

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**ECOFISIOLOGIA DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius* E DA ASSOCIAÇÃO *P. tinctorius*-*E. grandis* SOB ESTRESS POR CÁDMIO**

**WOLMEN OLIVEIRA DOS SANTOS**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2016**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**ECOFISIOLOGIA DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius* E DA  
ASSOCIAÇÃO *P. tinctorius*-*E. grandis* SOB ESTRESS POR CÁDMIO**

**Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.**

**WOLMEN OLIVEIRA DOS SANTOS**

**VILA VELHA**

**FEVEREIRO / 2016**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S 237 e Santos, Wolmen Oliveira dos

Ecofisiologia do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* e da associação *P. tinctorius* - *E. grandis* sob estresse por Cádmio / Wolmen Oliveira dos Santos. – 2016.

25 f. : il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2016.

Inclui Bibliografias.

1. Ecologia. 2. Fungos. 3. Metais. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

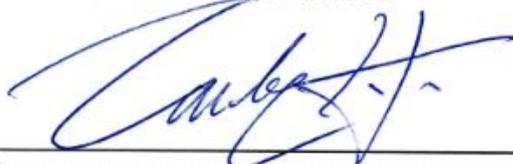
**WOLMEN OLIVEIRA DOS SANTOS**

**ECOFISIOLOGIA DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius* E DA ASSOCIAÇÃO *P. tinctorius*-*E. grandis* SOB ESTRESS POR CÁDMIO**

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

Aprovado, em 29 de fevereiro de 2016,

Banca Examinadora:



---

**Dr. Carlos Eduardo Tadokoro – UVV**



---

**Dra. Inga Gonçalves de Azevedo – UENF**



---

**Dra. Livia Marini Palma – UENF**



---

**Dr. Alessandro Coutinho Ramos – UENF**  
Orientador

Dedico este trabalho aos meus queridos familiares:  
Regina Lucia Coimbra de Carvalho, Pedro Carvalho  
Santos e Lucas Carvalho Santos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha mãe Nossa Senhora da Penha, por ter me dado a oportunidade de realização de mais um sonho;

A mensagem que marca a minha vida é sempre acreditar no poder da sinceridade, da honestidade, da humildade, da perseverança, da união e do compromisso de que estamos aqui para crescermos como seres humanos;

Ao meu orientador Prof. Dr Alessandro Coutinho Ramos pela orientação, incentivo, dedicação, amizade, compreensão e acima de tudo como exemplo a seguir;

Nada disso seria possível sem o apoio da minha família, dos meus filhos Pedro e Lucas e em especial da minha esposa Regina, que com muita paciência, compreensão e amor, que me deu suporte para mais uma conquista;

Agradeço em especial ao meu pai biológico (Walaci dos Santos *in memória*) a minha mãe Alaídes de Oliveira Santos pelo apoio e incentivo nesta jornada;

Aos meus irmãos Wolmar, Walace S. Junior, Elvira, Eliane, Euzilene e Eudicéia pela grande torcida, companheirismo e fé;

Aos meus parentes, primos e tios Abílio e Adescripes que tanto fizeram pela nossa família dando apoio nesta jornada;

Ao meu sogro Geraldo Vieira de Carvalho e a minha cunhada Claudia Helena Coimbra de Carvalho pelo apoio e incentivo;

Aos colegas Mestrandos e Doutorandos: Gabriela Chaves Canton, Savio Basto de Souza, Fred Figueira, Antonio J. D. Cogo e Amanda Azevedo Bertolazi da Universidade Norte Fluminense pelo grande auxílio e apoio.

Ao Dr. Aloisio Falqueto e Inês Falqueto pelo apoio e colaboração na pesquisa de Doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB) UVV pela amizade.

Agradeço a Instituição FAPES pelo suporte financeiro, pois, sem esse apoio, a execução deste projeto seria muito difícil a sua finalização. Muito obrigado!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas e a Universidade Vila Velha, pelo suporte dado ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, participaram e me acompanharam durante este processo, minha eterna gratidão.

