

**UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
ECOSSISTEMAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ECOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA
DE ECTOMICORRIZAS**

GABRIELA CHAVES CANTON

**VILA VELHA
MAIO DE 2012**



UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
ECOSSISTEMAS

EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ECOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA
DE ECTOMICORRIZAS

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

GABRIELA CHAVES CANTON

Orientador:
Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos

VILA VELHA
MAIO DE 2012

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C232e Canton, Gabriela Chaves

Efeito do manganês sobre a ecofisiologia e bioquímica de ectomicorrizas/ Gabriela Chaves Canton. – 2012.

61 f. : il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2012.

1. Manganês – Efeito fisiológico. 2. Estresse oxidativo. 3. Eucalyptus grandis. I. 4. Ectomicorriza . I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 333.7

**UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
ECOSSISTEMAS**

Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ECOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA
DE ECTOMICORRIZAS**

GABRIELA CHAVES CANTON

Aprovada em 08 de maio de 2012,

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Anna Lvovna Okorokova Façanha – UENF

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha - UENF

Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos - UVV
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, paciência, força para que tudo pudesse ser feito da melhor forma possível. Somente através Dele é possível explicar a superação diária dos momentos difíceis em nossas vidas.

Ao professor Alessandro Coutinho Ramos pela orientação e, acima de tudo, pela amizade, grandes oportunidades e ensinamentos diários que me proporcionou.

Ao professor Arnoldo Façanha pelo apoio e à professora Anna Okorokova por aceitarem o convite para participação na banca.

À amiga Amanda Bertolazi, uma grande dupla que esteve ao meu lado em todos os momentos, todos os dias, noites e finais de semana no laboratório.

As grandes amigas Juliana Melo, Mariana Wolkartt, Caroline de Abreu e Rafaela Bertoani pela enorme paciência, amizade e companheirismo. Estas serão sempre lembradas.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB) Freddy, Tamires, Nágila, Júlia, Sávio, Wolmen, Suellen, Colodete e Rômulo pela amizade e enorme ajuda nas diversas multiplicações, preparo de meio e soluções, lavagem de placas, entre outras funções.

À prima Samyra Medina por fazer as correções do português e do abstract.

Aos amigos Frederico Eutrópio e Maísa pela enorme ajuda na estatística e nos dados fisiológicos com muito boa vontade.

À minha família pelo apoio, compreensão e amor.

Aos meus pais, Cirilo Luca Canton e Maria Floranor Chaves Canton, a minha irmã Milena Canton, pelo apoio financeiro e amor que sempre me foi dado e dá forças.

Ao meu marido Rafael Chaves pela compreensão, amizade, apoio, paciência e amor, pois sempre que precisei todos os dias juntos, foste incondicional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
2.1 <i>Metais no solo</i>	5
2.1.1 <i>Manganês</i>	7
2.2 <i>Ectomicorrizas e recuperação de áreas degradadas</i>	7
2.3 <i>Mecanismos de tolerância a metais em ectomicorriza</i>	11
2.4 <i>Micorriza em eucalipto</i>	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 <i>Material biológico e especiação do meio de cultura</i>	16
3.2 <i>Experimento in vitro do crescimento do fungo <i>Pisolithus microcarpus</i></i> ..	16
3.3 <i>Análise da associação eucalipto-fungo sob doses de Mn^{2+}</i>	17
3.4 <i>Parâmetros fotossintéticos</i>	17
3.5 <i>Análise de nutrientes da parte aérea e porcentagem de colonização micorrízica</i>	18
3.6 <i>Porcentagem de colonização micorrízica</i>	18
3.7 <i>Determinação de proteínas totais em <i>Pisolithus microcarpus</i> e raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas e em associação ectomicorrízica</i>	19
3.8 <i>Determinação da catalase em <i>Pisolithus microcarpus</i> e raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas e em associação ectomicorrízica</i>	19
3.9 <i>Determinação da glutatona S-transferase em <i>Pisolithus microcarpus</i></i>	19

<i>e raízes de Eucalyptus grandis não micorrizadas e em associaçãoectomicorrízica</i>	
3.10 <i>Análise dos dados</i>	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 <i>Biodisponibilidade dos nutrientes no meio de cultura</i>	21
4.2 <i>Interações entre as concentrações de Mn²⁺ e o status de glicose em Pisolithus microcarpus in vitro</i>	21
4.3 <i>Análise de enzimas oxidativas do fungo Pisolithus microcarpus in vitro submetido a doses de Mn²⁺</i>	23
4.4 <i>Aspectos de crescimento, assimilação de CO₂, eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação das plantas de eucalipto ectomicorrizadas submetidas a doses de Mn²⁺</i>	25
4.5 <i>Análise de enzimas oxidativa das plantas de eucalipto ectomicorrizadas submetidas a doses de Mn²⁺</i>	32
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A, B Microscopia da raiz evidenciando a ectomicorriza em *Populus tremuloides* e a formação de Rede de Hartig, manto e hifas intercelulares circundando o córtex radicular. C. corte transversal em uma raiz com ectomicorrizas. 9
- Figura 2. Resumo dos potenciais mecanismos de detoxificação dos metais pesados em uma célula fúngica. Manto atuando como uma barreira física (1), biosorção da parede celular (2), diminuição do fluxo através da membrana plasmática (3), efluxo dos metais através de proteínas de membrana (4), quelação dos metais no citosol por compostos como fitoquelatinas, metalotioneínas ou ácidos (5), transporte do complexo PC-metal para dentro do vacúolo (7) e transporte e acumulação dos metais no vacúolo (8)..... 13
- Figura 3. Efeito do manganês no crescimento do fungo *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) em meio sólido contendo três diferentes status de glicose..... 22
- Figura 4. Médias do diâmetro micelial de *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) em meio de cultura sólido contendo doses crescentes de Mn^{2+} em 0,1, 1 e 10 g L⁻¹ de glicose..... 23
- Figura 5. Porcentagem de estimulação da atividade da catalase no micélio de *Pisolithus microcarpus* crescendo sobre duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) e três doses de glicose (0.1, 1 e 10g L⁻¹). (* $p < 0.05$; ** $p < 0,001$)..... 24
- Figura 6. Porcentagem de estimulação da atividade da Glutathione-S-Transferase no micélio de *Pisolithus microcarpus* crescendo sobre duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) e três doses de glicose (0.1, 1 e 10g/L). (* $p < 0.05$; ** $p < 0,001$)..... 25

Figura 7. Altura média (cm) (A) e peso seco (B) das plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas (NM) e em associação simbiótica com o fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn ²⁺ (200 e 1000 µM) (*p<0,05).....	26
Figura 8. Visão geral do experimento in vitro de plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas (NM) e em associação simbiótica com o fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn ²⁺ (200 e 1000 µM).....	26
Figura 9. Trocas gasosas em folhas de eucalipto <i>Eucalyptus grandis</i> aos 90 dias após o plantio não micorrizadas (NM) e em associação simbiótica com o fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn ²⁺ (200 e 1000 µM). Fotossíntese líquida (A), eficiência do uso da água (B) e eficiência de carboxilação (C). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (NM ou ECM) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de Mn ²⁺ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (NM ou ECM) na mesma concentração de Mn ²⁺	31
Figura 10. Eficiência micorrízica (%) de plantas de <i>Eucalyptus grandis</i> em associação simbiótica com o fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> (ECM) submetidas a concentrações de Mn ²⁺ (0, 200 e 1000 µM), baseada na massa de material seco total.....	32
Figura 11. Porcentagem de estimulação da atividade da catalase (CAT) em raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas (NM) e em associação (ECM) submetidas à duas concentrações de Mn ²⁺ (200 e 1000 µM).....	33
Figura 12. Porcentagem de estimulação da atividade da glutathiona S-transferase (GST) em raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas (NM) e em associação (ECM) submetidas à duas concentrações de Mn ²⁺ (200 e 1000 µM).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração iônica e estimativa de biodisponibilidade (%) de Mn^{2+} no meio MNM ajustado para os estudos de crescimento de fungos ectomicorrízico.....	21
Tabela 2. Porcentagem de inibição (-) ou estimulação (+) no crescimento de <i>Pisolithus microcarpus</i> PT 24 em 6 doses de manganês (Mn^{2+}) sob três concentrações de glicose. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).....	23
Tabela 3. Concentração de nutrientes na parte aérea de plantas <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizados (NM) e em associação simbiótica com o fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) 90 dias após a inoculação.....	28
Tabela 4. Teores e conteúdos médios de nutrientes na parte aérea de plantas <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizados (NM) e micorrizadas com <i>Pisolithus microcarpus</i> (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) 90 dias após a inoculação.....	29

RESUMO

CANTON, G.C. EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ECOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE ECTOMICORRIZAS. Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

As ectomicorrizas são alternativas ecológicas para promoção do crescimento de plantas sob estresses bióticos e abióticos. Nesta associação, significativas alterações na fisiologia e bioquímica da planta hospedeira foram anteriormente observadas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento do fungo *Pisolithus microcarpus* submetido a diferentes concentrações de manganês (Mn^{2+}) e analisar as respostas bioquímicas e ecofisiológicas da associação Eucalipto-*P. microcarpus* sob diferentes doses de Mn^{2+} . Para os estudos *in vitro* seis doses de manganês foram avaliadas (0, 50, 100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1} Mn^{2+}$ na forma de $MnCl_2$) sob três concentrações de glicose (0,1; 1 e 10 g L^{-1}). No experimento *in vivo* foram utilizadas três doses de Mn^{2+} (0, 200 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em plantas inoculadas e não-inoculadas. O crescimento fúngico foi estimulado pela presença de Mn^{2+} , principalmente na concentração mais alta de glicose. Plantas associadas ao *P. microcarpus* obtiveram um maior crescimento e peso seco em relação às não micorrizadas quando submetidas às concentrações do metal. Plantas inoculadas na presença de altas concentrações de Mn^{2+} apresentaram uma maior taxa fotossintética e significativos incrementos na eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação. Em relação à resposta enzimática, a catalase e a glutatona S-transferase foram ativadas quando o fungo foi exposto aos metais. A atividade dessas enzimas na raiz das plantas mostrou um aumento significativo em sua atividade apenas em plantas não micorrizadas. Este fato corrobora com o possível papel do fungo ectomicorrízico na fitoproteção ao Mn^{2+} . A avaliação dos nutrientes na parte aérea mostrou uma menor concentração de manganês nos tratamentos micorrizados mesmo na presença de elevadas doses. Houve um aumento nas concentrações de nitrogênio e fósforo nas plantas associadas ao fungo ectomicorrízico. O *P. microcarpus* se mostrou tolerante ao Mn^{2+} , indicando uma possível aplicação deste fungo em programas de reflorestamento em áreas contaminadas com manganês.

Palavras-chave: *Pisolithus microcarpus*, *Eucalyptus grandis*, biorremediação, estresse oxidativo, taxa fotossintética.

ABSTRACT

CANTON, G.C. EFFECT OF MANGANESE ON THE BIOCHEMISTRY AND ECOPHYSIOLOGY OF ECTOMYCORRHIZAS. Advisor: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

The ectomycorrhizae are environmentally friendly alternatives to promote the growth of plants under biotic and abiotic stress. Significant changes in the physiology and biochemistry of the host plant have been previously observed this association. This work aimed to evaluate the effect of glucose on the growth of *Pisolithus microcarpus* exposed to different concentrations of manganese (Mn^{2+}) and analyze the biochemical and ecophysiological responses of association Eucalyptus-*P. microcarpus* under different levels of Mn^{2+} . For in vitro studies six doses of manganese were tested (0, 50, 100, 200, 500 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1} Mn^{2+}$ in the form of $MnCl_2$) in three glucose concentrations (0.1, 1 and 10 g L^{-1}). *In vivo* experiment were used three doses of Mn^{2+} (0, 200 and 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in inoculated and non-inoculated. Fungal growth was stimulated in the presence of Mn^{2+} , especially at the highest concentration of glucose. Plants associated with *P. microcarpus* had the highest growth and dry weight than non-mycorrhizal when exposed to Mn^{2+} . Plants inoculated in the presence of high concentrations of Mn^{2+} showed a higher photosynthetic rate and significant increases in water use efficiency and carboxylation efficiency. The oxidative enzyme, catalase and glutathione S-transferase were activated when the fungus was exposed to metals. The activity of these enzymes in plant roots showed a significant increase in its activity only in non-mycorrhizal plants. This fact confirms the possible role of the ectomycorrhizal fungus on the fitoprotection the Mn^{2+} . The evaluation of nutrients in the soil had a lower concentration of manganese in inoculated treatments even in the presence of high doses. There was an increase in the concentrations of nitrogen and phosphorus in plants associated with the ectomycorrhizal fungus. The *P. microcarpus* showed tolerance to Mn^{2+} , indicating a possible application of this fungus in reforestation programs in areas contaminated with manganese.

Keywords: *Pisolithus microcarpus*, *Eucalyptus grandis*, bioremediation, oxidative stress, photosynthetic rate

1. INTRODUÇÃO

A contaminação do solo por metais pode promover alterações na fisiologia das plantas e também na biodiversidade do solo, especialmente nas comunidades microbianas (Baker, 1987; Hossain et al., 2012). A partir disso, a introdução de espécies vegetais torna-se uma alternativa promissora para a recuperação do ambiente contaminado com metais, principalmente se acoplada ao potencial bioacumulador de metais por fungos ectomicorrízicos (Jones & Hutchinson, 1986; Dixon, 1988; Dixon & Buschena, 1988; Siqueira et al., 2010).

As ectomicorrizas (ECMs) são associações simbióticas mutualistas estabelecidas entre raízes de espécies florestais e fungos específicos do solo. Durante a simbiose micorrízica, a planta hospedeira apresenta um maior crescimento e maior capacidade de absorção de nutrientes do solo provenientes da maior área de exploração do solo promovida pelo fungo micorrízico (Taylor & Peterson, 2005), além da proteção contra estresses bióticos e abióticos, incluindo níveis elevados de metais no solo (Shaw, 1989; Carneiro, 2001; Aloui et al., 2009).

Vários estudos têm associado o papel das ECMs na remediação de ambientes contaminados com metais como o cádmio (Cd), chumbo (Pb) e níquel (Ni) (Jones & Hutchinson, 1986; Dixon et al., 1988, Brow & Wilkins, 1985; Colpaert & Van Assche, 1993, Van Tichelen et al., 2001; Schneider et al., 2012). No caso do manganês (Mn) esses estudos ainda são escassos. A predominância da acidez nos solos de regiões tropicais favorece a disponibilidade de Mn, sendo frequente a toxidez, limitando o crescimento de espécies vegetais como o eucalipto (Rosolem & Ferelli, 2000; Soratto et al., 2005). Além disso, pode ser tóxico para as células, alterando a função e atividade de proteínas e, conseqüentemente, das enzimas (Adriano, 2001).

