo anterior, onde o Cr também se destacou como o metal com maior efeito inibidor.

Mas, esse padrão modificou-se substancialmente com a inoculação das plantas com fungos ectomicorrízicos. Nos tratamentos inoculados, o Cd passou a ser o metal que produziu maior inibição de crescimento e menor sobrevivência. Dentre os tratamentos com inoculação, os isolados UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188 foram aqueles que se destacaram, ao proporcionar maior crescimento e sobrevivência das plantas. As plantas inoculadas com o isolado UFSC-Ch163, em particular, apresentaram os maiores teores de matéria seca de todo o experimento.

Para o tratamento com Al (Figura 9), a queda na produção de matéria seca e altura não foi muito acentuada, embora tenha havido uma redução nesses parâmetros com o aumento da dose. No tratamento inoculado com o isolado UFSC-Pt116, houve um aumento visível na produção de matéria seca quando a dose passou de 0 para 10 mg.kg⁻¹, passando de 0,452 g.planta⁻¹ para 0,633 g.planta⁻¹. Nas plantas inoculadas com o isolado UFSC-Sc68, ocorreu um ligeiro aumento na produção de matéria seca na dose de 100 mg.kg⁻¹, entretanto a altura apresentou um padrão oposto. Na dose mais elevada desse metal (1000 mg.kg⁻¹) não houve crescimento. A maior produção de matéria seca e a maior altura foram atingidas pelo tratamento inoculado com o isolado UFSC-Ch163, que promoveu os maiores valores nessas variáveis em todas as doses (Figura 10). Apenas na dose 1000 mg.kg⁻¹ de Al, a matéria seca do tratamento inoculado com o isolado UFSC-Ch163 se igualou à matéria seca do tratamento inoculado com o isolado UFSC-Pt188.

A curva de matéria seca e de altura para o Cd (Figuras 11 e 12) foi bastante semelhante para todos os tratamentos de inoculação, mostrando uma queda um pouco mais acentuada para o tratamento inoculado com o isolado UFSC-Sc68 com o aumento da dose do metal. Para o tratamento não-inoculado e o inoculado com o isolado UFSC-Ch163, não houve crescimento na dose 1000 mg.kg⁻¹. Para os tratamentos inoculados com os isolados UFSC-Sc68 e UFSC-Pt116 já não se observou crescimento a partir de 100 mg.kg⁻¹. O tratamento inoculado com o isolado UFSC-Ch163 se mostrou mais eficiente nas doses 0 e 10 mg.kg⁻¹, onde obteve maior média na produção de matéria seca.

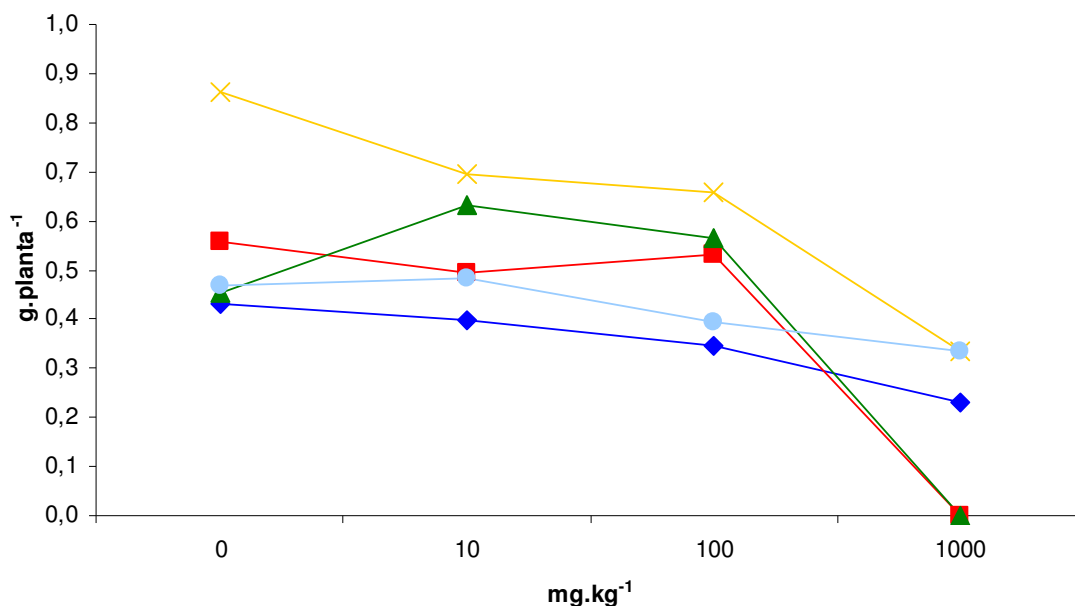


Figura 9. Peso seco total de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de alumínio, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