“Ser feliz não é ter vida perfeita, mas deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história”

Abraham Lincoln

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	11
2.1 Metais pesados.....	11
2.2 Toxicidade do metal pesado Cd.....	13
2.3 Fitorremediação.....	14
2.4 Uso do eucalipto como planta fitorremediadora .....	17
2.5 Importância da simbiose fungos micorrízicos – plantas e sua função biológica em áreas com concentrações de metais pesados .....	18
2.6 O mecanismo de tolerância e a importância das enzimas anti-oxidantes a metais pesados.....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 Material Biológico .....	23
3.1.1 Metal pesado Cádmio.....	23
3.2 Especificação e meio de cultura .....	23
3.3 Experimento in vitro do crescimento do fungo <i>P. tinctorius</i> .....	24
3.4 Experimento in vivo e análise da associação eucalipto-fungo sob doses de Cd <sup>2+</sup> .....	24
3.5 Parâmetros fotossintéticos.....	25
3.6 Análise de nutrientes da parte aérea.....	25

3.7 Porcentagem de colonização micorrízica.....	26
3.8 Determinação de proteínas totais de <i>Pisolithus tinctorius</i> e raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas e em associação ectomicorrízica.....	26
3.9 Determinação da catalase em <i>Pisolithus tinctorius</i> e raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas e em associação ectomicorrízica.....	27
3.10 Determinação da glutatona S-transferase em <i>Pisolithus tinctorius</i> e raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> não micorrizadas e em associação ectomicorrízica.....	27
3.11 Análise dos dados.....	27
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
4.1 Biodisponibilidade dos nutrientes e metal pesado no meio de cultura .....	29
4.2 Crescimento de micélio de <i>P. tinctorius</i> com a disponibilidade (0,1 e 1g/L) de glicose para avaliação da sua tolerância ao metal cádmio nas concentrações de (10, 50, 100 e 200 $\mu$ M) por 27 dias .....	33
4.3 Avaliação da atividade enzimática da CAT, GST e FAC, no micélio de <i>P. tinctorius</i> crescidas in vitro em concentrações 0,1 e 1% de glicose (0 e 35 $\mu$ M) de Cádmio.....	36
4.4 Avaliação da Atividade enzimática da CAT, GST, FAC FAL em raízes de plantas <i>Eucalyptus grandis</i> micorrizadas e não micorrizadas.....	36
4.5 Respostas ecofisiológicas.....	39
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
<b>7.REFERÊNCIAS</b> .....	46

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema modificado de corte transversal de raiz demonstrando os diversos tipos de associação micorrízica entre plantas e fungos os mais frequentes: ectomicorrizas (ECM) (a), micorrizas arbusculares (AM) (b), micorrizas ericóides (c), micorrizas orquidáceas (d), micorrizas arbutóides (e), micorrizas monotrepóides (f) e arbúsculo (ar), “arbutóides” (arb), célula cortical (cc), esporo (e), enrolamentos (er), “haustórios” (ha), manto (m), micélio extrarradicular (me), novelos (nov) e rede de Hartig (rH) (Azul 2002, modificado a partir de Deacon 1997..... **19**
- Figura 2** Crescimento in vitro de micélio fúngico de *P. tinctorius* com adição de 0,1% e 1% de glicose nas concentrações (10, 50, 100 e 200 µm) de Cádmio por 27 dias. Fotografia de placas com fungos *P. tinctorius* com percentuais de 0,1 e 1% de glicose e concentrações no meio (10, 50, 100 e 200 µM) de Cádmio por 27 dias..... **31**
- Figura 3** Porcentagem de inibição do crescimento in vitro de micélio fúngico de *P. tinctorius* com adição de 0,1% e 1% de glicose nas concentrações (10, 50, 100 e 200 µm) de Cádmio por 27 dias..... **33**
- Figura 4** Atividade das enzimas CAT e GST analisadas no micélio de *P. tinctorius* crescidas in vitro, em concentrações de 0,1e 1 % de glicose e na condição de controle e 35 µM de Cádmio..... **34**
- Figura 5** Atividade das enzimas FAC (Gráfico A) e FAL (Gráfico B) analisadas no micélio de *P. tinctorius* crescidas in vitro, em concentrações de 0,1e 1 % de glicose e na condição de controle e 35 µM de Cádmio..... **35**
- Figura 6** Estimulação da atividade da Catalase (Gráfico A) glutiona-S-transferase (Gráfico B) e da Fosfatase ácida (Gráfico C) em raízes de plantas de *Eucalyptus grandis* não micorrizada e micorrizada, crescendo em concentrações de Cd (15 e 35 µM) e (0,1 e 1%) de glicose..... **37**
- Figura 7** Porcentagem de estimulação da atividade enzimática da Catalase, glutiona-S-transferase e da Fosfatase ácida em plantas de *Eucalyptus grandis* não micorrizada e micorrizada, crescendo em concentrações de Cd (15 e 35 µM) e (0,1 e 1%) de glicose..... **39**
- Figura 8** Gráfico demonstrando o resultado da altura de plantas de *Eucalyptus grandis* micorrizadas e não micorrizadas com tratamentos de 0 e 35 µM de