Os mecanismos de tolerância a metais por fungos ectomicorrízicos podem envolver a ligação dos metais a componentes da parede celular, tais como quitina, celulose, derivados de celulose e melanina (Galli et al., 1994; Graziotti et al., 2001), determinadas por proteínas, como por exemplo, metalotioneína, glutatona e fitoquelatinas (Morselt et al., 1986; Hall, 2002; Courbot et al., 2004) e grânulos (Tam, 1995). O micélio fúngico apresenta uma capacidade de retenção de metais devido à sua densidade extraradicular, podendo reduzir a absorção de metais na planta

hospedeira (Brown & Wilkins, 1985; Jones & Hutchinson, 1986; Colpaert & Van Assche, 1992).

Possivelmente, no caso de ECMs, a grande maioria dos metais podem ser translocada para o interior do vacúolo fúngico com gasto de energia (Briskin, 1994). Esta energia é fornecida pelos sistemas primários de transporte de prótons (H^+ -ATPases), localizados na membrana plasmática fúngica, que irão energizar o transporte secundário de H^+ (Hall, 2002). Para o correto funcionamento desta enzima é necessário um mecanismo exato de regulação da mesma, nos quais vários fatores estão envolvidos, principalmente pH ácido e glicose (Portillo, 2000).

Além disso, uma conseqüente tolerância a nível fotossintético poderia ser observada, uma vez que a ECM funciona como um bioacumulador de metal, fator que aliado à ativação dos sistemas de inativação do metal, podem juntos refletir na manutenção da assimilação de CO_2 e síntese de clorofilas. Vários são os relatos de inibição da atividade fotossintética causada por metais em plantas sensíveis, porém, poucos são os estudos abordando interações simbióticas e efeitos dos metais nas trocas gasosas (Hossain et al., 2010; Hossain et al., 2012).

Com base nesse contexto, a hipótese deste trabalho é que a inoculação do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* em mudas de *Eucalyptus grandis* irá permitir uma maior tolerância das plantas de eucalipto ao desenvolvimento em ambientes contaminados por manganês (Mn^{2+}). Para testar esta hipótese foram delineados os seguintes objetivos: (I) avaliar o crescimento *in vitro* do fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* submetido a concentrações de Mn^{2+} sob diferentes doses de glicose; (II) analisar as respostas das enzimas catalase e glutathione S-transferase do fungo ectomicorrízico (III) avaliar as respostas ecofisiológicas e bioquímicas da associação *E. grandis* - *P. Microcarpus* (fase *in planta*), submetidos a diferentes doses de Mn^{2+} ; (IV) determinar a concentração de nutrientes na parte aérea de plantas de *E. grandis* associadas ou não com o fungo *P. microcarpus*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Metais no solo*

Os metais podem ser altamente reativos e bio-acumulativos para alguns organismos, ou seja, o organismo não é capaz de eliminá-los (Bisinoti et al., 2004). A sua presença nos solos pode ter origem natural, dependendo do material de origem sobre o qual o solo se formou dos processos de formação e da composição e proporção dos componentes da fase sólida do solo. A origem antrópica vem sendo discutida como a principal razão do aumento crescente dos metais pesados nos solos, provocando distúrbios muitas vezes de difícil recuperação do ambiente (Abreu et al., 2001).

Os problemas por contaminação de metais pesados de efeito antrópico, tiveram início na idade Média com as atividades mineradoras, mas foi acelerado no início do século XIX com o processamento de metais em usinas químicas e de fundição. Portanto, a atividade industrial aliada ao rápido crescimento populacional contribuiu para um aumento natural na concentração de íons metálicos, passando a representar uma importante fonte de contaminação de solos (Bisinoti et al., 2004). O impacto do excesso dos metais nos ecossistemas tem sido bastante discutido pela possibilidade da contaminação da cadeia alimentar animal.

Os principais metais pesados presentes no solo e nos produtos utilizados na agricultura são Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn e Zn (Abreu et al., 2001). Muitos desses elementos formam complexos estáveis com biomoléculas e sua presença, mesmo em pequenas quantidades, pode causar prejuízos a animais e vegetais. Porém, alguns metais como o cromo, o cobre e o zinco, são importantes componentes funcionais e estruturais dos seres vivos por possuírem como característica a propensão em perder elétrons com facilidade formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos. É na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas (Benite et al., 2007; Bisinoti et al., 2004).

Quando em excesso no solo, esses elementos podem inibir o crescimento das plantas e causar alterações nas comunidades vegetais e de microrganismos (Vangronsveld et al., 1997; Chen et al., 2003), como também exercer efeitos

adversos sobre os microrganismos do solo (Carneiro et al., 2001), interferindo nas funções do ecossistema, com consequências ao meio ambiente e à saúde pública.

O nível de toxicidade em uma planta ou microrganismo depende, geralmente, da concentração dos metais ou do seu papel nos processos bioquímicos (Giller et al., 1998; Hall, 2002). Diversos efeitos tóxicos já foram observados como: ligamento dos metais ao grupo sulfidril das proteínas, levando a uma inibição da atividade ou rompimento da estrutura (Van Assche & Clijsters, 1990; Godbold et al., 1998), bloqueio de enzimas de grupos funcionais de moléculas biologicamente importantes, por exemplo, os sistemas de transporte de nutrientes essenciais e íons (Gadd, 1993), inibição do crescimento da raiz de árvores e queda da integridade das membranas biológicas. Além disso, o excesso de metais pesados pode estimular a formação de radicais livres e espécies reativas do oxigênio (ROS), os quais podem provocar a peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, inativação de enzimas, danos ao DNA e/ou interagir com outros componentes vitais de células (Hall, 2002; Hossain et al., 2012). Esta geração de radicais livres provoca uma resposta do sistema de defesa antioxidante aumentando a atividade de enzimas como a catalase e glutatona, sendo, portanto, consideradas marcadores bioquímicos (Gaete et al., 2010). Sendo assim, o fato dos metais interferirem nos processos metabólicos torna importante a utilização de biomarcadores enzimáticos que respondem imediatamente às modificações ambientais.

Os solos contaminados podem ser remediados por técnicas físicas ou biológicas, agrupadas em duas categorias: ex-“situ”, que requerem a remoção do solo contaminado para tratamento dentro ou fora do local e in-“situ”, que remedia sem a escavação do solo contaminado (Khan et al., 2000). As duas técnicas são muito utilizadas, porém as tecnologias físico-químicas geralmente usadas no processo de descontaminação tornam o solo inútil como meio de crescimento para plantas, uma vez que todas as atividades biológicas do local são removidas, incluindo microrganismos úteis, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos, assim como a fauna existente no local (Wheeler, 1994).

Grandes esforços têm sido feitos para integrar conhecimentos que facilitem a reabilitação de solos poluídos com metais pesados, e assim, possibilitar o retorno da funcionalidade e estabilidade do ecossistema formado (Baker, 1987; Cunningham et al., 1996; Accioly & Siqueira, 2000). Para isto, procura-se amenizar o efeito da fitotoxicidade dos metais no solo, visando ao estabelecimento da vegetação.

2.1.1. Manganês

O manganês encontra-se no solo em concentrações que variam de 20 a 3.000 mg kg⁻¹. É absorvido, principalmente, como Mn²⁺ e translocado como cátion bivalente livre no xilema, a partir da raiz. Em solos tropicais e subtropicais ácidos ocorre uma maior disponibilidade deste elemento, uma vez que esta é reduzida cem vezes com o aumento de uma unidade de pH (Rosolem & Ferelli, 2000). Segundo Abreu et al. (1994), um dos fatores que mais limita o crescimento vegetal em solos ácidos é a toxidez por Mn. A erosão do solo é uma das mais importantes fontes naturais de manganês, porém, diversas fontes antrópicas são responsáveis por sua emissão no solo como lodo de esgoto, resíduos de produtos comerciais, da agricultura e de combustíveis, dejetos urbanos e fertilizantes (Martins & Lima, 2001).

Apesar de o manganês ser um elemento essencial ao desenvolvimento vegetal, sua mobilidade é baixa na planta (Hocking et al., 1977). Possui importante papel na síntese de proteínas, permeabilidade de membranas, absorção iônica, respiração, fotossíntese, controle hormonal (Teixeira et al., 2005), metabolismo do nitrogênio, produção de aminoácidos, hormônios, fenóis e lignina (Melarato et al., 2002). Além disso, o Mn está presente em um polipeptídeo do fotossistema II da proteína envolvida na oxidação da molécula de água (Marengo & Lopes, 2009).

No entanto, em elevadas concentrações este metal pode ser tóxico para a planta limitando o seu desenvolvimento. Altas concentrações de Mn²⁺ inibem a Rubisco e reduzem a nodulação e fixação de N₂ (Marengo & Lopes, 2009). O Mn não afeta diretamente as raízes, mas indiretamente, mediante dano provocado na parte aérea. Entre os sintomas de toxicidade, os quais são mais pronunciados nas folhas, estão clorose marginal e franzimento das folhas, clorose nas folhas mais jovens semelhante à deficiência de ferro e manchas necróticas principalmente nas folhas mais velhas. Apenas em situações severas de toxicidade, as raízes tornam-se de coloração castanha (Soratto et al., 2005).

2.2 *Ectomicorrizas e recuperação de áreas degradadas*

As micorrizas consistem em associações simbióticas mutualistas entre fungos do solo e a maioria das plantas vasculares (Santos, 2006). Cerca de 90% das plantas terrestres formam associações micorrízicas, as quais foram estabelecidas há

mais de 400 milhões de anos e hoje são encontradas em quase todos os habitats no mundo (Kistner & Parniske, 2002; Smith & Read, 1997).

Estas associações foram reconhecidas e tratadas cientificamente somente em meados do século XIX, quando foram publicados os primeiros relatos detalhados da interação entre células radiculares e micélios fúngicos (Matos et al., 1999). Existem dois grupos principais de micorrizas: ectomicorrizas e micorrizas arbusculares. As ectomicorrizas são caracterizadas pelo crescimento intercelular, formando um manto de hifas ao redor da raiz, enquanto as micorrizas arbusculares possuem um crescimento intercelular e intracelular no córtex da raiz.

O estabelecimento da simbiose ectomicorrízica inicia-se pela ativação dos propágulos do fungo (esporos) que germinam e formam um tufo de hifas na rizosfera. Quando as hifas no solo reconhecem uma fina raiz emergindo da planta hospedeira, elas direcionam o seu crescimento em direção a estas raízes e colonizam a sua superfície formando um manto de hifas, cercando-as e isolando-as do solo ao redor. Os pelos das raízes, normalmente formados por células rizodérmicas, são suprimidos pela formação da ectomicorriza (Nehls, 2008). Paralelamente à formação do manto, as hifas fúngicas penetram a raiz infectada através das junções celulares na Zona de Infecção Micorrízica, que se localiza logo atrás da zona meristemática apical da raiz. Após a penetração, as hifas colonizam o córtex intercelularmente, por meio da digestão enzimática da lamela média com ocupação de todo o espaço intercelular, dando origem à rede de Hartig (Figura 1), que é intraradicular ao manto e ao rizomorfo, que são extra-radiculares (Souza et al., 2006).

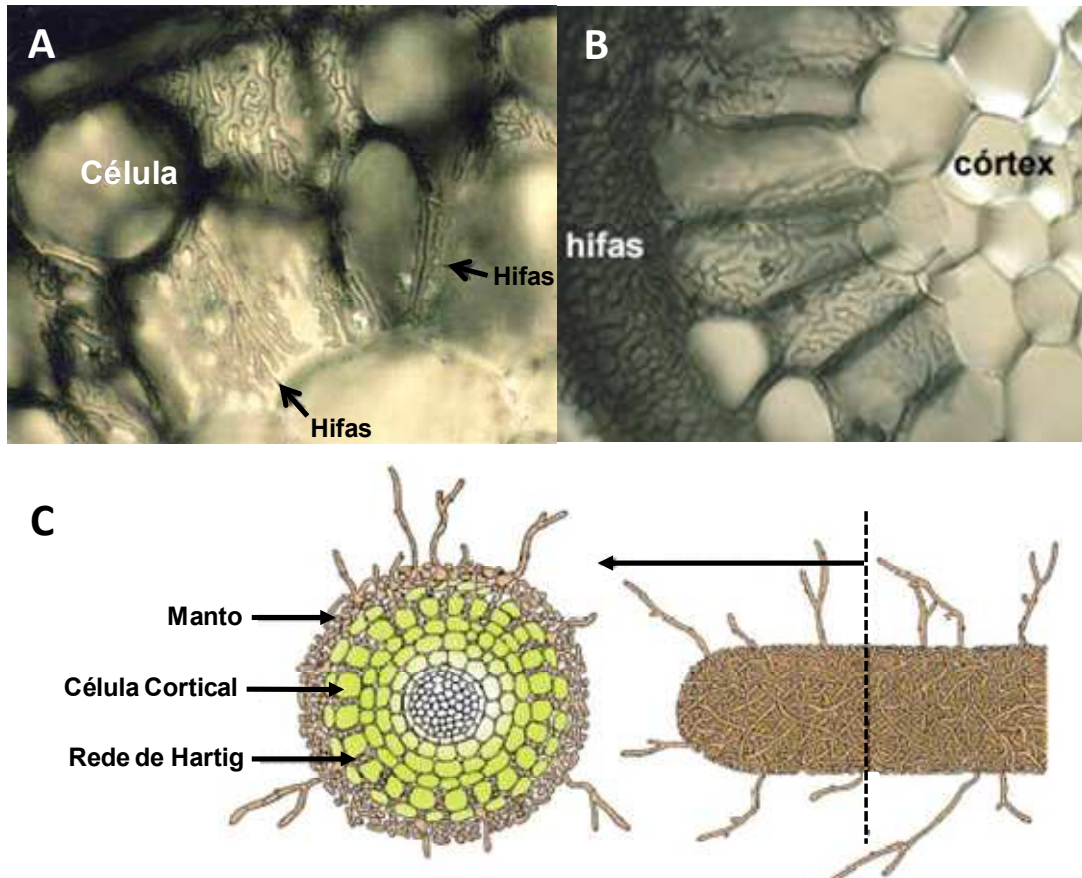


Figura 1. A, B Microscopia da raiz evidenciando a ectomicorriza em *Populus tremuloides* e a formação de Rede de Hartig, manto e hifas intercelulares circundando o córtex radicular (Imagens adaptadas de Apezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2003). C, corte transversal em uma raiz com ectomicorrizas.

As associações ectomicorrízicas possuem um alto grau de especificidade com o seu hospedeiro, sendo este mecanismo governado por uma interação genética entre o fungo e a planta hospedeira. Além disto, a formação de ectomicorrizas no campo depende de vários fatores do ambiente, tais como, disponibilidade de nutrientes, pH do solo, temperatura, disponibilidade de água, aeração, intensidade luminosa, fisiologia da planta hospedeira, interações com os microrganismos do solo, e a toxicidade de certos pesticidas (Santos, 2006).