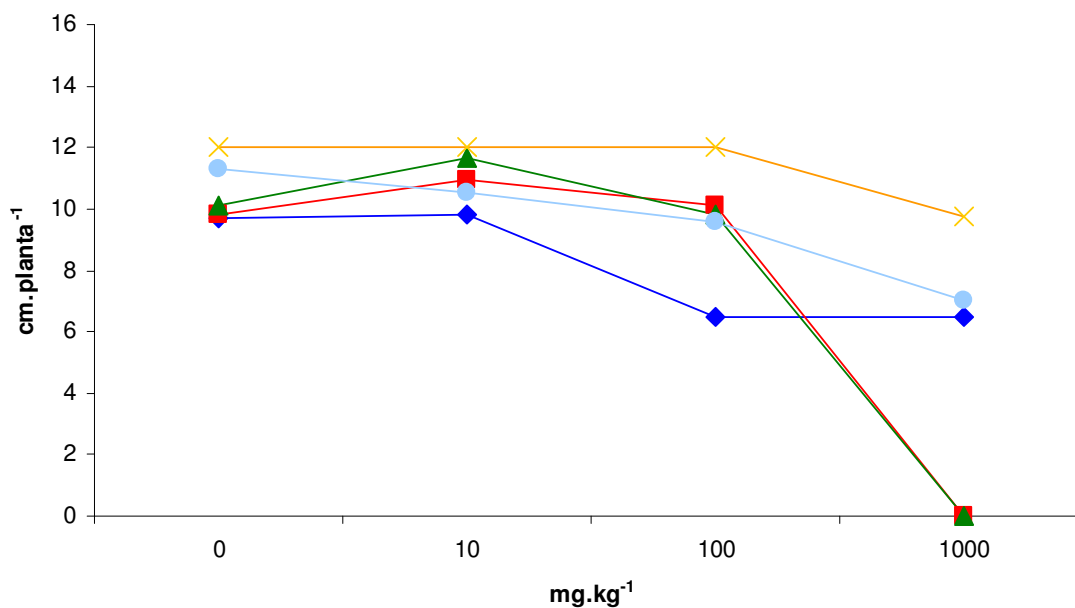


Figura 10. Altura de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de alumínio, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

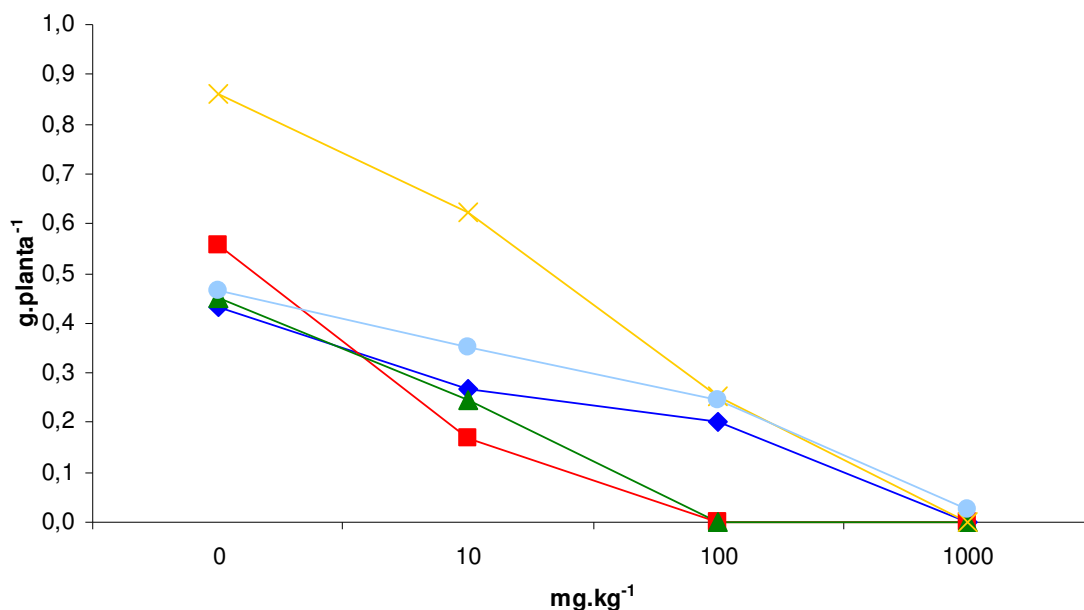


Figura 11. Peso seco total de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cádmio, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

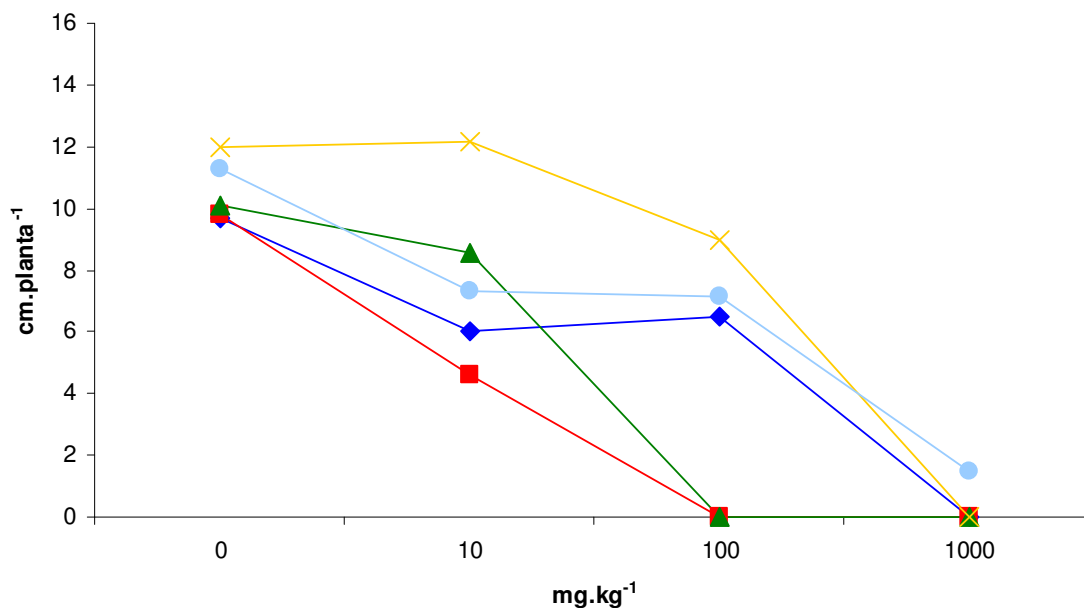


Figura 12. Altura de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cádmio, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

Também para o Cr, a variação da altura e da produção de matéria seca foi semelhante. As plantas do tratamento testemunha, não-inoculadas, se mostraram bastantes sensíveis à presença deste metal, não tendo sido observado crescimento a partir da dose de 100 mg.kg^{-1} (Figura 13).