**Figura 9** Assimilação de Carbono (A) (A); Transpiração (E) (B); Concentração interna de Carbono (Ci) (C); Eficiência no Uso d'água intrínseco (iWUE) (D); Eficiência na Carboxilação (A/Ci) (E) nas folhas plantulas de *E. grandis*, controle e micorrizadas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados pela two-way ANOVA combinada com o teste de Tukey. Para cada concentração de Cd, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula nos diferentes tratamentos (Controle e Micorrizado), não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $p \leq 0.05$ . Para cada tratamento (Controle e Micorrizado), as barras seguidas da mesma letra minúscula, na mesma concentração de Cd, não são significativamente diferentes a  $p \leq 0.05$  (n=4)..... 41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Concentrações de íons e prevê a biodisponibilidade (%) em cada metal ( $Mg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) foi modificado e adaptado meio MNM e utilizado tanto para o crescimento ectomicorrízico e síntese in vitro. O estado não associado livre do íon é, na maioria dos casos, assumido como sendo a forma biodisponível do íon. As leituras foram realizadas pelo Visual Minteq v.2.53 (Parker et al., 1995; Ward et al., 2008; Ramos et al., 2009) e foi incluído na análise 180  $\mu M$  de Fe-EDTA..... **29**
- Tabela 2** Medidas de velocidade de crescimento do micélio fúngico (mm/dia), nas doses de Cd (0, 10, 50, 100, 200  $\mu mol$ ) e 0,1% e 1,0% de Glicose..... **32**

## RESUMO

SANTOS, Wolmen Oliveira dos. Universidade Vila Velha-ES, fevereiro de 2016. **Ecofisiologia do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* e da associação *P. tinctorius* - *E. grandis* sob estresse por Cádmio.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Para amenizar os efeitos das altas concentrações dos metais pesados no solo, a inoculação de plantas com fungos micorrízicos pode ser considerada uma excelente alternativa, principalmente, em programas de reflorestamento. Nesse contexto, a hipótese deste trabalho descreve se a inoculação do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* em plântulas de *Eucalyptus grandis* irá permitir uma maior tolerância das plântulas de *E. grandis* no seu desenvolvimento em ambientes com alta disponibilidade de cádmio ( $Cd^{2+}$ ). Como objetivos: Avaliar o efeito da glicose no crescimento de *P. tinctorius* submetido a diferentes doses de cádmio  $Cd^{2+}$  e analisar as respostas bioquímicas e ecofisiológicas da associação *E. grandis*-*P. tinctorius* nas diferentes doses de  $Cd^{2+}$ . Para os estudos de crescimento, *in vitro*, as seguintes doses de metal de  $Cd^{2+}$  (0, 10, 50, 100 e 200  $\mu M$ ) foram avaliadas na forma de  $CdCl_2$  sob duas concentrações de glicose (0,1; 1g  $L^{-1}$ ). No experimento *in vivo* foram utilizadas três doses de  $Cd^{2+}$  (0, 15 e 35  $\mu M L^{-1}$ ) em plântulas inoculadas e não-inoculadas. Como resultado foi observado que altas doses de glicose tornaram o fungo mais sensível a doses de  $Cd^{2+}$  como mostrado pelo cálculo da  $EC_{50}$ . As atividades enzimáticas mostraram um comportamento similar para a catalase (CAT) e para a glutationa-S-transferase (GST). Ambas enzimas tiveram sua atividade estimulada no sistema radicular quando submetidas as doses de  $Cd^{2+}$  sem a presença do fungo, porém na presença da micorriza a atividade de tais enzimas não foi significativa, comprovando a capacidade do fungo em amenizar o estresse oxidativo causado pelo metal nas plântulas. Um reflexo positivo do efeito bioprotetor da simbiose foi observado nas trocas gasosas e acumulação de nutrientes. A fosfatase ácida (FAC) radicular também teve a mesma resposta das enzimas citadas anteriormente, entretanto esta resposta mostra que a plântula necessitou de uma maior produção de fosfato (P) no tratamento sem o fungo micorrízico, o que corrobora com a ideia da ligação de íons fosfato ao  $Cd^{2+}$  como um mecanismo de defesa da planta, diminuindo assim a quantidade de P disponível para o vegetal. Ficou demonstrado neste estudo que o fungo ectomicorrízico é eficiente na redução do stresse oxidativo das plantas imposta por  $Cd^{2+}$ . Assim o fungo ectomicorrízico foi eficaz para induzir fitoproteção de plantas de *E. grandis* sob alta concentração de Cd. via respostas ecofisiológicas e bioquímicas. Estudos adicionais da análise da expressão de alguns genes que codificam os mecanismos das bombas de prótons, transportadores e enzimas envolvidas no estresse oxidativo, são importantes para elucidar a regulação molecular da forma como esta simbiose permite resistência a metais pesados.