As ectomicorrizas aumentam a área de absorção radicular, permitindo que nutrientes como P, N e K, e a água, sejam mais bem aproveitados. Portanto, contribuem para o crescimento da planta mesmo em solos pobres em nutrientes e degradados. Além disso, conferem maior resistência ao aumento de temperatura, acidez do solo, estresses hídricos e maior tolerância a patógenos da raiz e substâncias tóxicas presentes no solo (Souza et al., 2004).

Plantas com esse tipo de associação produzem maior quantidade de massa vegetal, além de absorverem e acumularem mais metais em comparação a plantas sem esta interação (Silva et al., 2006). Em programas de recuperação de solos contaminados com vários metais, a introdução de espécies vegetais é uma alternativa promissora principalmente se acoplada aos potenciais de microrganismos bioacumuladores de metais como os fungos micorrízicos (Jones & Hutchinson, 1986; Dixon, 1988; Dixon & Buschena, 1988). Diferenças na tolerância, no ciclo biológico, na rusticidade e na facilidade de estabelecimento em áreas desprovidas de vegetação e seleção de fungos inoculantes específicos são características que podem contribuir para o sucesso da estabilização de plantas em áreas com solos poluídos por metais pesados (Shaw, 1989; Carneiro et al., 2001).

Apesar disso, os fungos ectomicorrízicos podem aumentar a tolerância das plantas a metais tóxicos mesmo em solos com baixo P (Jones & Hutchinson, 1986; Dixon, 1988; Dixon & Buschena, 1988). Eles se diferenciam na sua influência na tolerância ao metal pelo hospedeiro. Podemos afirmar que esta tolerância é baseada numa interação fungo-hospedeiro eficiente, mas para isso uma análise *in vitro* é de crucial importância. Por exemplo, algumas espécies de *Escleroderma* spp. estimulam mais o crescimento do hospedeiro (*Betula papyrifera*) do que *Laccaria laccata* em áreas contendo NiCl (Jones & Hutchinson, 1986). Contudo, o fungo *Pisolithus microcarpus* é muito conhecido pela sua ampla distribuição mundial e ampla diversidade de hospedeiros num ecossistema florestal. Estirpes de *P. microcarpus* podem tolerar amplas faixas de estresses ambientais, incluindo altas temperaturas do solo (Marx, 1991) e presença de altas doses de metais pesados como níquel, cromo e ferro.

Os reflorestamentos no Brasil têm se concentrado em solos com baixas reservas de nutrientes como os solos do Espírito Santo (Sgarbi & Silveira, 2001; Bellote & Ferreira, 1993). No entanto, a aplicação de fósforo tem sido essencial para o aumento e manutenção da produtividade das florestas implantadas, bem como associações biológicas com micorrizas, que podem potencializar o aproveitamento do pouco fósforo disponível nestas áreas (Bellei, 1987; Bellei & Carvalho, 1992).

Sendo assim, a seleção de ectomicorrizas eficientes na promoção do crescimento de mudas de plantas apresenta-se como uma alternativa biotecnológica capaz de promover ganhos na produção e aumento da oferta de madeira, através de produção e uso de inoculantes em programas de controle de micorrização para

reflorestamentos. Além disso, pode auxiliar na redução de uso de fertilizantes fosfatados solúveis nos viveiros e no campo.

2.3 Mecanismos de tolerância a metais em ectomicorriza

Existe uma necessidade crescente de desenvolver técnicas biológicas de remediação, como a fitoremediação, que se trata de plantas com a capacidade de remover, transferir, estabilizar e/ou degradar metais do solo ou a micorremediação, que consiste no uso de fungos micorrízicos para acumulação de metais, evitando que estes sejam absorvidos pelos seus hospedeiros. Utilizando estes métodos de remediação, as propriedades biológicas e a estrutura física do solo são mantidas e além desta técnica ser não impactante, de baixo custo, e visualmente desobstrutiva, ainda oferece a possibilidade de bio-recuperação dos metais (Khan et al., 2000).

Quando se fala em desenvolvimento de fungos ectomicorrízicos em presença de metais, termos como tolerância e resistência são comumente usados, porém 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. Tolerância pode ser definida como a capacidade 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. Entretanto, 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 (biosorção 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).

As micorrizas em geral, e particularmente as ectomicorrizas, já foram testadas e aprovadas em relação ao melhoramento dos efeitos da toxicidade do metal na planta hospedeira, como foi relatado por Silva et al. (2007), cujo trabalho mostrou que mudas de canafístula inoculada com fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* apresentam menor teor de cobre em seu tecido e reduzem a absorção de cobre em dose mais elevada. Plantas colonizadas por isolados fúngicos provenientes de áreas contaminadas apresentam maior crescimento quando

comparadas àquelas colonizadas por isolados de solos não afetados. Contudo, não são todas as associações micorrízicas que conferem estes benefícios (Jones & Hutchinson, 1986).

No entanto, os mecanismos envolvidos em aumentar essa tolerância são diversos e possuem uma alta especificidade entre metais, plantas e fungos (Hartley et al., 1997). Por exemplo, em um estudo feito por Ray et al. (2005), foi testado o nível de tolerância de oito ectomicorrizas em relação a várias concentrações de seis diferentes metais pesados (Al, As, Cd, Cr, Ni e Pb), concluindo que apenas três isolados (*Hysterangium incarcerationum*, *Laccaria fraterna* e *Pisolithus tinctorius*) possuíram tolerância considerável aos metais em questão. Dois fungos ectomicorrízicos *Thelephora terrestris* e *Suillus bovinus* testados por Van Tichelen et al. (2001), protegeram o *Pinus sylvestris* contra a toxicidade do cobre, porém os dois fungos acumularam quantidades diferentes de Cu e demonstraram sensibilidades também diferentes.

Weissenhorn et al. (1994) sugerem que a tolerância pode ser adquirida com maior rapidez quando os fungos já são retirados de regiões contaminadas do que em situações normais de tolerância ao longo do tempo. Segundo os autores, esporos de micorrizas, um ano após o tratamento de exposição ao Cd, mostram-se mais tolerantes à adição de Cd e Zn, comparativamente a esporos provenientes de áreas não contaminadas.

É possível que a proteção das ectomicorrizas contra os metais pesados seja devido ao manto formar uma barreira física impedindo a absorção dos metais pela planta hospedeira (Khan et al., 2000). Também existem os mecanismos biológicos, os quais incluem processos de precipitação extracelular, biossorção da parede celular através de troca iônica, adsorção, complexação e cristalização, e processos internos nas células dos fungos, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados (Gadd, 1993). Todos estes mecanismos estão resumidos na Figura 3.

A parede celular do fungo possui uma importante propriedade de proteção, pois controla a absorção dos solutos na célula, incluindo metais potencialmente tóxicos, e também afeta, indiretamente, a composição iônica intracelular pelo fato de restringir a água celular (Gadd, 1993). Muitos produtos fúngicos extracelulares podem complexar ou precipitar os metais. O ácido cítrico pode ser um eficiente quelante metal-íon, e o ácido oxálico pode interagir com os metais na sua forma

iônica e formar insolúveis cristais de oxalato ao redor da parede celular e no meio externo (Murphy & Levy, 1983; Sutter et al., 1983).

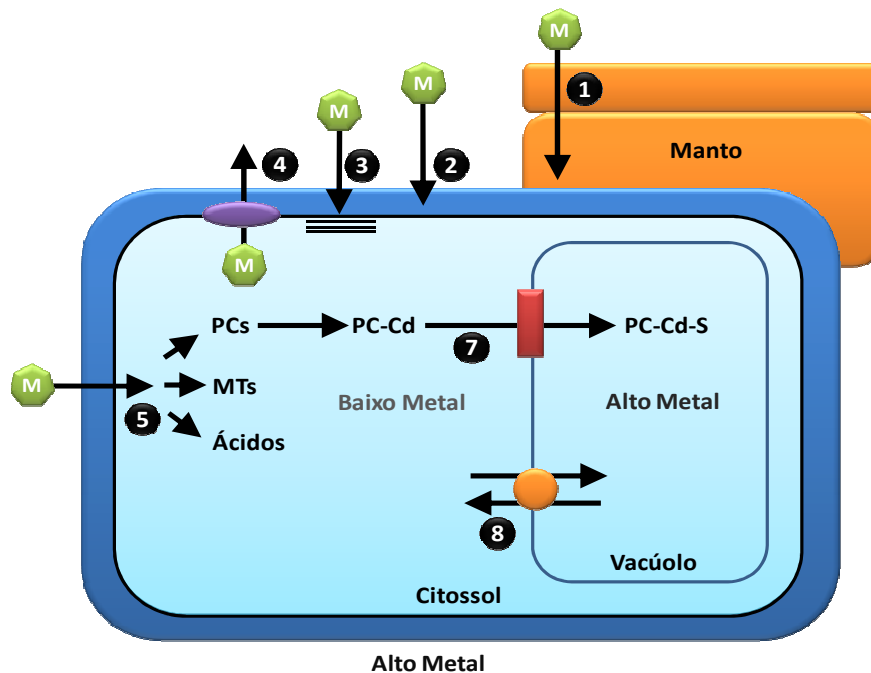


Figura 2. Resumo dos potenciais mecanismos de detoxificação dos metais pesados em uma célula fúngica. Manto atuando como uma barreira física (1), biosorção da parede celular (2), diminuição do fluxo através da membrana plasmática (3), efluxo dos metais através de proteínas de membrana (4), quelação dos metais no citosol por compostos como fitoquelatinas, metalotioneínas ou ácidos (5), transporte do complexo PC-metal para dentro do vacúolo (7) e transporte e acumulação dos metais no vacúolo (8). Adaptado de Hall, 2002.

A produção de pigmentos extracelulares como melaninas tem sido considerada o principal mecanismo de precipitação extracelular de metais pesados. As melaninas são pigmentos de alto peso molecular, marrom-escuros ou pretos formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Fogarty & Tobin, 1996). Além disso, possuem grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos e aminas, os quais fornecem muitos sítios potenciais para ligação ou bioadsorção dos metais (Gadd & De Rome, 1988; Gadd, 1993). Em fungos, estas estão localizadas na parede celular ou como polímeros extracelulares. Graziotti et al., (2001) confirmando tal fato, demonstrou que um isolado de *Pisolithus tinctorius* teve sua produção de pigmentos extracelulares aumentada com a adição de solo

contaminado ao meio de cultura, e esta produção foi máxima na mistura próxima àquela em que ocorreu a produção máxima de micélio.

O transporte de metais na membrana plasmática acontece devido a presença de proteínas de membrana, sendo a H⁺-ATPase e a V-ATPase as principais. O mecanismo de ação da H⁺-ATPase (detalhado anteriormente) consiste no bombeamento de prótons do interior para o exterior da célula. Os prótons bombeados retornam ao meio intracelular através de proteínas carreadoras e juntamente a eles, através do co-transporte, os metais entram na célula. No citosol ocorre a quelação dos metais por ligantes de alta afinidade, os quais podem ser aminoácidos, ácidos orgânicos e duas classes de peptídeos, as fitoquelatinas e as metalotioneínas (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Em seguida o complexo metal-quelante é transportado em direção ao vacúolo, onde a V-ATPase também gera um gradiente de prótons possibilitando a entrada deste complexo no vacúolo, por meio de um transporte do tipo antiporte. No interior deste compartimento o metal é acumulado (Hall, 2002).

Dessa forma, estudos de tolerância a metais devem ser feitos, tanto com isolados de fungos provenientes de áreas contaminadas por metais, como, ainda, com isolados não expostos a suas altas concentrações para resolver contradições. Existe um potencial no estudo e utilização de fungos micorrízicos na tolerância de plantas ao excesso de metais. A ideia de que a associação simbiótica está relacionada com a tolerância ao excesso de metais é uma hipótese deslumbrante e que se faz necessário um melhor entendimento.

2.4 Micorriza em eucalipto

Uma das culturas mais importantes do Brasil é a cultura de eucalipto, a qual estabelece fonte de energia e madeira renovável (Masson et al., 2011). No Estado do Espírito Santo é uma essência florestal muito cultivada devido ao seu crescimento rápido e de rendimento econômico significativo na produção de madeira e celulose (Rezende et al. 1994; Santos et al., 2001).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Silvicultura (2009), a demanda de madeira no Brasil chega a cerca de 350 milhões de m³ ano⁻¹, o que equivale a 8% do consumo mundial. Dentre os 2,9 milhões de hectares de florestas plantadas no país,

55% da área total é ocupada pela espécie *Eucalyptus grandis*, e a maioria dos plantios está localizado nas regiões sul e sudeste do país.

As espécies de eucalipto têm a capacidade de formar associação tanto com micorrizas arbusculares quanto com ectomicorriza. Porém, a interação ectomicorriza é predominante (Zambolin & Barros, 1982).

Muitos são os gêneros de fungos micorrízicos capazes de formar associação com plantas. Entretanto, existem diferentes graus de especificidade fungo-planta existindo uma compatibilidade diferenciada entre as espécies de fungos micorrízicos do solo e as variações nas características genéticas do hospedeiro determinando, dessa forma, sua dependência micorrízicas. Para a maioria das espécies de *Eucalyptus* spp. os gêneros mais comumente encontrados na interação são *Pisolithus* spp. e *Scleroderma* spp. (Barros et al., 1978; Campos et al., 2011). Segundo Campos et al. (2011), a idade do plantio e o tipo de manejo das plantas de eucalipto influenciam diretamente na colonização micorrízicas e na diversidade de fungos ECMs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Material biológico e especiação do meio de cultura*

O isolado fúngico ectomicorrízico 24 (*Pisolithus microcarpus*) foi obtido da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Discos de ágar contendo micélio do ECM *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) foram inoculados em placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultura MNM-*Melin Norkrans* modificado (Marx, 1969).

No preparo do meio MNM, foram adicionados os seguintes reagentes para 1L: CaCl_2 (0,05g/L), NaCl (0,025g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,15g/L), FeCl_3 (1g/L); e 4mL de KH_2PO_4 (0,125g/L) e tiamina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10g de ágar-ágar, 10g de glicose, 3g de extrato de malte e 0,055mg de cloranfenicol a fim de evitar o crescimento de bactérias. Em seguida, ajustou-se o pH para 5,6. Após autoclavagem à 121° C por 30 minutos, verteu-se 25 mL de meio em placas de Petri (10 x 100 mm) em câmara de fluxo laminar vertical, as quais foram incubadas na ausência de luz, à temperatura de 25 \pm 1°C em incubadora BOD. Transferências quinzenais para meio fresco de igual composição foram realizadas.