As plantas dos tratamentos UFSC-Pt188 e UFSC-Pt116 apresentaram valores de matéria seca bastante semelhantes nas duas primeiras doses (0 e 10 mg.kg^{-1}), porém, na dose superior, 100 mg.kg^{-1} , as plantas do tratamento inoculado com UFSC-Pt116 sofreram queda na produção de matéria seca enquanto as do tratamento UFSC-Pt188 apresentaram um ligeiro aumento na produção. Para o tratamento inoculado com o isolado UFSC-Sc68, houve aumento na matéria seca na dose 10 mg.kg^{-1} , seguindo-se uma queda na dose seguinte. A partir desse ponto, a matéria seca permaneceu constante. As plantas desse tratamento de inoculação, apresentaram o maior valor de matéria seca nesta dose (1000 mg.kg^{-1}), dentre todos os tratamentos, com $0,407 \text{ g.planta}^{-1}$. Já as plantas inoculadas com o isolado UFSC-Ch163, apresentaram queda na matéria seca na dose 10 mg.kg^{-1} , com ligeiro aumento na dose de 100 mg.kg^{-1} e queda na dose mais elevada (1000 mg.kg^{-1}).

A altura das plantas diminuiu com o aumento da dose de Cr, sendo essa queda mais acentuada no tratamento testemunha, já na dose de 10 mg.kg^{-1} , as plantas desse tratamento apresentaram altura bem inferior às dos demais tratamentos. Nas plantas inoculadas, destacaram-se aquelas dos tratamentos UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188, com a altura permanecendo mais ou menos constante até a dose de 100 mg.kg^{-1} (Figura 14).

O comportamento das plantas foi semelhante para o Mn, com aumento na produção de matéria seca na dose de 10 mg.kg^{-1} e queda na dose de 100 mg.kg^{-1} . O tratamento inoculado com o isolado UFSC-Pt188 teve a produção de matéria seca reduzida na dose de 1000 mg.kg^{-1} , já o tratamento inoculado com o isolado UFSC-Sc68 e o tratamento não-inoculado aumentaram a produção de matéria seca nessa dose. As plantas inoculadas com o isolado UFSC-Pt116 apresentaram aumento na produção de matéria seca nas doses de 10 mg.kg^{-1} e de 100 mg.kg^{-1} , mas a produção diminuiu em presença de 1000 mg.kg^{-1} . Para as plantas inoculadas com o isolado UFSC-Ch163, ocorreu uma queda na produção de matéria seca a 10 mg.kg^{-1} , seguindo-se um aumento nas doses seguintes. No caso desse isolado, o maior valor de matéria seca produzida foi observado na dose mais alta (1000 mg.kg^{-1}), embora a diferença em relação à dose imediatamente inferior (100 mg.kg^{-1}) não seja significativa (Figura 15).

Para todos os tratamentos inoculados, isolados UFSC-Sc68, UFSC-Pt116, UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188, e para a testemunha não-inoculada, as medidas de altura seguiram a mesma tendência observada para a produção de matéria seca (Figura 16).

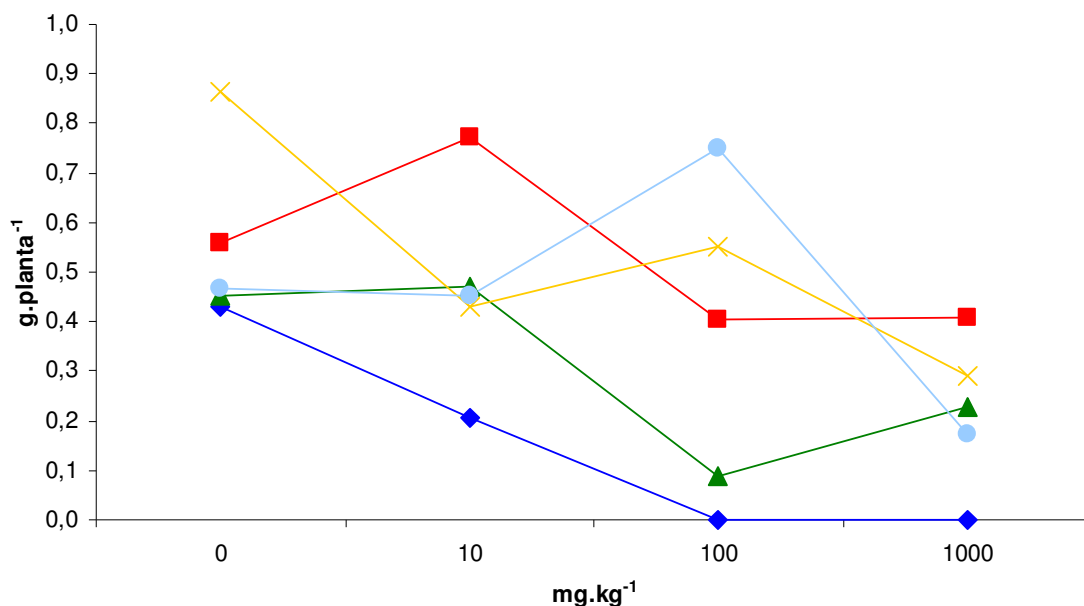


Figura 13. Peso seco total de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cromo, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