Palavras-chave: Metal pesado, micorriza, tolerância fúngica, bombas de prótons e atividade enzimática.

## ABSTRACT

SANTOS, Wolmen O. Universidade Vila Velha - ES, February 29, 2016. **Ecofisiologia the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and association *P. tinctorius*-*E.grandis* under stress Cadmium.** Advisor: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

## ABSTRACT

To mitigate the effects of high concentrations of heavy metals in soil, inoculation of plants with mycorrhizal fungi can be considered a great alternative, especially in reforestation programs. In this context, this study aimed to evaluate the effect of glucose on the growth of the fungus *Pisolithus tinctorius* subjected to different doses of cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) and analyze biochemical responses and ecophysiological the *Eucalyptus grandis* association *P. tinctorius* the different doses of  $\text{Cd}^{2+}$ . For growth studies in vitro, the following metal doses were evaluated (0, 10, 50, 100 and 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  in the form of  $\text{CdCl}_2$  in two glucose concentrations (0.1, 1  $\text{g L}^{-1}$ ) In the experiment in vivo it used three  $\text{Cd}^{2+}$  doses (0, 15:35  $\text{mMol L}^{-1}$ ) in inoculated and non-inoculated plants. High glucose doses become the most sensitive fungus to doses of  $\text{Cd}^{2+}$  as shown by calculating the  $\text{EC}_{50}$ . The enzyme activity showed a similar behavior for the catalase and GST. Both enzymes had their activity stimulated in the root system when subjected doses of  $\text{Cd}^{2+}$  in the absence of the fungus, but in the presence of mycorrhizae the activity of such enzymes has not been significant, demonstrating the fungi's ability to mitigate the oxidative stress caused by the metal in plants. A positive reflection of bioprotector effect of symbiosis was observed in gas exchange and nutrient accumulation. The root acid phosphatase also had the same behavior of the enzymes mentioned above, however this behavior shows that the plant required a greater production of phosphate (P) in the treatment without mycorrhizal fungi, which corroborates the idea of phosphate ions connection to  $\text{Cd}^{2+}$  as a plant defense mechanism, thus decreasing the amount of available phosphorus for the plant.

Key-words: Heavy metal, mycorrhiza, enzyme activity and ecophysiology.

## 1. INTRODUÇÃO

É bem conhecido que a contaminação por metais pesados é resultado das atividades industriais, tais como: mineração, fundição e fabricação (Kabir et al., 2012).