A análise da especiação iônica de nutrientes e dos metais manganês, em meio MNM, foi realizada através do programa Visual MINTEQ versão 2.53, adaptado por Ramos et al. (2009). Com estas análises estimou-se com maior precisão a biodisponibilidade dos nutrientes, inclusive dos metais presentes no meio de crescimento do fungo ectomicorrízico. Por meio destas análises, obteve-se a porcentagem de biodisponibilidade de cada nutriente e de Mn^{2+} , pois a composição do mesmo oscilava com a dose de metal estudada.

3.2 *Experimento in vitro do crescimento do fungo Pisolithus microcarpus*

Micélios de 11 mm de diâmetro foram retirados das extremidades de culturas puras de *P. microcarpus* (isolado 24) com 25 dias de idade e transferidos para novas placas de Petri (um disco centralizado na placa de Petri) contendo 25 ml de meio MNM especiado para as doses de metal: 0, 50, 100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{Mn}^{2+}$

na forma de $MnCl_2$, sob três status de glicose (0,1; 1 e $10g L^{-1}$). Foi adicionada uma baixa concentração de tampão MES $100 \mu mol L^{-1}$, de forma a remover os efeitos das variações no pH do meio como uma variável adicional e, assim, mascarando os resultados. O pH do meio MNM foi ajustado para 5,5 - 5,6. O crescimento micelial radial foi medido com auxílio de um paquímetro digital, durante 25-30 dias de crescimento.

3.3 Análise da associação eucalipto-fungo sob doses de Mn^{2+}

Sementes de *Eucalyptus grandis*, obtidas no Departamento de Silvicultura da Universidade Federal de Viçosa, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 10% (v/v) durante 15 min, álcool 70% por 3 min, lavadas com água deionizada e, posteriormente, semeadas em uma bandeja plástica estéril contendo apenas areia esterilizada.

O plantio e inoculação foram realizados em substrato areia-vermiculita (1:1), devidamente autoclavados e distribuídos em vasos de 500 ml. Plântulas de eucalipto, selecionadas e uniformizadas por tamanho, foram inoculadas com o fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* de acordo com o método sanduíche, com o qual discos de micélio fúngicos são colocados em contato direto com a raiz da plântula. O experimento foi montado no delineamento experimental inteiramente casualizado e consistiu de dois tratamentos microbiológicos (inoculado e não inoculado), três doses de metal e 5 repetições. As plantas foram regadas com solução de metal, pH 5,6, contendo as doses de 200 e $1000 \mu M$ de Mn^{2+} na forma de $MnCl_2$, duas vezes por semana, e solução de Clark diluída 4X foram aplicadas nos tratamentos três vezes por semana.

Aos 90 dias de inoculação, foi medida a altura das plantas e coletada a parte aérea, que foi posteriormente colocada em estufa de secagem a $60 ^\circ C$ e feito o peso seco.

3.4 Parâmetros fotossintéticos

A taxa fotossintética líquida (assimilação fotossintética do carbono) foi determinada por meio do sistema portátil de medição das trocas gasosas, modelo LI-

6200 (LI – COR, Lincoln, NE, USA). Para isso, foi utilizada uma câmara de 0,25 L, com área foliar de medição de aproximadamente 6,8 cm². Utilizou-se um aparelho com analisador de gás no infravermelho LI-6200 (Licor, NE, USA), com um conjunto de lâmpadas tipo LED (“light emitting diode”) acoplado à superfície da câmara do IRGA, possibilitando a obtenção de um fluxo de fótons fotossintéticos de 500 μmol m⁻²s⁻¹, sem aquecimento do tecido foliar.

3.5 Análise de nutrientes da parte aérea

A análise de nutrientes da parte aérea foi realizada somente aos 90 dias após o plantio. O conteúdo de N, P, K, Ca e Mg na parte aérea foi determinado depois que as amostras foram desidratadas em estufa de ventilação forçada, a uma temperatura de cerca de 75 °C, por 48 horas (Malavolta et al., 1989). Uma vez desidratado, o material foi pesado para determinação da matéria seca e, em seguida, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey, passadas em peneira de 20 “mesh” e armazenadas em frascos hermeticamente fechados. Após submeter o material vegetal à oxidação pela digestão sulfúrica, foi determinado o fósforo por colorimetria pelo método do molibdato (Malavolta et al., 1989), N pelo método de Nessler (Jackson, 1965), K por espectrofotometria de emissão de chama e Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica, de acordo com as metodologias do Manual de Análises de Solo e Plantas (EMBRAPA, 1997).

A quantidade total de nutrientes acumulada em cada parte analisada foi avaliada com base no teor obtido e na produção de material seco. A eficiência micorrízica foi calculada com base na massa de material seco total (MStotal = MSPA + MSR) segundo a fórmula:

$$\text{Eficiência Micorrízica (\%)} = \frac{[(\text{MStotal planta micorrizada} - \text{MStotal planta-controle}) / (\text{MStotal planta-controle})] \times 100}{1}$$

3.6 Porcentagem de colonização micorrízica

Aos 90 dias avaliou-se o grau de colonização micorrízica das raízes de eucalipto, determinada pelo método da interseção em placas de Petri reticuladas,

como descrito por Giovannetti e Mosse (1980), após coloração com azul de tripano, conforme técnica descrita por Phillips e Hayman (1970).

3.7 Determinação de proteínas totais de *Pisolithus microcarpus* e raízes de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas e em associação ectomicorrízica

A proteína foi quantificada segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Sigma A9418) ($f=889$), à 660 nm. Todas as determinações foram desenvolvidas em triplicatas.

3.8 Determinação da catalase em *Pisolithus microcarpus* e raízes de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas e em associação ectomicorrízica

Para a determinação da catalase, o micélio do fungo *P. microcarpus* e as raízes das plantas de *E. grandis* micorrizadas e não micorrizadas foram homogeneizados em 50 mM tampão TRIS-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA, e centrifugados a 15.000 x g, durante 15 minutos a 4° C. A atividade da CAT foi determinada segundo método descrito por Beutler (1975). O meio de reação, 1 mL, continha 40 mM tampão TRISHCl, pH 8,0 com 5 mM de EDTA e 12 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A reação foi iniciada pela adição de 10 µL do extrato bruto. O consumo do substrato foi acompanhado, durante 30 segundos, à 240 nm. A atividade de CAT foi expressa em porcentagem de estimulação em relação ao controle.

3.9 Determinação da glutathione S-transferase em *Pisolithus microcarpus* e raízes de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas e em associação ectomicorrízica

Para a determinação da glutathione S-transferase, o micélio do fungo *P. microcarpus* e as raízes das plantas de *E. grandis* micorrizadas e não micorrizadas foram homogeneizados em 20 mM tampão de fosfato de potássio, pH 6,5, e centrifugados a 15.000 x g durante 15 minutos a 4° C. A atividade da GST foi

determinada segundo método definido por Habig et al. (1974). A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de extrato enzimático em meio de reação contendo 20 mM tampão fosfato de potássio pH 6,5, 80 mM de glutathiona reduzida (GSH) (Sigma G6529) e 20 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma C237329). A atividade enzimática foi acompanhada pela formação do produto à 340 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade de GST foi expressa em porcentagem de estimulação em relação ao controle.

3.10 Análise dos dados

Com as medidas obtidas foram realizadas análises prévias com Excel 2007 for Windows e as diferenças do crescimento entre o controle e as doses de metais em todos os experimentos foram analisados pelos testes ANOVA e Duncan ($p < 0.05$) utilizando o programa STATISTICA (versão 5.5, STATSOFT, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Biodisponibilidade dos nutrientes no meio de cultura

De acordo com a especiação feita através do programa Visual MINTEQ foi possível obter uma alta biodisponibilidade de Mn^{2+} (entre 70% e 90%) e dos macro e micronutrientes (em torno de 90% a 100%) (Tabela 1). Para tal resultado ser atingido foi necessário fazer um ajuste nos nutrientes do meio MNM. Neste caso, foram reduzidas as concentrações de fosfato e ferro, pois estes íons estão em elevada concentração no meio de cultura e reagem fortemente com o metal presente no meio, formando ligações estáveis e fazendo com que a forma livre deste fosse reduzida. A partir da especiação foi possível obter a concentração estimada dos nutrientes e do metal no meio de cultura adaptado para este trabalho.

Tabela 1. Concentração iônica e estimativa de biodisponibilidade (%) de Mn^{2+} no meio MNM ajustado para os estudos de crescimento de fungos ectomicorrízico.

		Mn^{2+}	H_2PO_4	SO_4^{-2}	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	Cl^-
Meio MNM	Controle	0	2.23	0.61	0.918	0.38	0.61	0.42	1.38
	50 μM	0.05	2.23	0.61	0.918	0.38	0.61	0.42	1.48
	100 μM	0.1	2.23	0.61	0.918	0.38	0.61	0.42	1.58
	200 μM	0.2	2.23	0.61	0.918	0.38	0.61	0.42	1.78
	500 μM	0.5	2.23	0.61	0.918	0.38	0.61	0.42	2.38
	1000 μM	1.000	2.23	0.61	0.918	0.38	0.61	0.42	3.38
Estimativa de Biodisponibilidade (%)	Controle	0.00	90.81	91.81	99.26	89.4	90.66	99.31	99.71
	50 μM	87.52	90.55	90.48	99.26	89.5	92.65	99.30	99.47
	100 μM	87.59	90.29	90.16	99.26	89.6	92.72	99.31	99.21
	200 μM	87.54	89.79	89.54	99.26	89.7	92.78	99.30	98.73
	500 μM	88.14	88.47	88.10	99.23	90	89.98	99.27	97.47
	1000 μM	88.73	86.35	85.50	99.25	90.4	93.14	99.29	95.31

4.2 Interações entre as concentrações de Mn^{2+} e o status de glicose em *Pisolithus microcarpus in vitro*

Após 25 dias de crescimento do fungo *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) foi observado que em todas as concentrações de glicose (0,1; 1 e 10 g L⁻¹) não houve uma diferença significativa no crescimento do fungo entre as doses de Mn^{2+} utilizadas (Figura 3). Porém, o crescimento foi estimulado pela presença deste metal, principalmente na concentração mais alta de glicose. Na medida em que se aumenta a concentração de glicose, observa-se um maior crescimento de micélio fúngico

(Figura 3 e 4). Simultaneamente, ocorre um aumento na pigmentação do mesmo com o incremento da concentração de glicose (Figura 3).

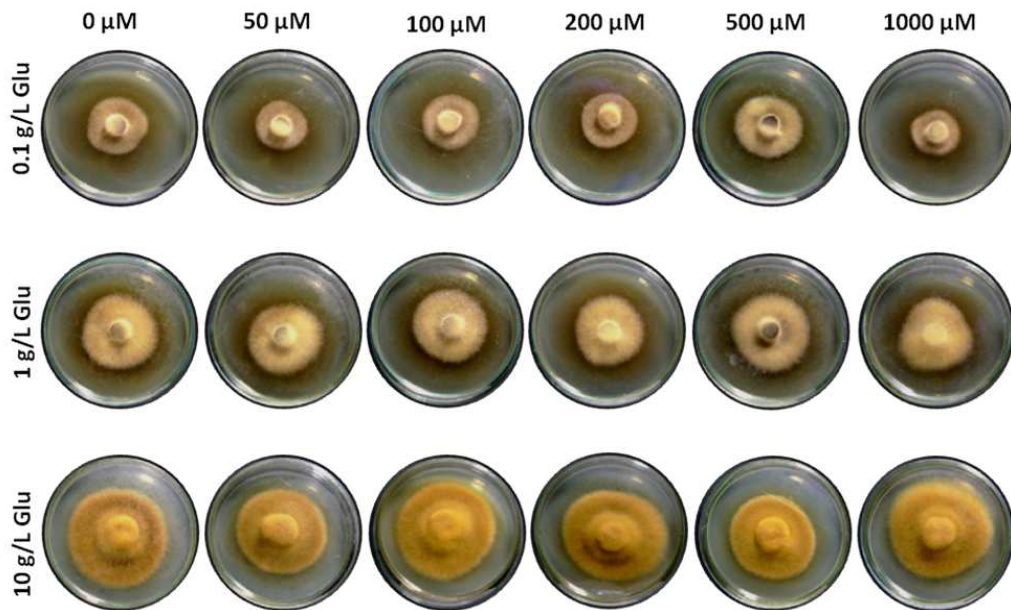


Figura 3. Efeito do manganês no crescimento do fungo *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) em meio sólido contendo três diferentes status de glicose.

Na concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, em todas as doses do metal houve inibição do crescimento fúngico (Figura 4, Tabela 2), mas apenas na dose $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$ a inibição foi significativa, quando comparada ao controle ($p=0,0008$). Em 1 g L^{-1} de glicose houve inibição não significativa ($p=0,13$; $p=0,27$ $p=0,33$; $p=0,15$) em todas as doses de Mn^{2+} , exceto na dose de 200 e $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$, onde ocorreu um estímulo em relação ao controle, no entanto, este não foi considerado significativo ($p=0,0752$) (Figura 4, Tabela 2)

Na concentração de 10 g L^{-1} de glicose ocorreu estímulo do crescimento fúngico em todas as doses de Mn^{2+} (Figura 4, Tabela 2), porém este não foi estatisticamente significativo quando comparado ao controle em todas as doses do metal ($p=0,78$). Este fato demonstra uma tolerância do fungo *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) ao manganês em altas concentrações de glicose.

Tabela 2. Porcentagem de inibição (-) ou estimulação (+) no crescimento de *Pisolithus microcarpus* PT 24 em 6 doses de Manganês (Mn^{2+}) sob três concentrações de glicose. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Glicose ($g L^{-1}$)	Dose de Mn^{2+} (μM)					
	0	50	100	200	500	1000
0.1	0	-11,87	-14,17	-6,25	-13,12	-26,87**
1	0	-4,25	-3,72	+6,38	+2,66	-3,72
10	0	+3,98	+5,00	+11,50	+2,21	+6,63

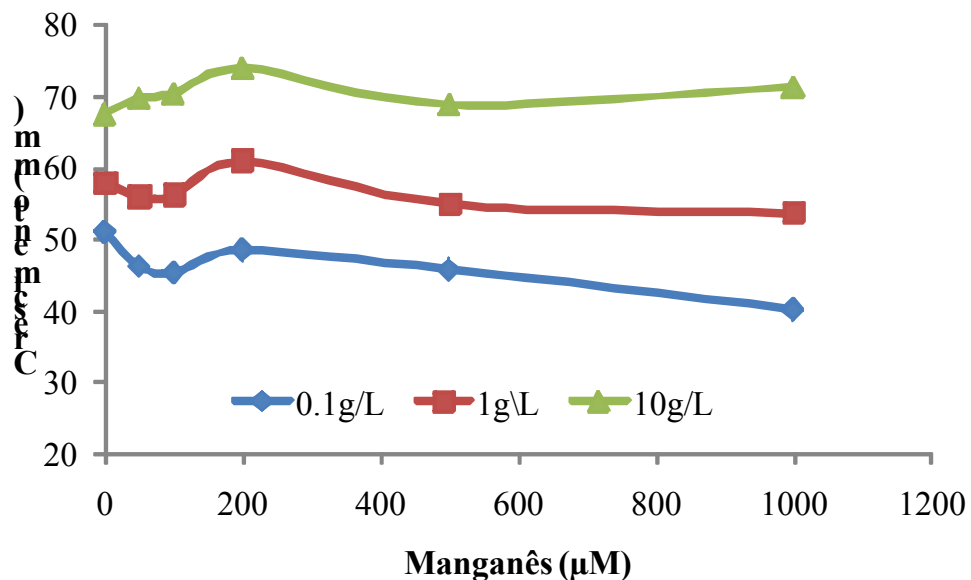


Figura 4. Médias do diâmetro micelial de *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) em meio de cultura sólido contendo doses crescentes de Mn em 0,1, 1 e 10 $g L^{-1}$ de glicose.