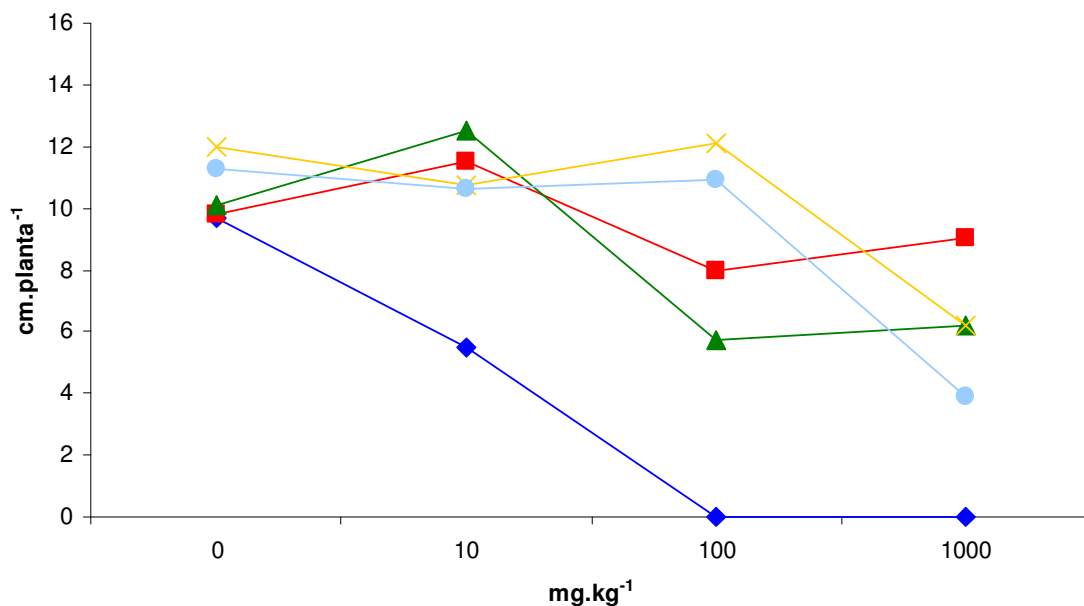


Figura 14. Altura de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de cromo, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

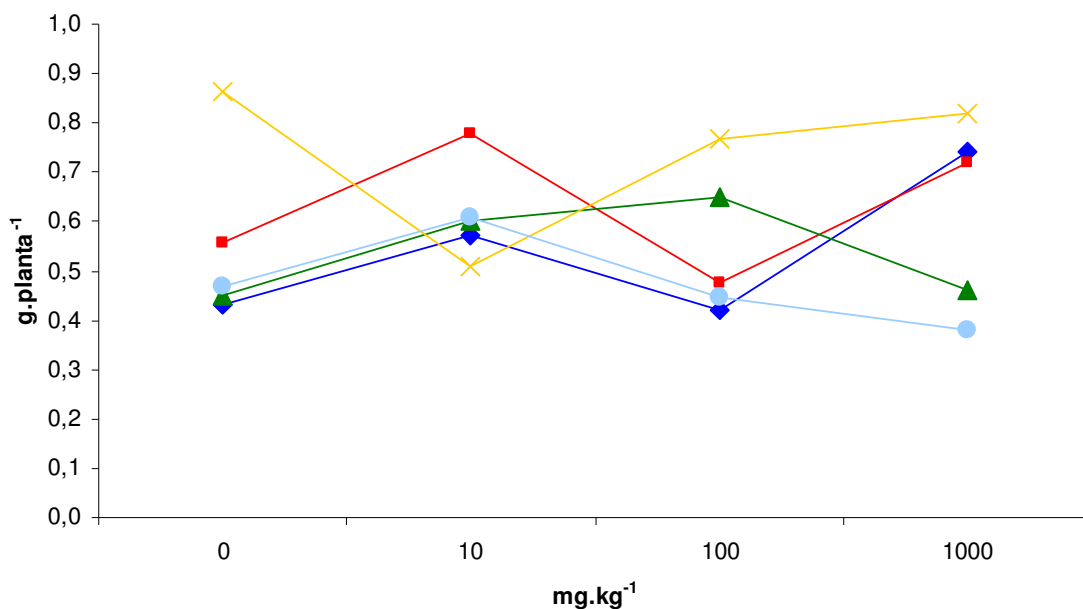


Figura 15. Peso seco total de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de manganês, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