Solos contaminados por metais pesados muitas vezes induzem mudanças significativas na vegetação devido a seus efeitos sobre a fisiologia das plantas, bem como outras alterações incluindo a biodiversidade do solo (Giller et al., 1998); (Cobbett, 2003); (Dai et al., 2004); (Liu et al., 2012). Alguns metais, tais como Fe, Zn, Cu, Ni, Co e Mn, são micronutrientes essenciais às plantas, mas pequenas alterações nas suas concentrações podem torná-los extremamente tóxicos (Ott et al., 2002; Adeleke et al., 2012; Chen et al., 2010). Como consequência, a concentração de metal pode influenciar na ecologia das plantas e seus microrganismos associados, tais como as ectomicorrizas.

Ectomicorrizas são associações simbióticas entre fungos do solo e raízes de plantas florestais. Nesta simbiose, a planta hospedeira cresce mais rápido, é mais produtiva e possui uma maior capacidade de absorção de nutrientes do solo (Smith e Read 2008; Ramos et al., 2009), bem como o aumento da resistência aos estresses (Blaudez et al., 2000); (Courbot et al., 2004); (Colpaert e Assche, 1993); Van Hees et al., 2005; Finlay 2008; Jourand et al., 2014).

Fungos ectomicorrízicos também têm se mostrado ativos na remediação de solos contaminados com Cu, Zn, Cd, Pb e Ni (Brow e Wilkins 1985; Jones e Hutchinson 1986; Colpaert e Van Assche 1993; Van Tichelen et al., 2001; Kim et al., 2003; Finlay 2008).

A tolerância a metais pesados por fungos ectomicorrízicos é possivelmente devido à ligação do metal eletronegativo a locais na parede celular do fungo (Galli et al., 1994; Joner et al., 2000) ou a componentes celulares, por exemplo, a melanina (Fogarty e Tobin, 1996). A tolerância a metais pode ser influenciada pela glicose, o que é a principal fonte de carbono para fungos ectomicorrízicos e está envolvida em sistemas de desintoxicação de metais pesados (Kim et al., 2003).

Tolerância à metais também pode ser devido à complexação no vacúolo através de eventos de sinalização em cascata que incluem metalotioneína, glutathiona e fitoquelatinas (Hall 2002; Courbot et al., 2004). Assim, fungos ectomicorrízicos podem fornecer proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo metal tóxico através da síntese de glutathiona (Ott et al., 2002, Schützendübel e Poole 2002). As ectomicorrizas, por conseguinte, reduzem os efeitos tóxicos de íons metálicos livres em células hospedeiras através de uma eficaz ação de acumulação do metal no vacúolo (Gadd 1993; Joiner et al., 2000).

O cádmio (Cd) é um dos metais pesados mais tóxicos para plantas e animais, sendo, entre esses elementos, o que tem apresentado as mais altas taxas de emissão para o ambiente nas últimas décadas (Alloway, 1990), em decorrência de atividades como: mineração, fundição, refinamento de Zn, utilização de fungicidas, fertilizantes fosfatados e introdução do elemento por deposições atmosféricas (Page et al., 1972). Em solos não contaminados, o Cd encontra-se em concentrações que variam de 0,01 a 0,7 mg/kg, podendo esta concentração ser aumentada pela utilização de insumos agrícolas que contenham o elemento, o que pode possibilitar a introdução do metal na cadeia alimentar mediante a absorção pelas plantas. Assim, Cd é conhecido por causar vários problemas em plantas quando as concentrações são elevadas, mas os seus efeitos na interação com fungos ectomicorrízicos associados as plantas são desconhecidos (Lindsay, 1979).

Com base no exposto, a hipótese deste trabalho descreve se a inoculação do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* em mudas de *Eucalyptus grandis* irá permitir uma maior tolerância das plantas de eucalipto no seu desenvolvimento em ambientes com alta disponibilidade de cádmio (Cd<sup>2+</sup>).

E para testar esta hipótese, abordamos o papel do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* na tolerância de plantas de *Eucalyptus grandis* crescendo sob altas concentrações de Cd. Inicialmente, o crescimento *in vitro* de *P. tinctorius* foi testado avaliando-se a disponibilidade da glicose poder aumentar a sua tolerância ao metal Cd. Posteriormente, a atividade de enzimas antioxidantes (catalase e glutathiona-S-transferase e de fosfatases ácida e alcalina) foi analisada no micélio de *P. tinctorius* crescidos *in vitro* ou em simbiose com raízes de *E. grandis* expostas a diferentes

concentrações de Cd. Avaliou-se também, como o fungo pode influenciar na tolerância das plantas na concentração inibitória obtida por estudos *in vitro*, comparando o crescimento e a taxa fotossintética das plantas micorrizadas e não-micorrizadas.