4.3 Análise de enzimas oxidativas do fungo *Pisolithus microcarpus* in vitro submetido a doses de Mn^{2+}

A porcentagem de estimulação da atividade da catalase em relação ao controle (sem adição de Mn^{2+}) foi positiva em todas as doses de Mn^{2+} e glicose (Figura 5). Na dose de 1000 $\mu M Mn^{2+}$, nas concentrações de 0,1 e 1 $g L^{-1}$ de glicose,

houve uma estimulação na atividade da catalase inferior à observada na dose de 200 $\mu\text{M Mn}^{2+}$. Entretanto, na maior concentração de glicose (10 g L^{-1}) a porcentagem de estimulação na atividade da catalase é significativamente superior na maior dose do metal ($p=0.021$; Figura 5).

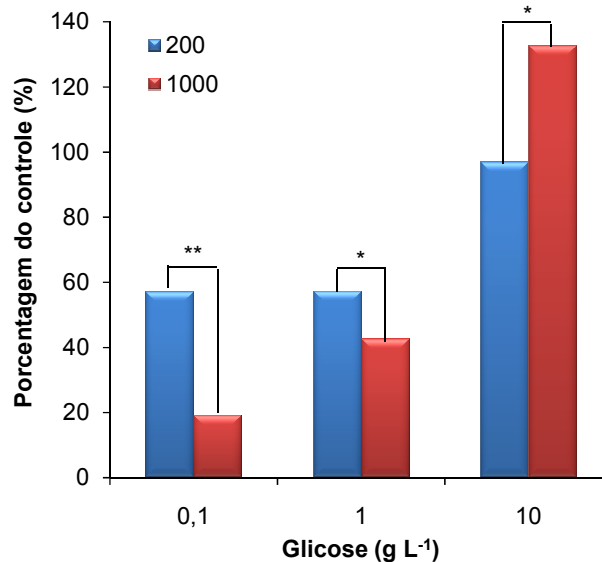


Figura 5. Porcentagem de estimulação da atividade da catalase no micélio de *Pisolithus microcarpus* crescendo sobre duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) e três doses de glicose (0,1, 1 e 10 g L^{-1}). (* $p<0.05$; ** $p<0,001$).

Em relação aos resultados com a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST), foi observado uma significativa estimulação na sua atividade na dose de 1000 $\mu\text{M Mn}^{2+}$, nas concentrações de 1 e 10 g L^{-1} (Figura 6). Portanto, ambas CAT e GST foram fortemente ativadas na presença da maior dose de $\mu\text{M Mn}^{2+}$ (Figura 6). Quando o micélio fúngico foi submetido à baixa concentração de glicose (0,1 g L^{-1}), foi observado um estímulo na atividade de GST, porém estatisticamente não significativo (Figura 6).

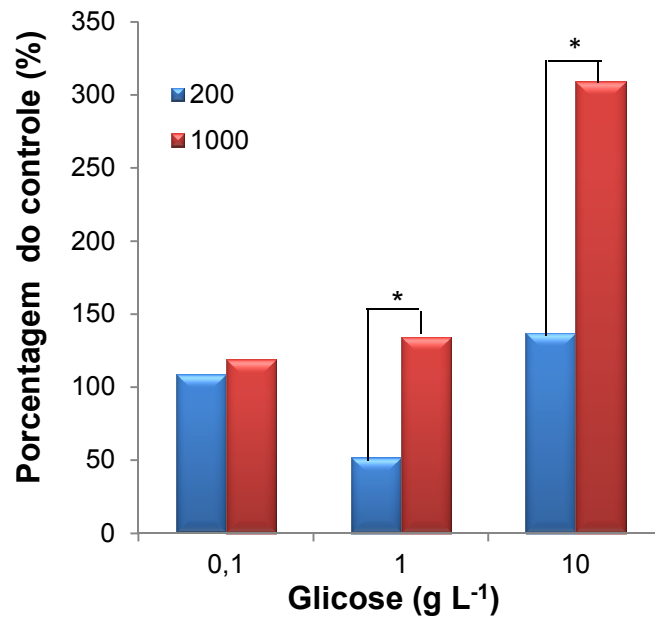


Figura 6. Porcentagem de estimulação da atividade da glutathione-S-transferase no micélio de *Pisolithus microcarpus* crescendo sobre duas concentrações de Mn²⁺ (200 e 1000 μM) e três doses de glicose (0.1, 1 e 10g L⁻¹). (* p<0.05; **p<0,001).

4.4 Aspectos de crescimento, assimilação de CO₂, eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação das plantas de eucalipto ectomicorrizadas submetidas à doses de Mn²⁺

Os resultados apresentados na Figura 7 revelam as respostas de crescimento de plantas de eucalipto cultivadas em solo contaminado por Mn²⁺ na presença do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (isolado 24), as quais apresentaram diferenças significativas em todas as doses de Mn²⁺. Houve efeito significativo das doses de Mn²⁺ sobre os parâmetros de altura e peso da matéria seca da parte aérea (Figura 7A, 7B).

Plantas ectomicorrizadas apresentaram maior crescimento em todos os tratamentos, principalmente quando submetidas às concentrações de 200 e 1000 μM Mn²⁺ (Figura 7A). Nas plantas não micorrizadas não foi detectado diferença significativa entre as doses 0, 200 e 1000 μM de Mn²⁺ (Figuras 7A, 8). Na Figura 8 pode-se observar que em todos os tratamentos, inclusive no controle sem a adição de Mn²⁺, que as plantas com associação ectomicorrízica mostraram-se maiores e mais vistosas, além de não demonstrarem sinais de deficiência ou toxidez. As plantas

não micorrizadas quando submetidas às concentrações de Mn^{2+} apresentaram coloração arroxeadada, menor crescimento e peso da matéria seca da parte aérea (Figura 8).

Os resultados obtidos com a matéria seca da parte aérea das plantas de *Eucalyptus grandis* correlacionam-se positivamente à altura, em que plantas inoculadas com *P. microcarpus* apresentaram valores de peso da matéria seca da parte aérea significativamente superiores aos de plantas não inoculadas (Figura 7).

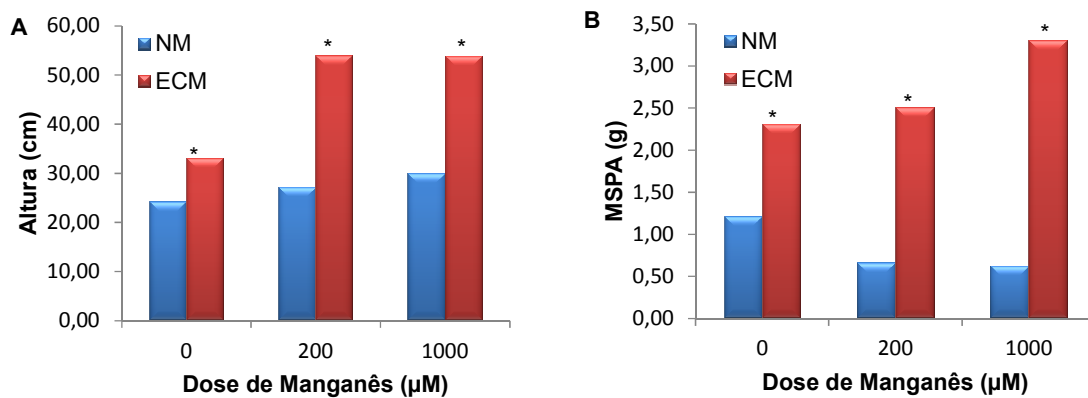


Figura 7. Altura média (cm) (A) e peso da matéria seca da parte aérea (B) das plantas de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas (NM) e em associação simbiótica com o fungo *Pisolithus microcarpus* (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) (* $p < 0,05$).



Figura 8. Visão geral do experimento *in vitro* de plantas de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas (NM) e em associação simbiótica com o fungo *Pisolithus microcarpus* (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM).

A análise do conteúdo de nutrientes na parte aérea das plantas de eucalipto não micorrizadas e ectomicorrizadas revelou que o conteúdo de Mn apresentou aumento de acordo com o incremento da concentração do metal (200 e 1000 μM de Mn^{2+}) tanto em plantas não micorrizadas quanto em plantas ectomicorrizadas. Entretanto, plantas associadas ao fungo *P. microcarpus* apresentaram valores significativamente maiores em todas as concentrações de Mn. Mesmo sem a adição de Mn no substrato, foi possível observar considerável conteúdo deste metal na parte aérea das plantas micorrizadas ou não (Tabela 3).

O maior conteúdo de fósforo (P) foi encontrado na parte aérea de plantas ectomicorrizadas, principalmente nas doses de 200 μM e 1000 μM Mn^{2+} , enquanto as plantas não micorrizadas apresentaram uma queda linear nos valores deste elemento de acordo com o incremento de metal no substrato (Tabela 3).

Nas plantas não micorrizadas foi observado que o aumento no conteúdo de Mn^{2+} na parte aérea, em função das doses aplicadas, se correlaciona com significativos decréscimos no conteúdo de outros nutrientes analisados como: Nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e boro (B) (Tabela 4). Por outro lado, nas plantas ectomicorrizadas foi observado significativos incrementos no conteúdo dos nutrientes, exceto para o Fe, que apresentou um menor conteúdo, e B que não teve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo de nutrientes na parte aérea de plantas *Eucalyptus grandis* não micorrizadas (NM) e em associação simbiótica com o fungo *Pisolithus microcarpus* (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) 90 dias após a inoculação.

	Nutrientes									
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
Concentração de Mn^{2+} (μM)	g planta ⁻¹					mg planta ⁻¹				
0	51.12	2.41	47.46	26.03	16.70	2.33	0.10	0.17	3.43	0.13
200	22.32	0.81	23.17	19.57	7.45	0.29	0.06	0.07	4.87	0.06
1000	14.35	0.65	16.40	16.88	4.41	0.34	0.05	0.10	4.44	0.05
0	84.99	5.03	42.99	66.26	18.40	2.49	0.11	0.25	1.18	0.18
200	130.39	6.20	56.57	85.35	30.16	1.76	0.19	0.33	12.37	0.20
1000	133.42	5.22	51.58	76.59	26.33	2.08	0.15	0.36	16.81	0.22

Nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn) e boro (B)

Para a realização do cálculo de conteúdo de Mn^{2+} na parte aérea de plantas, são utilizados os valores de teor apresentados na Tabela 4. Diferindo do conteúdo, o teor de Mn^{2+} em plantas de eucalipto ectomicorrizadas foi inferior ao teor de plantas não micorrizadas em todas as concentrações de Mn^{2+} as quais foram submetidas.

Tabela 4. Teores e conteúdos médios de nutrientes na parte aérea de plantas *Eucalyptus grandis* não micorrizados (NM) e micorrizadas com *Pisolithus microcarpus* (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM) 90 dias após a inoculação. Letras maiúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (NM ou ECM) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de Mn^{2+}

Trat.	[Mn^{2+}] (μM)	Teor	Conteúdo
NM	0	281,17 B	1,18 B
	200	815,66 A	4,87 A
	1000	797,93 A	4,44 A
ECM	0	164,41 B	3,43 C
	200	469,19 A	12,37 B
	1000	513,50 A	16,81 A

A maior taxa de assimilação líquida do carbono (A) foi obtida nas plantas de eucalipto submetidas a concentração de 200 μM Mn^{2+} (Figura 9A). Nesta concentração, plantas ectomicorrizadas e não micorrizadas apresentaram taxas fotossintéticas, de 6,422 e 4,715 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, respectivamente. Porém, as plantas ectomicorrizadas submetidas à concentração de 200 μM Mn^{2+} apresentaram valores de A significativamente superiores às plantas sem a associação na mesma concentração do metal (Figura 9A). As plantas controles, ou seja, sem adição de Mn^{2+} , e as que foram submetidas a maior concentração do metal (1000 μM de Mn^{2+}) não apresentaram diferença significativa entre as plantas micorrizadas e sem esta associação.

Da mesma forma que observado na assimilação do CO_2 (A), a eficiência do uso da água (A/E) também apresentou diferenças significativas nas plantas de eucalipto submetidas à concentração de 200 μM de Mn^{2+} (Figura 9B). Nesta

concentração, plantas ectomicorrizadas e não micorrizadas apresentaram valores de A/E (Figura 9B). Entretanto, as plantas ectomicorrizadas que receberam as doses de $1000 \mu\text{M Mn}^{2+}$ apresentaram uma maior e significativa eficiência no uso da água ($518,644 \mu\text{mol mmol}^{-1}$) quando comparadas à plantas sem a associação simbiótica submetidas à mesma concentração do metal ($234,427 \mu\text{mol mmol}^{-1}$) (Figura 9B).

A eficiência de carboxilação (A/C_i) foi superior nas plantas de eucalipto submetidas a concentração de $200 \mu\text{M Mn}^{2+}$ (Figura 9C). Nesta concentração, plantas ectomicorrizadas e não micorrizadas apresentaram valores de A/C_i , respectivamente, de $0,019$ e $0,014 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$. Contudo, as plantas ectomicorrizadas submetidas à concentração de $200 \mu\text{M}$ de Mn^{2+} apresentaram valores significativamente superiores às plantas sem a associação na mesma concentração do metal. As plantas sem adição de Mn^{2+} , e as que foram submetidas a $1000 \mu\text{M}$ do metal não apresentaram diferença significativa entre as plantas ectomicorrizadas e não micorrizadas (Figura 9C).