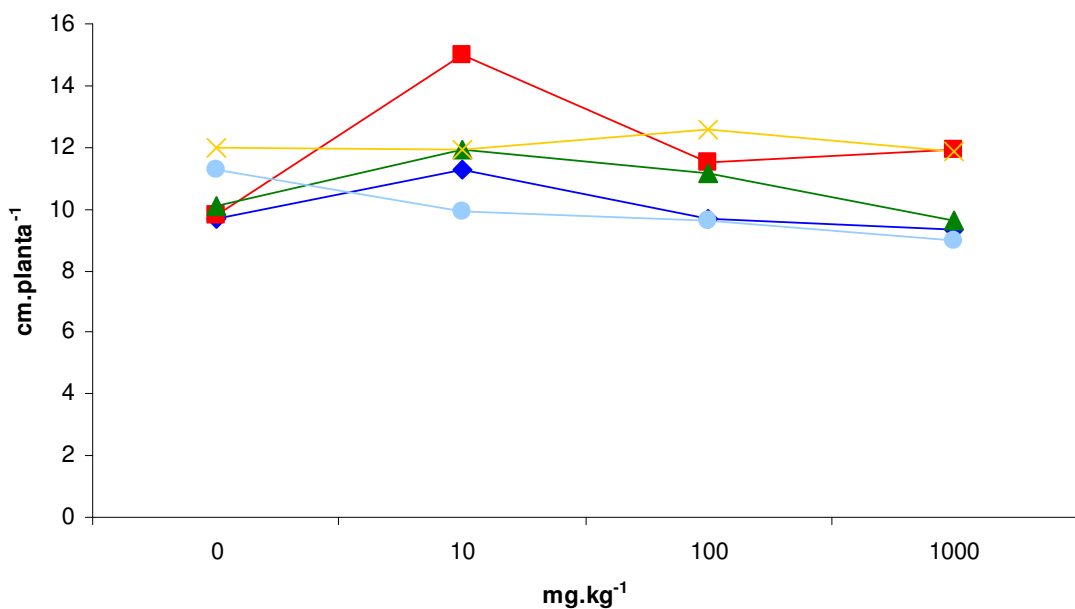


Figura 16. Altura de mudas de *Eucalyptus dunnii*, inoculadas com isolados de fungos ectomicorrízicos e cultivadas em substrato contendo diferentes doses de manganês, sob condições de casa de vegetação. Testemunha não-inoculada (◆), UFSC-Sc68 (■), UFSC-Pt116 (▲), UFSC-Ch163 (×), UFSC-Pt188 (●).

Como no experimento anterior, as plantas apresentaram sintomas de toxicidade, como manchas, perda foliar precoce e de textura, porém, de maneira geral, os sintomas apresentados foram menos graves. O Cr causou o aparecimento de manchas roxas e clorose, principalmente nas plantas crescendo na dose de 1000 mg.kg^{-1} . No tratamento com o isolado UFSC-Sc68, as folhas antigas ficaram roxas e apresentaram manchas claras, enquanto que as folhas mais novas apresentaram ligeira clorose logo que apareceram. Algumas plantas do tratamento UFSC-Ch163 apresentaram-se completamente arroxeadas na dose de 10 mg.kg^{-1} . Em 1000 mg.kg^{-1} , as plantas apresentaram muitas manchas roxas e clorose acentuada. Nos tratamentos UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188 ocorreu o aparecimento de manchas roxas e ligeira clorose nas folhas das plantas crescendo em doses mais altas. Finalmente, no tratamento não-inoculado apareceram manchas roxas bastante intensas e as folhas começaram a secar.

O Cd provocou clorose e manchas roxas em todas as plantas, mesmo nas doses mais baixas. Esses sintomas foram mais acentuados nas plantas não-inoculadas, o mesmo acontecendo com as plantas inoculadas com o isolado UFSC-Sc68. No tratamento inoculado com o isolado UFSC-Pt188, tanto a 100 mg.kg^{-1} como a 1000 mg.kg^{-1} , ocorreu o aparecimento de manchas claras e roxas nas folhas antigas e também nas novas. Para o tratamento inoculado com o isolado UFSC-Pt116, apenas as folhas novas apresentaram manchas roxas. No tratamento inoculado com o isolado UFSC-Ch163, as plantas nas doses de 10 mg.kg^{-1} e de 100 mg.kg^{-1} as plantas também apresentaram clorose e manchas roxas.

Em presença de Al, as plantas apresentaram clorose na dose 1000 mg.kg^{-1} nos tratamentos inoculados com o isolado UFSC-Ch163 e na testemunha, não-inoculada. No tratamento com o isolado UFSC-Pt116, as plantas apresentaram manchas roxas acentuadas na dose de 100 mg.kg^{-1} . Nos demais tratamentos não foram observados sintomas que indicassem toxicidade pelo metal.

Na presença do Mn, as plantas inoculadas com os isolados UFSC-Sc68 e UFSC-Pt188 apresentaram manchas nas folhas e as folhas mais antigas ficaram com uma coloração arroxeadas nas doses de 100 mg.kg^{-1} e 1000 mg.kg^{-1} . Nesta última dose, também apresentaram clorose. No tratamento não-inoculado ocorreram manchas roxas nas folhas antigas em todas as doses do metal. A clorose esteve presente apenas nas plantas crescendo em 100 mg.kg^{-1} e 1000 mg.kg^{-1} . Já as plantas inoculadas com os isolados UFSC-Pt116 e UFSC-Ch163 apresentaram ligeira clorose apenas em presença da dose mais elevada desse metal.

As plantas que não receberam metal mostraram-se saudáveis, sem sintomas de toxicidade, embora nos tratamentos inoculados com os isolados UFSC-Sc68 e UFSC-Pt188 algumas delas tenham apresentado manchas secas, indicando uma possível virose.

Os sintomas de toxicidade apresentados pelas plantas indicam deficiência nutricional, certamente causada pela presença do metal no substrato de plantio. De acordo com Brundrett et al. (1996), boa parte dos sintomas causados por deficiência nutricional é facilmente distinguível externamente, uma vez que cada deficiência em particular produz características bem definidas. Para os eucaliptos esses sintomas são bem definidos e caracterizados, facilitando o trabalho em viveiros.

Utilizando a chave de Brundrett et al. (1996) e de acordo com os sintomas apresentados pelas plantas nestes experimentos, foi possível observar que os metais causaram deficiência visível de 6 nutrientes: nitrogênio (N), enxofre (S), potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca) e ferro (Fe). Desses, os 5 primeiros são macronutrientes e o último é um micronutriente. Isso então explica porque houve queda acentuada na produção de matéria seca e de altura nas maiores doses de metais. Os sintomas de deficiência nutricional foram mais acentuados nas doses mais elevadas de Cd e Cr, indicando que esses dois metais afetam de maneira mais brusca o aporte nutricional das plantas e também dos isolados fúngicos.

É necessário levar em conta que os sintomas visíveis foram causados por deficiências nutricionais graves e que os outros nutrientes podem, também, ter sido afetados pela presença dos metais, embora suas deficiências não tenham sido manifestadas externamente (BRUNDRETT et al., 1996).