Neste trabalho também discutiremos o envolvimento da catalase, glutathione S-transferase e fosfatases sobre a tolerância de fungos ectomicorrízicos e plantas inoculadas com *P. tinctorius* sob elevadas concentrações do metal Cd.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Metais pesados

Metais pesados referem-se ao grupo de transição e não-transição da tabela periódica com valores altos de densidade e aos elementos e suas formas iônicas a que pertencem. Podem ser, metais, semi-metais e até não-metais. Mesmo que alguns elementos são essenciais à manutenção dos seres vivos, como o manganês (Mn), zinco (Zn) e ferro (Fe) se presentes em pequenas quantidades. Mas normalmente estão associados à contaminação e à poluição, como: o mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e cádmio (Cd), além de não possuírem função biológica, produzem efeitos tóxicos ao meio ambiente, tendo consequência na cadeia trófica, principalmente quando se encontram na forma de íons ou ligados em cadeias curtas de átomos de carbono. Por outro lado, eles não são tóxicos em suas formas elementares livres (Schmitt & Sticher, 1991).

Ultimamente, estudos dos metais pesados tem abordado a avaliação dos efeitos da acumulação desses elementos nos organismos nos diferentes ecossistemas, a transferência na cadeia alimentar e os meios alternativos para recompor o equilíbrio desses ecossistemas através da biorremediação e a tolerância com os problemas gerados pelos excessos ocorridos da sua contaminação (Cunha et al., 2008).

Os metais pesados são componentes da biosfera, como consequência de processos litogênicos ou de ações antrópicas, ocorrem naturalmente nos solos e plantas, contudo, os seus níveis têm aumentado no meio ambiente (Schüürmann & Markert 1998). O excesso de cobre (Cu), Zn, Pb e Cd presente na água ou no solo estão relacionadas as ações degradação ambiental, tais como: mineração, as aplicações de produtos fitoquímicos (pesticidas, fungicidas e inseticidas), adubações na agricultura, descarte de materiais metalúrgico, eletrônico, de bateria, resíduos sólidos industriais, pigmentos para tintas, lodo de esgoto e da indústria de plásticos (Marsola et al., 2005).

As ações antrópicas são responsáveis por adições de até 1,16 milhões de toneladas de metais por ano em ecossistemas terrestres e aquáticos no mundo todo. No Brasil, a mineração de ferro, ouro, níquel e outros metais de interesse comercial, têm contribuído com a liberação de rejeitos que se constituem como uma das

principais formas de contaminação do ambiente por metais pesados. O aumento nas concentrações desses rejeitos no solo e nos efluentes próximos a zonas de mineração pode estar relacionado com processos químicos e biológicos que controlam a disponibilidade biológica, a solubilidade, e a mobilidade desses metais nos ecossistemas (Nriagu & Pacyna, 1988; Teixeira et al., 2005; Alleoni et al., 2005; Guilherme et al., 2005).

Os metais pesados no solo podem estar presentes em minerais na forma de precipitados ou co-precipitados, adsorvidos na solução do solo ou em microrganismos, plantas e animais. Apresentam ainda interações com a fase sólida do solo bastante complexas, envolvendo reações de adsorção e dessorção, precipitação e dissolução, complexação e oxirredução, tanto com a fase inorgânica, quanto com a orgânica (Cunha et al., 2008).

Os graus de mobilidade, atividade e biodisponibilidade dos metais pesados dependem de vários fatores, tais como: temperatura, ph, potencial redox, competição com outros metais, a capacidade de troca de cátions (CTC), ligação com ânions e composição e força iônica da solução do solo. A mobilidade dos metais pesados no solo também é influenciada pela superfície específica, textura, teor de matéria orgânica, densidade aparente, tipo e concentração de minerais de argila, além do tipo e do teor de metais disponíveis (Zanini & Bonifácio, 1991).