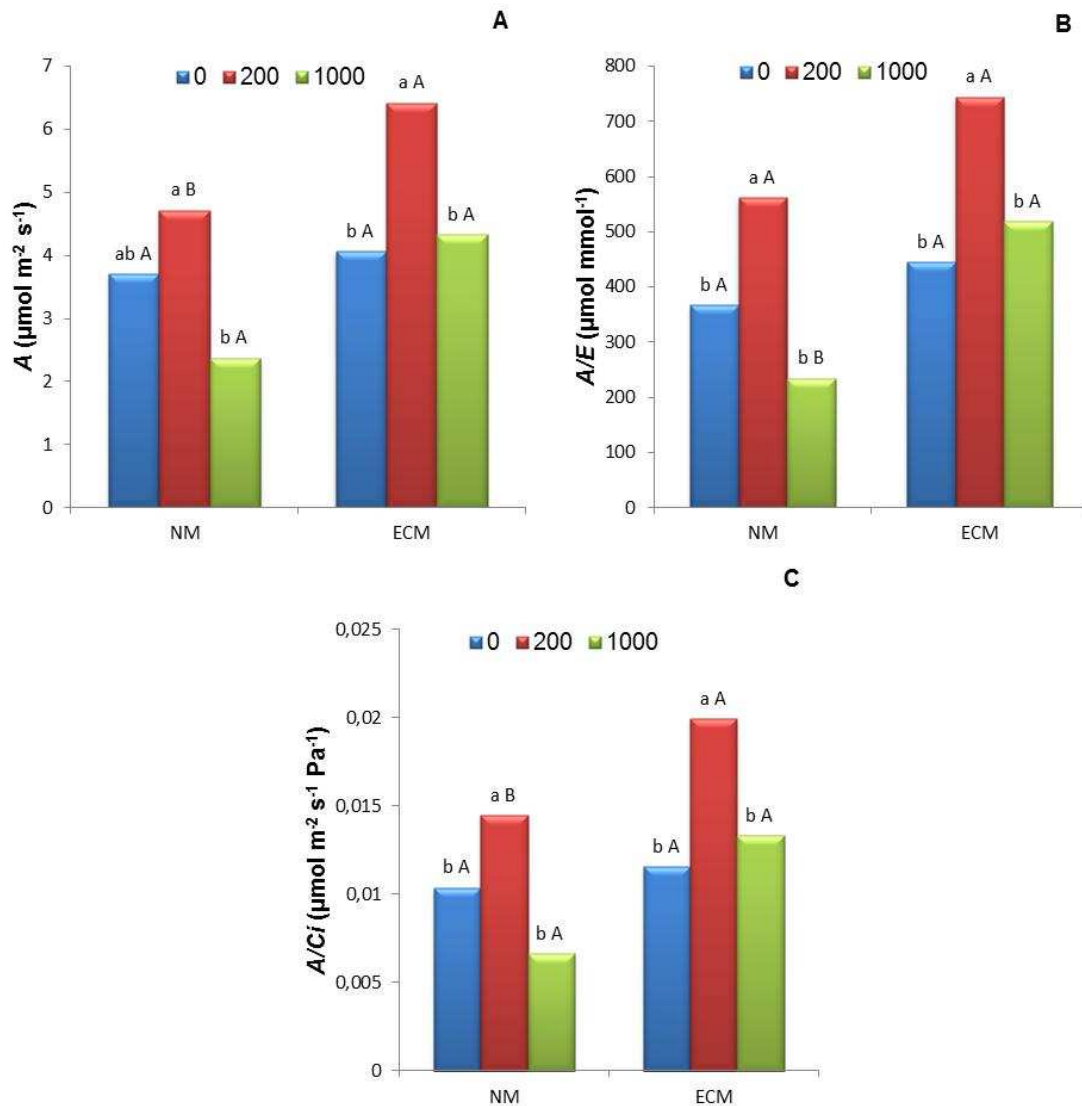


Figura 9. Trocas gasosas em folhas de eucalipto *Eucalyptus grandis* aos 90 dias após o plantio não micorrizados (NM) e em associação simbiótica com o fungo *Pisolithus microcarpus* (ECM) submetidas a duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM). Fotossíntese líquida (A), eficiência do uso da água (B) e eficiência de carboxilação (C). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (NM ou ECM) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de Mn^{2+} e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (NM ou ECM) na mesma concentração de Mn^{2+} .

Com base nos cálculos da eficiência micorrízica das plantas de eucalipto, foi possível observar uma porcentagem significativamente superior quando as plantas foram submetidas às doses de Mn. Sem a adição de Mn^{2+} as plantas obtiveram uma

eficiência de 47,38%, enquanto nas doses de 200 μM e 1000 Mn^{2+} , a eficiência foi de 278,04 e 427,50%, respectivamente (Figura 10).

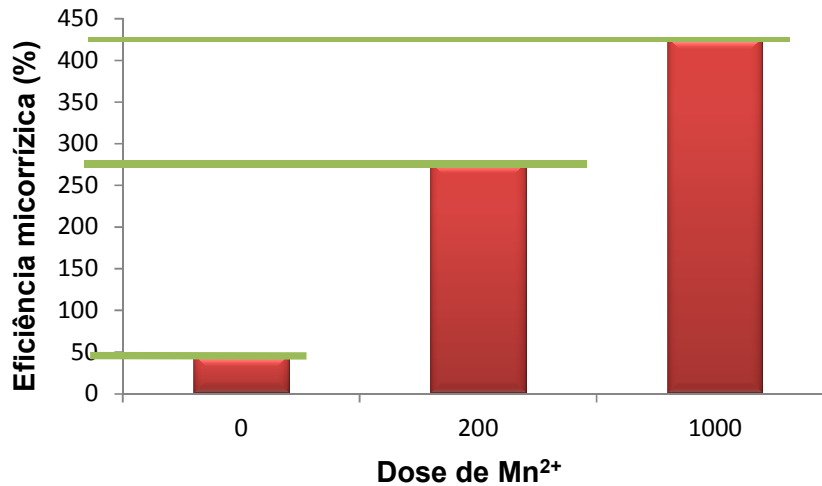


Figura 10. Eficiência micorrízica (%) de plantas de *Eucalyptus grandis* em associação simbiótica com o fungo *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) submetidas às concentrações de Mn^{2+} (0, 200 e 1000 μM), baseada na biomassa total.

4.5 Análise de enzimas oxidativa das plantas de eucalipto ectomicorrizadas submetidas a doses de Mn^{2+}

A porcentagem de estimulação da atividade da enzima antioxidante catalase nas raízes das plantas de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas foram significativamente superiores à de plantas em associação com fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus*. A maior porcentagem de estimulação ocorreu na dose de 200 μM Mn^{2+} , seguida da dose de 1000 μM em plantas não micorrizadas. As plantas ectomicorrizadas apresentaram uma pequena estimulação na atividade da catalase em relação ao controle na dose de 200 μM de Mn^{2+} , enquanto na dose de 1000 μM de Mn^{2+} houve uma inibição desta enzima (Figura 11).

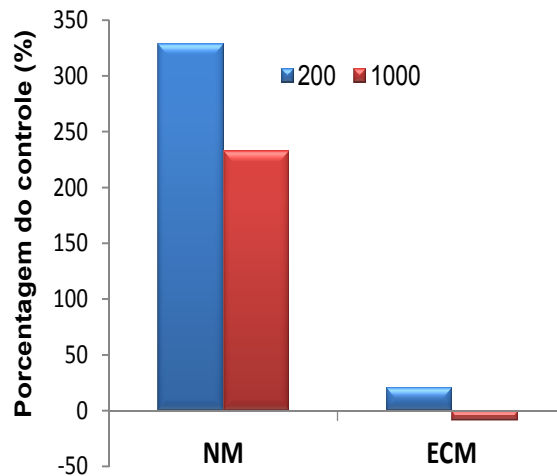


Figura 11. Porcentagem de estimulação da atividade da catalase (CAT) em raízes de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas (NM) e em associação (ECM) submetidas à duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM).

Assim como os resultados obtidos na atividade da catalase, a porcentagem de estimulação da enzima glutiona S-transferase foi superior em raízes de plantas não micorrizadas submetidas à concentração de 200 μM Mn^{2+} . Portanto, na maior dose de Mn^{2+} , essas plantas apresentaram uma inibição na atividade da GST. Nas raízes de plantas ectomicorrizadas, ocorreu uma inibição significativa da atividade da GST na dose de 200 μM Mn^{2+} e um estímulo não significativo na dose de 1000 μM Mn^{2+} (Figura 12).

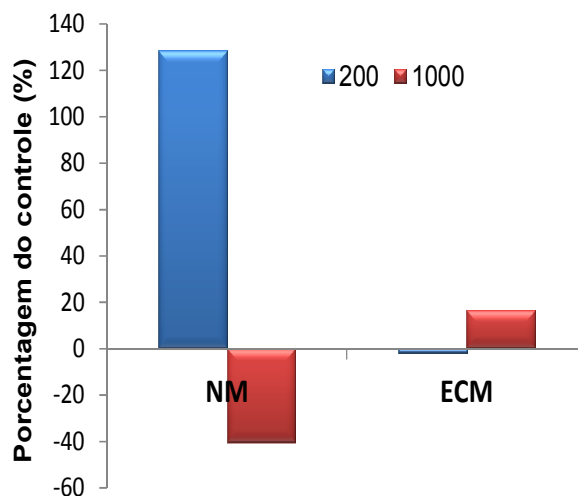


Figura 12. Porcentagem de estimulação da atividade da glutiona S-transferase (GST) em raízes de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas (NM) e em associação (ECM) submetidas às duas concentrações de Mn^{2+} (200 e 1000 μM).

5. DISCUSSÃO

Estudos relacionados à tolerância de fungos a metais são normalmente realizados em meio de cultura sob condições controladas. Apesar disso, tanto o meio sólido, quanto o líquido podem apresentar problemas em estudos de tolerância a esses elementos tóxicos. Gadd (1993) descreve a complexação de metais pesados na matriz do substrato podendo alterar a disponibilidade deste, ou o próprio ágar pode conter metais pesados. Deste modo, a especiação realizada neste estudo minimiza a ocorrência deste fenômeno.

No experimento *in vitro* utilizando doses de Mn^{2+} , o fungo *Pisolithus microcarpus* obteve um maior crescimento na dose de 10 g L^{-1} de glicose principalmente na maior dose de Mn^{2+} . Resultado semelhante foi encontrado por Kim et al. (2003), em que observaram incrementos no crescimento de três fungos ectomicorrízicos, *Paxillus involutus*, *Suillus bovinus* e *Rhizopogon subcaerulescens*, em função da adição de glicose. Com base nos resultados encontrados neste trabalho e nos de Kim et al. (2003), especulamos que a glicose possa estimular os processos de desintoxicação e/ou mecanismos de reparação às altas disponibilidades de metais. Além disso, pode ser observado um aumento na pigmentação do fungo com o incremento de glicose. Diversos estudos apontam para a utilização desses pigmentos, principalmente melaninas, na imobilização de metais presentes no meio de cultura, indicando uma capacidade de tolerância a metais (Graziotti et al., 2001). Tal fato pode explicar a tolerância do *Pisolithus microcarpus* (isolado 24) ao Mn^{2+} , uma vez que a utilização de pigmentos, como a melanina, consiste em um dos principais mecanismos de precipitação de metais pesados (Fogarty & Tobin, 1996).

Thompson & Medve (1984) testaram os efeitos de três sais de Mn^{2+} em doses de 0 a 500 ppm nos fungos ectomicorrízicos *Cenococcum graniforme*, *Suillus luteus*, *Thelephora terrestris* e três isolados de *Pisolithus microcarpus*, constatando que este metal não foi tóxico para tais fungos, uma vez que todos os isolados apresentaram um crescimento de até 65% na dose de 500 ppm em relação ao controle. Contudo, uma variação genotípica foi descoberta neste estudo para o fungo *P. microcarpus* em relação à tolerância ao Mn^{2+} . Tais resultados corroboram os encontrados no presente trabalho, os quais mostram uma tolerância do fungo *P. microcarpus* (isolado 24) ao metal Mn^{2+} em altas doses de glicose. Tam (1995) verificou que o fungo *P. microcarpus* foi pouco tolerante ao cádmio mesmo em baixas doses deste

metal ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$, aproximadamente $54 \mu\text{mol L}^{-1}$). Kim et al. (2003) também constatou uma inibição significativa no crescimento radial dos fungos ectomicorrízicos *S. bovinus* e *R. subcaerulescens* quando submetidos a baixas doses de cádmio ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$).

Blaudez et al. (2000) testaram a tolerância de quatro isolados de *P. microcarpus*, em meio MNM sólido contendo 10 g L^{-1} de glicose, nas doses de 0,05; 0,2 e 1 ppm Cd^{2+} e verificaram que apenas um isolado foi afetado em todas as doses deste metal, sendo que os demais não foram afetados nas doses de 0,05 e $0,2 \text{ ppm Cd}^{2+}$. No entanto, poucos são os estudos de tolerância de fungos ectomicorrízicos ao manganês *in vitro*.

Os estudos citados acima adotaram a dose de glicose considerada ideal (10 g L^{-1}), sendo que neste estudo descrevemos ineditamente que o isolado 24 é tolerante ao cádmio quando a concentração de glicose é reduzida ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). Tal fato poderia implicar no envolvimento da glicose na regulação dos sistemas primários de transporte de prótons, os quais consistem em um mecanismo de detoxificação de metais pesados em fungos micorrízicos (Hall, 2002).

A exposição a elevadas doses de Mn^{2+} podem ter provocado danos oxidativos no fungo produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) que incluem os íons superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e oxigênio livre (O_1) (Mannazzu et al., 2000; Avilez et al., 2008). Para combater as ROS, as células do fungo possuem defesas antioxidantes enzimáticas como a catalase, a qual possui um mecanismo eficiente na remoção de H_2O_2 formados sob condições de estresse (Angelova et al., 2000). Sendo assim, tal fato pode explicar o elevado estímulo na atividade da catalase nas doses de Mn^{2+} , principalmente nas maiores doses em 10 g L^{-1} de glicose.

A enzima GST, também teve sua atividade estimulada no fungo *P. microcarpus* (isolado 24) na maior dose de Mn^{2+} ($1000 \mu\text{M Mn}^{2+}$) em 10 g L^{-1} de glicose. Corroborando tais resultados, Courbot et al (2004), observaram que o conteúdo de glutatona aumenta quando o fungo *Paxillus involutus* foi exposto ao cádmio. Esta enzima é conhecida por seu papel na desintoxicação enzimática atuando na proteção contra o estresse oxidativo induzido por estresses abióticos e oxidantes, podendo proteger a função da proteína de danos oxidativos e manter a homeostase redox (Hossain et al., 2012). Sendo assim, o aumento na atividade tanto da CAT, quanto da GST podem ter influenciado na tolerância do fungo ectomicorrízico ao manganês. Aloui et al. (2008), avaliando proteínas de vinte e seis

fungos micorrízicos submetidos ao Cd, sugeriu que fungos que apresentam baixa sensibilidade ao metal podem ser recrutados para neutralizar a toxicidade deste metal através da síntese de proteínas com funções envolvidas no alívio a danos oxidativo, incluindo uma glutathione S-transferase. Sendo assim, especula-se que o comportamento do fungo é alterado em ambientes contaminados, aumentando a atividade tanto da CAT quanto da GST como forma de defesa, elevando sua tolerância ao Mn, principalmente na maior dose de glicose.