Outro ponto importante a ser levantado é que apesar dos sintomas apresentados terem relação direta com a deficiência nutricional, os minerais essenciais foram aplicados de maneira correta e na dose recomendada por estudo anterior (SOUZA et al., 2004), indicando que os metais interferem no aporte e utilização dos nutrientes pela planta. Porém, não cabe a esse estudo verificar de que maneira cada metal interage com os diferentes nutrientes, afetando o balanço nutricional das plantas.

Considerados em seu conjunto, os resultados indicam que a inoculação com esses fungos ectomicorrízicos promove uma melhor sobrevivência e melhor crescimento das plantas. Essa melhoria foi notadamente mais acentuada nas plantas inoculadas com os isolados UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188. Esses dois isolados foram aqueles que apresentaram a maior frequência de casos de aumento de produção de matéria seca nas diferentes doses e diferentes metais.

A tolerância de fungos ectomicorrízicos à presença de metais tóxicos no solo e em meios de cultura tem sido amplamente demonstrada em diversos estudos, embora os mecanismos relacionados a isso ainda não estejam completamente esclarecidos (COLPAERT & VAN ASSCHE, 1992a e 1992b; JENTSCHKE et al., 1999; HARTLEY-WHITAKER et al. 2000; KRUPA & KOZDRÓJ, 2004; MOYER-HENRY et al., 2005; RAY et al., 2005).

Tolerância e resistência são os termos comumente usados quando se fala do crescimento de fungos ectomicorrízicos em presença de metais, porém são termos que se distinguem pelo mecanismo de ação. A resistência pode ser definida como sendo a habilidade de sobreviver em presença de metal, por ação de um mecanismo produzido como resposta direta aos metais (redução de influxo ou aumento de efluxo, por exemplo). Tolerância pode ser definida como a habilidade de um organismo sobreviver em presença de doses elevadas de metais por propriedades intrínsecas e/ou modificações ambientais, como parede celular impermeável e excreção de metabólitos que levam à detoxificação dos metais (quelação através de metalotioneínas, por exemplo). Todavia, é muito difícil distinguir exatamente qual o mecanismo envolvido no processo de detoxificação dos metais, uma vez que inúmeros fatores físico-químicos (pH, matéria orgânica solúvel, ânions e cátions) e biológicos (biossorção e bioacumulação) estão envolvidos na biodisponibilidade do metal e influenciam diretamente o mecanismo utilizado no processo de tolerância (GADD, 1993; GODBOLD et al., 1998; BELLION et al., 2006).

Os mecanismos de proteção podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a localização, sendo os extracelulares (quelação, ligação à parede celular e controle de fluxo) mais relacionados à resistência e os intracelulares (ligação a metalotioneínas, melaninas e compartimentalização) relacionados ao fenômeno da tolerância (LEYVAL et al., 1997).

A quelação é um processo onde o metal é ligado a substâncias orgânicas excretadas pelo fungo a fim de imobilizar o metal e outras substâncias tóxicas. As moléculas capazes de realizar essa função são os ácidos orgânicos (cítrico, acético, succínico, oxálico, málico e outros), além da produção de muco. Comumente são formados cristais e precipitados provenientes do complexo ácido orgânico-metal. Estudos mostraram que fungos ectomicorrízicos tolerantes a metais são melhores solubilizadores de minerais, pois produzem maior quantidade desses ácidos, responsáveis por essa solubilização, confirmando a possível relação da tolerância a metais com a produção de ácidos orgânicos (GALLI et al., 1994; AHONEN-JONNARTH et al., 2000; FOMINA et al., 2005).

A parede celular, o primeiro local de interação direta entre o fungo e as espécies de metais, é composta por diferentes polissacarídeos e contém melaninas, lipídeos e proteínas em pequenas quantidades. Desta maneira, existem muitos locais potencialmente livres para ligação dos metais – grupos carboxil, amino, hidroxil, fosfato e tiol, e a ligação dos metais a esses locais não depende da atividade metabólica do fungo. É comum também que os metais sejam utilizados na organização estrutural da parede, fazendo parte da complexação de pequenos polímeros de quitina, por exemplo. A melanina encontrada no exterior da parede celular é formada pela oxidação de fenóis secretados pelo fungo, e juntamente com polímeros de compostos fenólicos são ricos em unidades de peptídeos, ácidos graxos,

carboidratos e hidrocarbonetos alifáticos, capazes de se ligar a metais presentes no ambiente (GADD, 1993; GALLI et al., 1994; JENTSCHKE & GODBOLD, 2000; TAM 2005).

O controle de fluxo se dá através dos transportadores de membrana. Como a maioria dos metais tóxicos não tem relação com a nutrição fúngica, os transportadores envolvidos com o transporte de nutrientes são, também, usados para a entrada e a retirada do metal da célula. O metal pode ser impedido de entrar na célula por diminuição de influxo, ou seja, os transportadores de membrana diminuem sua atividade. Caso o metal entre na célula, ele é retirado por aumento de efluxo, indo contra seu gradiente de concentração (BLAUDEZ et al., 2000; BELLION et al., 2006). Em ambos os casos, pode ocorrer deficiência nutricional, pois no primeiro caso, o aporte de nutrientes fica prejudicado, uma vez que o fluxo de íons é interrompido. No segundo caso pode haver fuga de íons, já que o transporte passa a ocorrer de maneira mais intensa.

Mesmo que os mecanismos extracelulares de proteção sejam eficientes, quantidades consideráveis de metais vão para o interior das células e outros mecanismos precisam funcionar.

Metalotioneínas são peptídeos de baixo peso molecular, com alto conteúdo de cisteína, ausência de aminoácidos alifáticos e histidina, com alta afinidade por metais. Têm importante papel na regulação da concentração de metais essenciais, como Zn e Cu, e também de metais potencialmente tóxicos (Cd, Pb, Hg e outros) (GALLI et al., 1994).