Entender o comportamento bioquímico do *P. microcarpus*, pode contribuir para um melhor entendimento sobre a origem da capacidade de bioacumulação que os fungos micorrízicos possuem e suas possíveis aplicações em programas de biorremediação de áreas contaminadas com metais. No entanto, poucos são os trabalhos que relacionam a atividade de enzimas antioxidantes em fungos ectomicorrízicos.

Curiosamente, o incremento na atividade enzimática ocorrido no fungo em condições *in vitro* não foi observado em raízes de plantas de eucalipto submetidas ao de Mn^{2+} quando foi feita a inoculação do fungo *in vivo*.

Plantas de eucalipto ectomicorrizadas apresentaram, inclusive, uma inibição da atividade da CAT e GST em relação ao controle sem a adição do metal. As raízes de plantas não micorrizadas, por outro lado, apresentaram alta porcentagem de estimulação na atividade das enzimas quando submetidas às concentrações de Mn^{2+} . Corroborando tais resultados, Dixit et al. (2001), trabalhando com plantas de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Azad) tratadas com concentração de cádmio sem a inoculação de fungos micorrízicos, mostraram um aumento na atividade de CAT relacionada à um maior nível de peroxidação lipídica e uma elevada concentração de H_2O_2 tanto na raiz quanto nas folhas, indicando que o metal provocou estresse oxidativo em plantas de ervilha.

Além disso, Hossain et al. (2012), observaram aumentos na atividade de GST em plantas de abóbora e arroz submetidas a estresse por Cd, Cr e Mn. Hossain et al. (2010) analisando plântulas de feijão submetidas a estresse de Cd, mostraram um aumento significativo na atividade de GST, acompanhada por elevado dano oxidativo. Arya e Roy (2011) observaram um incremento no teor de glutathione em *Vicia faba* L. quando submetidas à concentração de 160 μM de Mn^{2+} . Porém, estes estudos avaliaram plantas sem a associação simbiótica com fungos ectomicorrízicos.

Recentemente, Reis et al. (2011) observaram que os fungos *Paxillus involutus* e *P. arthizus* foram capazes de modular a atividade de enzimas de estresse oxidativo em plantas de *Pinus pinaster*.

Com base nos resultados enzimáticos encontrados no fungo e na raiz de plantas, com e sem a associação ectomicorrízica, submetidos a diferentes doses de Mn^{2+} , é possível especular que o fungo micorrízico esteja promovendo uma maior tolerância para a planta em ambientes com elevado Mn^{2+} . Acreditamos que a barreira do manto e ativação de processos internos para amenização dos seus efeitos internamente na planta, tal como ativação de enzimas de estresse oxidativo podem ser cruciais nos benefícios desta associação.

Quando o fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* foi inoculado a plantas de *Eucalyptus grandis*, observou-se um incremento tanto no crescimento quanto no peso da matéria seca da parte aérea das plantas, principalmente quando submetidas a doses de Mn^{2+} . Resultados semelhantes foram encontrados por Rabie (2005), em que plantas de trigo inoculadas com fungos micorrízicos promoveram uma redução dos efeitos inibitórios de metais na matéria seca das plantas. Além disso, Silva et al. (2006), observaram que gramíneas inoculadas a fungos micorrízicos em solos contendo os metais Zn, Cd, Cu e Pb aumentaram a produção de matéria seca em 84%.

A análise do conteúdo de nutrientes na parte aérea de plantas ectomicorrizadas e não micorrizadas mostrou que mesmo sem a adição do metal no substrato, foi possível observar um teor de Mn^{2+} nas plantas, podendo este fato ser atribuído à autoclavagem do substrato utilizado. Nogueira & Cardoso (2003), encontraram resultados semelhantes em solos arenosos, e associaram o aumento na disponibilidade de Mn no solo após a autoclavagem à quebra térmica de quelantes orgânicos, um dos principais fatores que regulam a disponibilidade do metal.

Plantas de eucalipto ectomicorrizadas submetidas às concentrações de 200 e 1000 μM Mn^{2+} apresentaram maior conteúdo do metal na parte aérea quando comparadas com plantas não micorrizadas. Porém, quando avaliado o teor de Mn^{2+} , plantas não micorrizadas apresentaram elevados valores. Esta diferença pode estar baseada no maior incremento de matéria seca de plantas ectomicorrizadas, uma vez que plantas maiores acumulam maior concentração de nutrientes. A análise do conteúdo de nutrientes elimina o efeito da diluição. Resultado semelhante foi observado por Krupa e Kozdrój (2004), em que menores teores de metais na parte

aérea de plantas ectomicorrizadas, associando tal efeito à fixação desses metais no micélio fúngico, o qual forma uma barreira biológica eficaz, reduzindo o movimento dos metais nos tecidos da planta.

O Mn interfere na absorção, no transporte e no uso de diversos elementos essenciais como Ca, K, P, N, Cu, Zn e Fe, pois compete com esses elementos reduzindo a absorção pela planta (Mukhopadhyay & Sharma, 1991). Esta interferência foi observada em plantas não micorrizadas, as quais obtiveram redução no conteúdo de todos os nutrientes citados acima.

Diferente de plantas não micorrizadas, a contaminação com Mn^{2+} influenciou positivamente o teor de P na parte aérea de plantas associadas ao fungo *P. microcarpus*. Este fator pode ter permitido melhores condições para sustentar a maior concentração de Mn^{2+} nos tecidos, suprimindo os sintomas de toxicidade de Mn^{2+} nesses casos (Nogueira & Cardoso, 2003).

A nutrição fosfática tem sido sugerida para desempenhar um papel no alívio da toxidez ao Mn^{2+} em algumas espécies de plantas. No entanto, existem poucos relatos sobre o papel do P na regulação do acúmulo de Mn^{2+} por espécies florestais. Segundo Rosas et al. (2011), avaliando o efeito da nutrição de P sobre a toxidez de Mn^{2+} em *Lolium perenne* L. e *Trifolium repens* L., houve um aumento na concentração de Mn nas raízes e parte aérea associada ao incremento tanto no suprimento de P quanto no teor de P nos tecidos. Diferente deste caso, plantas sem a associação exibiram baixas concentrações de P. Corroborando tais resultados, Carneiro et al. (2001) observaram que plantas de mostarda sem inoculação micorrízica, quando submetidas a contaminação por metais, apresentaram decréscimo na concentração de P na parte aérea em relação ao controle. Sendo assim, é possível confirmar que em plantas com associação simbiótica existe um forte envolvimento dos fungos micorrízicos na nutrição fosfática.

Os fungos micorrízicos podem aumentar o influxo de Pi de 3 a 5 vezes (Marengo & Lopes, 2009). Silveira et al. (2002), estudando a deficiência de macronutrientes em *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, também observaram coloração arroxeadada e pontos necróticos ao longo da lâmina foliar, além de apresentarem redução na altura.

De acordo com Marengo e Lopes (2009), o teor de nitrogênio diminui linearmente com a concentração de Mn^{2+} na parte aérea, o que pode explicar o fato de plantas não micorrizadas apresentarem menor concentração de N na dose de 1000 $\mu M Mn^{2+}$.

Existe uma relação positiva entre taxa fotossintética e disponibilidade de nitrogênio. Nesse contexto, a taxa fotossintética das plantas em elevadas doses de Mn^{2+} sofreram uma queda significativa quando comparada às outras plantas submetidas as doses de 0 e 200 μM de Mn^{2+} . Tais resultados corroboram com os encontrados por Cruz et al. (2007), os quais demonstraram que plantas de mamoeiro sem associação ectomicorrízica e com baixa disponibilidade de N apresentaram uma redução na taxa fotossintética líquida. Alguns autores afirmam que a menor taxa fotossintética está diretamente relacionada ao teor de manganês na planta (Malavolta et al., 1997). Desse modo, em condições de níveis tóxicos de Mn^{2+} , a produção será significativamente afetada.

O excesso de Mn^{2+} prejudica a estrutura dos cloroplastos, comprometendo as trocas gasosas, reduzindo o teor de carboidratos solúveis na planta (Taiz & Zeiger, 2010). Como algumas etapas da fotossíntese são seriamente afetadas em condições de excesso de Mn^{2+} , outras reações associadas ao transporte de elétrons também o são, como a fotofosforilação, a redução de CO_2 , de nitrito e de sulfito (Kirkby & Römheld, 2007). Com o aumento das doses de Mn^{2+} , era possível que ocorresse decréscimo na produção de massa seca da planta, devido ao seu efeito tóxico em quantidades excessivas. Porém, mesmo com a diminuição do acúmulo de alguns nutrientes, como o Fe, em função do incremento das doses de Mn^{2+} , as plantas ectomicorrizadas apresentaram acréscimos no peso seco, evidenciando sua tolerância ao elemento e o potencial bioacumulador do fungo que evita a absorção de níveis tóxicos do metal pelo vegetal.

Apesar do elevado conteúdo de Mn^{2+} , porém menor teor, plantas ectomicorrizadas obtiveram elevadas taxas fotossintéticas quando comparadas às plantas não micorrizadas. Este fato pode estar relacionado à participação do Mn^{2+} na evolução do O_2 (Reação de Hill) e ativação de diferentes sistemas enzimáticos durante a fotossíntese (Marenco & Lopes, 2009).

O excesso ou o déficit do teor de Mn^{2+} na parte aérea das plantas ectomicorrizadas e sem o simbionte, promoveu um decréscimo na eficiência do uso da água e também na eficiência de carboxilação, ou seja, a velocidade com que o CO_2 fixado é processado pelas plantas. Isto explica o fato das mesmas plantas apresentarem uma queda na assimilação do CO_2 .

Mesmo com conteúdos mais elevadas de Mn^{2+} as plantas micorrizadas apresentaram uma queda na concentração de Fe menos acentuada quando comparadas à plantas não micorrizadas. Sendo assim, este fato pode explicar a

maior taxa fotossintética em plantas micorrizadas nas concentrações de 200 e 1000 μM de Mn^{2+} , pois o Fe em conjunto com o P, são minerais que participam ativamente em várias etapas do processo fotossintético.

Salvador et al (2003), trabalhando com goiabeiras e Hernandez et al (2010), trabalhando com caramboleiras, observaram que o aumento de Mn^{2+} na solução hidropônica conduziu a decréscimos nos teores de Fe nas folhas. A interação entre esses nutrientes ocorre devido a uma inibição competitiva, onde mesmos sítios de absorção são competidos por dois íons bivalentes (Foy et al., 1978; Malavolta et al., 1997).

Este estudo mostra resultados originais sobre a regulação fisiológica e bioquímica no fungo ectomicorrízica na fase assimiótica (*in vitro*) e na fase in planta, ou simbiótica. O conjunto desses resultados é muito importante para gerar um modelo de tolerância a metais na associação ectomicorrízica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *Pisolithus microcarpus* mostrou-se tolerante ao manganês principalmente na maior dose de glicose 10 g L⁻¹. A pigmentação do isolado 24 também foi estimulada com o incremento de glicose, podendo este fator estar envolvido em um mecanismo de tolerância deste fungo a metais. A tolerância ao Mn²⁺ provocou um incremento na atividade de enzimas antioxidativas do fungo, indicando que houve um estresse oxidativo no mesmo.

Quando associado a mudas de eucalipto, o fungo ectomicorrízico estimulou o crescimento das plantas em substrato com elevadas doses de Mn. Foi observado um menor teor do metal em plantas micorrizadas enquanto o conteúdo fora superior.

A assimilação de carbono foi superior em plantas associadas ao fungo, o qual promoveu uma maior eficiência no uso da água e eficiência de carboxilação. Além disso, a atividade de enzimas antioxidantes nas raízes de eucalipto micorrizadas foi inferior ao tratamento não micorrizado, demonstrando, assim, a eficiência do fungo na diminuição do estresse das plantas causado pelo metal. Dessa forma, o fungo ectomicorrízico mostrou ser eficiente na indução de fitoproteção ao manganês em plantas de eucalipto crescendo em elevadas doses do metal.

Novos estudos envolvendo a expressão de genes codificando a bombas de prótons, transportadores e enzimas envolvidas no estresse oxidativa serão importantes para elucidar a regulação molecular desta simbiose.

7. REFERÊNCIAS

- Abreu, C. A.; Abreu, M. F.; Andrade, J. C. (2001) Determinação de cobre, ferro, manganês, zinco, cádmio, cromo, níquel e chumbo em solos usando a solução DTPA em pH 7,3. In: Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Ed: van Raij et al. Instituto Agrônomo, Campinas, p. 240-250.
- Abreu, C. A.; Van Raij, B.; Tanaka, R. T. (1994) Comportamento de cultivares de soja em solo deficiente em manganês. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v.19, p.149-152.
- Accioly, A. M. A.; Siqueira, J. O. (2000) Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novaes, R. F.; Alvarez, V. H. V.; Schaefer, C. E. G. R. (Ed.). Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG: UFV, p. 299-352.
- Adriano, D. (2001) Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals, 2ªed.; Springer: New York.
- Aloui, A.; Recorbet, G.; Gollotte, A.; Robert, F.; Valot, B.; Gianinazzi-Person, V.; Ashi-Smiti, S.; Dumas-Gaudot, E. (2008) On the mechanisms of cádmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. *Proteomics*, v.9, p.420-433.
- Angelova, M. B.; Pashova, S. B.; Slokoska, L. S. (2000) Comparasion of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p.544-549.
- Arya, S. K.; Roy, B. K. (2011) Manganese induced changes in growth, chlorophyll content and antioxidants activity in seedlings of broad bean. *Journal of Enviromental Biology*, n.32, p.707-711.
- Avilez, I.M.; Hori, T.S.F.; Almeida, L.C.; Hackbarth, A.; Bastos Neto, J.C.; Bastos, V.L.F.C.; Moraes, G. (2008). Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v.148, p.136-142.
- Baker, A. J. M. (1987) Metal tolerance. *New Phytologist*, London, v.106, p.93-111.

- Barros, N. F.; Brandi, R.M.; Reis, M.S. (1978) Micorriza em eucalipto. *Revista Árvore*, v.2, p.130-140.
- Bellei, M. (1987) Micorrizas de *Eucalyptus* spp. em viveiros e florestas de Santa Catarina. Florianópolis: UFSC. 54 p.
- Bellei, M., Carvalho, M.S. (1992) Ectomicorrizas. In: Cardoso, E.J.B.N; Tsai, S. M., Neve, M.C.P. *Microbiologia do Solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.297-318.
- Bellion, M.; Courbot, M.; Jacob, C.; Blaudez, D.; Chalot, M. (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, v.254, n.2, p.173-181.
- Bellote, A.F.J.; Ferreira, C.A. (1993) Nutrientes minerais e crescimento de árvores adubadas de *Eucalyptus grandis*, na região do cerrado, no Estado de São Paulo. *Boletim Pesquisa Florestal*, n.26/27, p. 17-28.
- Benite, A. M. C.; Machado, S. P.; Barreiro, E. J. (2007) Uma visão da química bioinorgânica medicinal. *Química Nova*, v.30, n.8, p.2062-2067.
- Beutler, E. (1975) Catalase. In: Beutler, E. (eds) *Red Cells Metabolism – a manual of biochemistry methods*. New York: Grune & Stratton, p. 89-90.
- Bisinoti, M. C.; Yabe, M. J. S.; Gimenez, S. M. N. (2004) Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina – PR. *Revista Analytica*, n.8, p.22-27.
- Blaudez, D.; Jacob, C.; Turnau, K.; Colpaert, J. V.; Ahonen-Jonnarth, U.; Finlay, R.; Botton, B.; Chalot, M. (2000) Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. *Mycology Research* v. 104, p.1366-1371.
- Briskin, D. P. (1994) Membrane and Transport systems in plants: An Overview. *Weed science*, n. 42. p.255-262.
- Brown, M. T.; Wilkins, D. A. (1985) Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula*. *New Phytologist*, v.99, p.101–106.
- Campos, D. T. S., Silva, M. C. S.; Luz, J. M. R.; Telesfora, R. J.; Kasuya, M. C. M. (2011) Colonização micorrízicas em plantios de eucalipto. *Revista Árvore*, v.35, n.5, p.965-974.

- Carneiro, M.A.C.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S. (2001) Estabelecimento de plantas herbáceas em solos com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, p.1443-1452.
- Chen, B.D.; Li, X.L.; Tao, H.Q.; Christie, P.; Wong, M.H.(2003) The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere*, v.50, p.839-846.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, v.212, p.475-486.
- Colpaert, J. V.; Van Assche, J. A. (1992) Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant and Soil*, v.143, n.2, p.201-211.
- Colpaert, J. V.; Van Assche, J. A. (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L.. *New Phytologist*, v. 123, p. 325–333.
- Courbot, M.; Diez, L.; Ruotolo, R.; Chalot, M.; Leroy, P. (2004) Cadmium-Responsive Thiols in the Ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus*. *Environmental Microbiology*, v.70, n.12, p. 7413-7417.
- Cruz, J. L.; Pelacani, C. R.; Carvalho, J. E. B. de; Souza Filho, L. F. S.; Queiroz, D. C. (2007) Níveis de nitrogênio e taxa fotossintética do mamoeiro “Golden”. *Ciência Rural*, v.37, n.1, p.64-71.
- Cunningham, S. D.; Anderson, T. A.; Schwab, A. P.; Hsu, F. C. (1996) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advance in Agronomy*, New York, v.56, p.55-114.
- Dixit, V.; Pandey, V.; Shyam, R. (2001) Differential antioxidative responses to cádmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, v.52, n.358, p.1101-1109.
- Dixon, R. K. (1988) The response of ectomycorrhizal *Quercus rubra* to soil cadmium, nickel and lead. *Soil Biology and Biochemistry*, n.20, p. 555–559.
- Dixon, R. K., Buschena, C. A.(1988) Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Plant Soil*, v. 105, 265-271.
- Embrapa. (1997) Manual de interpretação de análises de solo, plantas e fertilizantes. Ed. Silva, F.C. Brasília (DF), 185 p.

- Fogarty, R. V ; Tobin, J. M. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microbiology Technology.*, v. 19, p. 311-317.
- Foy, C. D.; Chaney, R. L.; White, M. C. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Lancaster, v.29, p.511- 566.
- Gadd, G. M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, v.124, p.25-60.
- Gadd, G. M.; De Rome, L. (1988) Biosorption of Cooper by fungal melanin. *Applend Microbiology Biotechnology*, Cambridge, v.29, p.610-617.
- Gaete, H.; Hidalgo, M.E.; Neaman, A.; Àvila, G. (2010) Evaluación de la toxicidade de cobre em suelos através de biomarcadores de estrés oxidativo em *Eisenia foetida*. *Química Nova*, v.33, n.3, p.566-570.
- Galli, U., Schuepp, H., Brunold, C. (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiology Plant*, v.92, 364–368.
- Giller, K.E.; Witter, E.; McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, v.30, p.1389-1414.
- Giovannetti, M., Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. 84: 484-500.
- Godbold, D. L.; Jentschke, G.; Winter, S.; Marschner, P. (1998) Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. *Chemosphere*, v. 36, n. 4-5, pp. 757-762.
- Grazziotti, P. H.; Siqueira, J. O.; Moreira, F. M.; Carvalho, D. (2001) 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, p. 839-848.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v.249, p.7130-7139.
- Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental Botany*, v.53, n.366, p.1-11.

Hartley, J.; Cairney, J. W. G.; Meharg, A. A. (1997) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptative tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Planta and Soil*, v.189, p.303-319.

Hernandez, A.; Natale, W.; Cazetta, J. O.; Rozane, D. E.; Souza, H. A.; Romualdo, L. M. (2010) Influência do manganês no crescimento e na composição mineral de mudas de caramboleira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.32, n.4, p.1220-1230.

Hocking, P. J.; Pate, J. S.; Wee, S. C.; McComb, A. J. (1977) Mn nutrition of *Lupinus* spp. Especially in relation to developing seeds. *Ann. Bot.*, v.41, p.677-688.

Hossain, M. A.; Hasanuzzaman, M.; Fujita, M. (2010) Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v.16, n.3, p.259–272.

Hossain, M. A.; Piyatida, P.; Silva, J. A. T. da; Fujita, M. (2012) Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Jornal of Botany*, 37p.

Jackson, M.L. (1965) *Soil Chemical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 489p.

Jones, M. D., Hutchinson, T. C. (1986) The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytologist*, v.102, 429-442.

Khan, A. G.; Kuek, C.; Chaudhry, T. M.; Khoo, C. S.; Hayes, W. J. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, v. 41, p. 197-207.

Kim, C. G.; Power, S. A.; Bell, J. N. B. (2003) Effects of cadmium on growth and glucose utilization of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Mycorrhiza*, v. 13, p. 223-226.

Kirkby, E. A.; Römheld, V. (2007) Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, n.118, p.1-3.

Kistner, C.; Parniske, M. (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Science*, v.7, n.11, p.511-518.

- Krupa, P.; Kozdrój, J. (2004) Accumulation of heavy metals by ectomycorrhizal fungicolonizing birch trees growing in an industrial desert soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Dordrecht, v.20, n.4, p.427-430.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. (1951) Protein measurement with pholin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275.
- Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A de. (1997) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2.ed. Piracicaba: Potafós, 319p.
- Mannazzu, I.; Guerra, E., Ferretti, R.; Pediconi, D.; Fatichenti, F. (2000) Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1475, p.151-156.
- Marenco, R.; Lopes, N. F. (2009) *Fisiologia Vegetal*. 3ªed, UFV, Viçosa.
- Martins, I.; Lima, I. V. (2001) Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. *Cadernos de Referência Ambiental*. 7: 1-122.
- Marx, D. (1991) Forest application of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *The Marcus Wallenberg Prize*. Stockholm, 34 pp.
- 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, p.153-163.
- Masson, M. V.; Moraes, W. B.; Matos, W. C.; Alves, J. M.; Furtado, E. L. (2011) Eficiência e viabilidade econômica do controle químico da ferrugem do eucalipto em condições de campo. *Summa Phytopathol*, v.37, n.2, p.107-112.
- Matos, R. M. B., Silva, E. M. R., Lima, E. (1999) *Fungos micorrízicos e nutrição de plantas*. Embrapa Agrobiologia, Seropédica.
- Melarato, M.; Panobianco, M.; Vitti, G. C.; Vieira, R. D. (2002) Manganês e potencial fisiológico de sementes de soja. *Ciência Rural*, v.32, n6, p.1069-1071.
- Morselt, A. F. W.; Smits, W. T. M.; Limonard, T. (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, v.96, n.3, p. 417-420.

- Mukhopadhyay, M. J.; Sharma, A. (1991) Manganese in cell metabolism of higher plants. *The Botanical Review*, v.57, p.117-149.
- Murphy, R. J.; Levy, J. F. (1983) Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v.81, p.165-168, 1983.
- Nehls, U. (2008) Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *Journal of Experimental Botany*, v.59, n.5, p.1097-1108.
- Nogueira, M.A.; Cardoso, E. J. B. N. (2003) Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type na endophyte. *Scientia Agricola*, v.60, n.2, p.329-335.
- Philips, J.M., Hayman, D.S. (1970) Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society*, 55: 158-161.
- Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v.1469, p.31-42.
- Rabie, G. H. (2005) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal of Biotechnology*, v.4, n.4, p.332-345.
- Ramos, A. C.; Lima, P. T.; Dias, P. N.; Kasuya, M. C. M.; Feijó, J. A. (2009) A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytologist*, v.181, p.448-462.
- Rauser, W. E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants – the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v.31, p.19-48.
- Ray, P.; Tiwari, R.; Gangi Reddy, U.; Adholeya, A. (2005) Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, p.309–315.
- Reis, F. S.; Ferreira I. C. F. R.; Martins, A. (2012) Effect of the mycorrhizal symbiosis time in the antioxidant activity of fungi and *Pinus pinaster* roots, systems and leaves. *Industrial Crops and Products*, v.35, p. 211-216.

Rezende, G. D. S. P.; Bertolucci, F. L. G.; Ramalho, M. A. P. (1994) Eficiência da seleção precoce na recomendação de clones de eucalipto avaliados no norte do Espírito Santo e Sul da Bahia. *Cerne*, v.1, p.45-50.

Rosas, A.; Rengel, Z.; Ribera, A.; Mora, M. D. (2011) Phosphorus nutrition alleviates manganese toxicity in *Lolium preenne* and *Trifolium repens*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v.174, n.2, p.210-219.

Rosolem, C. A.; Ferelli, L. (2000) Resposta diferencial de cultivares de algodão ao manganês em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, p.355-361.

Salvador, J. O.; Moreira, A.; Malavolta, E.; Cabral, C. P. (2003) Influência do boro e do manganês no crescimento e na composição mineral de mudas de goiabeira. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.27, n.2, p.325-331.

Santos, L. C. (2006) Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo, associação ectomicorrízica e no desenvolvimento de mudas de Eucalipto e Canafístula. Santa Maria: Universidade federal de Santa Maria – UFSM, 88p. Tese (Mestrado em Ciências do Solo)

Santos, V. L.; Muchovej, R. M.; Borges, A. C.; Nevez, J. C. L.; Kasuya, M. C. M. (2001) Vesícula-arbuscular-/ecto-micorrhyza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.81-86.

Schneider, J.; Oliveira, L. M.; Guilherme, L. R. G.; Stürmer, S. L.; Soares, C. R. F. S. (2012) Espécies tropicais de pteridófitas em associação com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio. *Química Nova*, v.15, p.1-6.

Sgarbi, F.; Silveira, R. L. V. A. (2001) Monitoramento nutricional e da fertilidade do solo em plantios de eucalipto na Votorantim Celulose e Papel, no sul do estado de São Paulo. Relatório de pesquisa da Votorantim Celulose e Papel.

Shaw, A. J. (1989) Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. New York: CRC Press.

Silva, R. F.; Salles, A. S.; Leal, L. T.; Lupatini, M.; Moro, C. A. J.; Antonioli, Z. I. (2007) Ectomicorriza na Tolerância de Mudas de Canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. a Solo Contaminado por Cobre. Gramado: CBCS.

Silva, S.; Siqueira, J. O.; Fonsêca, S. S. (2006) Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.41, n.12, p.1749-1757.

Silveira, R. L. V. A.; Moreira, A.; Takashi, E.N.; Sgarbi, F.; Branco, E. F. (2002) Sintomas de deficiência de macronutrientes e de boro em clones híbridos de *Eucalyptus grandis* com *Eucalyptus urophylla*. *Cerne*, v.8, n.2, p.107-116, 2002.

Siqueira, J. O.; Souza, F. A.; Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M. (2010) In: Nogueira, M. A.; Soares, C. R. F. S. *Micorrizas: 30 Anos de Pesquisa no Brasil*. Ed. UFLA: Lavras.

Smith, S. E.; Read, D. J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*, London: Academic Press. p. 605.

Sociedade Brasileira De Silvicultura (2009) Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/estatisticas.htm>>. Acesso em 18 de janeiro de 2012.

Soratto, R. P.; Silva, T. R. B.; Borghi, E.; Silva, L. M.; Rosolem, C. A. (2005) Resposta de quatro cultivares de feijão ao manganês em solução nutritiva. *Revista Brasileira Agrocência*, v.11, n.2, p.235-240.

Souza, L. A. B.; Filho, G. N. S.; 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, V. C., Silva, R. A., Cardoso, G. D., Barreto, A. F. (2006) Estudos sobre fungos micorrízicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande, v.10, n. 3, p. 612-618.

Sutter, H. P.; Jones, E. B. G.; Walchli, O. (1983) The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.) Cke and *Poria caillantii* (Pers.) Fr. *Material und Organismen*, v.18, p.243-263.

Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 722p.

Tam, P. C. F. (1995) Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, New York, v. 5, n. 3, p. 181-187.

Taylor, J. H.; Peterson, C. A. (2005) Ectomycorrhizal impacts on nutrient uptake pathways in woody roots. *New Forests* v.30, p.203-214.

Teixeira, I. R.; Borém, A.; Araújo, G. A. A.; Andrade, M. J. P. (2005) Teores de nutrientes e qualidade fisiológica de sementes de feijão em resposta à adubação foliar com manganês e zinco. *Bragantia*, v.64, n.1, p.83-88.

Thompson, G. W.; Medve, R. J. (1984) Effects of aluminium and manganese on the growth of ectomycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Biology*, v. 48, n. 3, p. 556-560.

Van Assche, F.; Clijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, v.13, p.195-206.

Van Tichelen, K. K.; Colpaert, J. V.; Vangronsveld, J. (2001) Ectomycorrhizal Protection of *Pinus sylvestris* against Copper Toxicity. *New Phytologist*, v. 150, n.1, p.203-213.

Vangronsveld, J.; Colpaert, J. V.; Tichelen, K. K. van. (1997) Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physicochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. *Environmental Pollution*, Oxford, v.94, p.131-140.

Weissenhorn, I.; Glashoff, A.; Leyval, C.; Berthelin, J. (1994) Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant soil*, v.167, p.189-196.

Wheeler, W. (1994) Site Remediation: An Australian perspective on best practice. In: Cole, J., (Ed.), *Environmental Management Industry Association of Australia Year Book 1994*, Executive Media Pty. Ltd., Waterloo, NSW, Australia, p.156-160.

Zambolin, L.; Barros, N. F. (1982) Constatação de micorriza vesículo-arbuscular em *Eucalyptus* spp na região de Viçosa, MG. *Revista Árvore*, v.6, p.95-97.