As melaninas produzidas no citosol, assim como aquelas presentes na parede celular, são capazes de se ligar a metais tóxicos, tornando-os indisponíveis. Grupos sulfidril não-protéicos, polifosfatos e biomoléculas como a glutatona, também se encontram no citosol e são capazes de se ligar a metais, regulando sua concentração interna. Os produtos formados nessa complexação são transportados para o interior de vacúolos, originando inclusões que se caracterizam por alta densidade quando observadas ao microscópio (GRAZZIOTTI et al., 2001b; TURNAU et al., 2002; COURBOT et al., 2004).

Os mecanismos de proteção não podem ser generalizados, uma vez que dependem da espécie fúngica e do metal tóxico presente. Dificilmente se encontra uma única espécie de fungo e um único metal poluindo o solo, o que dificulta o entendimento de cada processo separadamente. As interações entre os fungos podem alterar a maneira como os metais presentes serão absorvidos ou imobilizados e, também, a interação entre os diferentes metais pode torná-los mais ou menos disponíveis (WILKINS, 1991; COLPAERT & VAN ASSCHE, 1992b; WILKINSON & DICKINSON, 1995; ANDERSON & CAIRNEY, 2007). Portanto, fica difícil definir, com estes experimentos, quais são os mecanismos de detoxificação utilizados pelos fungos testados, embora possamos inferir alguns deles.

Certamente, para o isolado UFSC-Ch163, o mecanismo via melanina não parece ser o responsável pelo fenômeno, já que não foi observada mudança de cor no meio de cultura.

Porém, outras substâncias podem ter sido produzidas com a capacidade de imobilizar os metais presentes. É correto dizer que mecanismos de internalização também atuam, colaborando para que ele tenha se saído bem nesta série de experimentos. Sua alta eficiência em relação a todos os metais testados pode indicar que o mecanismo para detoxificação não seja metal-específico e que tenha a mesma eficiência em diferentes meios de crescimento.

O isolado UFSC-Pt116 produz grande quantidade de pigmentos, possivelmente melânicos, o que permite seu crescimento em doses elevadas dos metais. Sua tolerância, que foi demonstrada nesta série experimental, parece estar em grande parte associada a esse fenômeno, embora não se possa dizer que este seja o único mecanismo utilizado. Como comentado anteriormente, mecanismos intracelulares também são responsáveis pela detoxificação do meio.

Os isolados UFSC-Sc68 e UFSC-Pt188 produzem grande quantidade de pigmentos, que podem colaborar na capacidade de detoxificar o meio. Porém, são dois isolados com baixa velocidade de crescimento mesmo quando em meio de cultura de manutenção. Para determinar qual o seu nível de tolerância aos metais, parâmetros tais como velocidade de crescimento e concentração inibitória devem ser avaliados.

Esses resultados confirmam aqueles obtidos por diversos outros autores, e mostram que esse tipo de associação simbiótica pode ser utilizado em projetos de descontaminação do solo.

5. Considerações finais

Os experimentos realizados neste trabalho mostraram que os isolados de fungos ectomicorrízicos utilizados apresentam certa tolerância aos metais testados em meio de cultura e que, quando associados a plantas de *E. dunnii*, melhoram a sobrevivência e o crescimento dessas plantas em substrato contaminado. São necessários, porém, estudos complementares, tanto *in vitro*, quanto em situações *in vivo*.

Em relação ao cultivo axênico dos isolados:

- caracterização de substâncias imobilizadoras produzidas em presença do metal;
- ensaios histoquímicos para localização dos metais tanto interna (inclusões no citosol) quanto externa (ligação à parede celular);
- características micelianas e velocidade de crescimento;
- interações entre diferentes metais e um mesmo fungo.

Em relação ao cultivo sob condições de casa de vegetação, com plantas de *E. dunnii* inoculadas:

- eficiência na retirada e/ou imobilização dos metais presentes no substrato;
- ensaios histoquímicos para localização dos metais na parte aérea e nas raízes das plantas;
- estudos sobre a alteração do metabolismo vegetal em presença do metal no substrato.

Em relação à utilização em situações reais de solos contaminados:

- análise dos contaminantes do solo;
- estudos da diversidade fúngica local;
- eficiência da simbiose na translocação e imobilização dos metais.

A metodologia utilizada se mostrou bastante eficiente, porém algumas mudanças poderiam ser feitas a fim de minimizar possíveis erros experimentais:

- modificação do meio de cultura, para reduzir a formação de precipitados;
- aprimoramento do processo de inoculação com isolados fúngicos, *in vitro* ou utilizando inoculantes, a fim de aumentar a eficiência na produção de plântulas infectadas.

Os experimentos realizados exigem muito tempo no seu preparo, são de longa duração, ocupam muito espaço, requerem cuidados diários e exigem pesquisadores treinados. Portanto, a visualização dos resultados é demorada e também a análise dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos são favoráveis à aplicação prática num futuro próximo, já que essa metodologia é menos danosa ao meio ambiente por permitir a sucessão vegetal e a manutenção da microbiota do solo, que contribuem para o processo de descontaminação do solo. Além disso, as florestas plantadas participam no seqüestro de carbono, diminuindo a quantidade de CO₂ na atmosfera e colaborando para diminuição do efeito estufa.

Referências bibliográficas

- AHONEN-JONNARTH, U.; VAN HEES, P. A. W.; LUNDSTRÖM, U. S.; FINLAY, R. D. 2000. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. **New Phytologist**, New York, v. 146, n. 3, pp. 557-567.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. **Introductory mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 869 p.
- ALVAREZ, M. L.; CERCEDA, M. C. 2005. *Chondrogaster angustisporus*, nueva cita para europa. **Cryptogamie Mycologie**. Paris, v. 26, pp. 113-122.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. 2007. Ectomycorrhizal fungi: exploiting the mycelial frontier. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 31, n. 4, pp. 388-406.
- BELLION, M.; COURBOT, M.; JACOB, C.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 254, n. 2, pp. 173-181.
- BLAUDEZ, D.; BOTTON, B.; CHALOT, M. 2000. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Microbiology-UK**, Reading, v. 146, pp. 1109-1117.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N. L.; DELL, B. GROVE, T.; MALAJCZUK, N. 1996. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra, ACIAR Monograph 32, 374p.
- COLPAERT, J. V.; VAN ASSCHE, J. A. 1987. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. **Functional Ecology**, London, v. 1, n. 4, pp. 415-421.
- COLPAERT, J. V.; VAN ASSCHE, J. A. 1992a. The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, n. 2, pp. 237-243.
- COLPAERT, J. V.; VAN ASSCHE, J. A. 1992b. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 143, n. 2, pp. 201-211.
- COURBOT, M.; DIEZ, L.; RUOTOLO, R.; CHALOT, M.; LEROY, P. 2004. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 12, pp. 7413-7417.
- FOMINA, M. A.; ALEXANDER, I. J.; COLPAERT, J. V.; GADD, G. M. 2005. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 5, pp. 851-866.
- GADD, G. M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, New York, v. 124, n.1, pp. 25-60.
- GALLI, U.; SCHÜEPP, H.; BRUNOLD, C. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, n.2, pp. 364-368.
- GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L.; CASTELLANO, M. A. TRAPPE, J. M. 2000. Ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus and Pinus plantations in southern Brazil. **Mycologia**, Lawrence, KS, v.92, pp. 1166-1177.

- GODBOLD, D. L.; JENTSCHKE, G.; WINTER, S.; MARSCHNER, P. 1998. Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. **Chemosphere**, Oxford, v. 36, n. 4-5, pp. 757-762.
- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.; CARVALHO, D. 2001a. Efeito de Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, pp. 831-837.
- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.; CARVALHO, D. 2001b. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, pp. 839-848.
- HARTLEY-WHITAKER, J.; CAIRNEY, J. W. G.; MEHARG, A. A. 2000. Toxic effects of cadmium and zinc in ectomycorrhizal colonization of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from soil inoculum. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 19, n. 3, pp. 694-699.
- JENTSCHKE, G.; WINTER, S.; GODBOLD, D. L. 1999. Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. **Tree Physiology**, Victoria, v. 19, n. 1, pp. 23-30.
- JENTSCHKE, G.; GODBOLD, D. L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, n. 2, pp. 107-116.
- KENDRICK, B. 2000. **The Fifth Kingdom**. Ontario: Mycologue Publications, 373 p.
- KRUPA, P.; KOZDRÓJ, J. 2004. Accumulation of heavy metals by ectomycorrhizal fungi colonizing birch trees growing in an industrial desert soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Dordrecht, v. 20, n. 4, pp. 427-430.
- LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, New York, v. 7, n. 3, pp. 139-153.
- MARTIN, F.; DÍEZ, J.; DELL, B.; DELARUELLE, C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. **New Phytologist**, New York, v. 153, n. 2, pp. 345-357.
- MARX, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 2, pp. 153-163.
- MARX, D. H.; MAUL, S. B.; CORDELL, C. E. 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In: Leatham, G.F. (ed.) **Frontiers in Industrial Mycology**, New York/London: Chapman & Hall, pp. 78-98.
- MOYER-HENRY, K.; SILVA, I.; MACFALL, J.; JOHANNES, E.; ALLEN, N.; GOLDFARB, B.; RUFTY, T. 2005. Accumulation and localization of aluminium in root tips of loblolly pine seedlings and the associated ectomycorrhiza *Pisolithus tinctorius*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 2, pp. 111-120.
- MULLER, L. A. H.; LAMBAERTS, M.; VANGRONVELD, J.; COLPAERT, J.V. 2004. AFLP-based assessment of the effects of environmental heavy metal pollution on the genetic structure of pioneer populations of *Suillus luteus*. **New Phytologist**, Oxford, v. 164, n. 2, pp. 297-303.

- PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. 2004. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: NRC Research Press, 2004. 173 p.
- RAY, P.; TIWARI, R.; REDDY, U. G.; ADHOLEYA, A. 2005. Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 21, n. 3, pp. 309-315.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. 1997. **Mycorrhizal Symbiosis**, London: Academic Press. 605 p.
- SOUZA, L. A. B.; SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. 2004. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 349-355.
- SOUZA, L. A. B.; BONNASSIS, P. A. P.; SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. 2008. New isolates of ectomycorrhizal fungi and the growth of eucalypt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, pp. 235-241.
- TAM, P. C. F. 1995. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza**, New York, v. 5, n. 3, pp. 181-187.
- TURNAU, K. 1991. The influence of cadmium dust on fungi in a Pino-Quercetum forest. **Ekologia Polska**, Łomianki, v. 39, n. 1, pp.39-57.
- TURNAU, K.; MLECZKO, P.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. & BOTTON, B. 2002. Heavy metal binding properties of *Pinus sylvestris* mycorrhizas from industrial wastes. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warsaw, v. 71, n. 3, pp. 253-261.
- WILKINS, D. A. 1991. The influence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 35, n. 2/3, pp. 245-260.
- WILKINSON, D. M.; DICKINSON, N. M. 1995. Metal resistance in trees: the role of mycorrhizae. **Oikos**, Copenhagen, v. 72, n. 2, pp. 298-300.