A presença de metais pesados é um dos fatores que pode limitar o uso do solo para fins produtivos além destes serem tóxicos para as culturas eles podem entrar na cadeia trófica, podendo vir a ser tóxicos para animais e humanos. Segundo Malavolta (1994), a vida útil dos metais pesados no solo varia, sendo de 70-510 anos para o Zn, 13 -1100 anos para o Cd, 300-1500 anos para o Cu e 740-5900 anos para o Pb. A completa remoção dos contaminantes metálicos dos solos é quase impossível.

Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e consolidadas, uma que está em grande destaque é a biorremediação. Esta técnica de despoluição de ambientes contaminados baseada na aceleração do processo natural de biodegradação de determinadas substâncias no meio ambiente. O processo depende de algumas condições ambientais, como temperatura, presença de oxigênio, nutrientes e ph. Essa técnica de limpeza usa microrganismos ou processos microbianos para reduzir

a concentração e/ou a toxicidade de determinados poluentes, acelerando o processo de biodegradação (Dinardi, 2003).

O uso da técnica de biorremediação foi descoberta através de pesquisas de investigação da degradação de hidrocarbonetos no ambiente natural, nas quais foram identificados alguns microrganismos capazes de usar tais hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia (Santos et al, 1999). Mas, somente após a análise dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo de biodegradação, a técnica passou a ser aplicada na purificação de ambientes contaminados por óleo (Chekol, 2004).

As técnicas de biorremediação podem ser classificadas como ex situ ou in situ. No tratamento ex situ o material contaminado é removido para outro lugar e tratado e na técnica in situ envolvem tratamentos no próprio local contaminado. Segundo Cunningham et al., (1996), outros países vêm pesquisando e estudando esta tecnologia. Exemplo disso são os pesquisadores do Laboratório Nacional de Pesquisa em fitorremediação (Coréia), que transferiram um gene da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para o DNA da *Arabidopsis thaliana*, planta utilizada em pesquisas genéticas, este gene conferiu à *Arabidopsis* tolerância a metais pesados, absorver esses metais do solo, sem que haja prejuízo ao seu crescimento e desenvolvimento (Abrabi, 2004).

## **2.2. Toxicidade do Metal pesado Cd.**

O cádmio (Cd) que tem densidade de  $8,6 \text{ g cm}^{-3}$ , é um dos metais pesados que mais têm sido estudado nos últimos anos, apesar de ser relativamente raro, não encontrado em estado puro na natureza (Souza et al., 2009). É altamente tóxico, não essencial às plantas (Shah et al., 2001; Pereira et al., 2002), ocorrendo na natureza na forma de impureza no minério de zinco. Além disso, ele pode ser encontrado em concentrações relativamente altas em áreas naturais, agrícolas ou de mineração, que tenham recebido aplicações maciças de herbicidas e, ou fertilizantes, em que ele está presente como contaminante (Pereira et al., 2002). O cádmio está presente ainda em vários produtos industrializados como pigmentos, plásticos, produtos da metalurgia e galvanoplastia, pilhas, baterias, esmaltes, vidros, tintas, lâmpadas fluorescentes, resíduos de pneus, óleos combustíveis, lubrificantes,

carvão mineral, fungicida, etc. (Malavolta, 1994; Hall, 2002) e que, se lançados indiscriminadamente na natureza, podem vir a constituir importantes fontes de contaminação. No ambiente, tende a se concentrar nos solos e nos sedimentos de sistemas aquáticos, tornando-se disponível ao sistema radicular de plantas. Dessa maneira, o acúmulo de Cd nos tecidos de espécies vegetais aumenta o risco de transferência, por meio da cadeia alimentar, para seres humanos e animais (Vecchia et al., 2005).

De modo geral, a exposição das plantas a concentrações elevadas de cádmio causa alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e, resulta em rápido declínio da capacidade de absorção e acúmulo deste elemento pelas raízes principalmente em função da redução generalizada do metabolismo (Oliveira et al., 2001; Andrade et al., 2008). Dentre os efeitos mais comuns da toxicidade de cádmio em plantas estão a redução do crescimento vegetal, principalmente o das raízes por deficiências minerais (Shah et al., 2001; Fornazier et al., 2002), com forte influência sobre a produção de biomassa (Knecht et al.; 1994; Soltan & Rashed, 2003; Benavides et al., 2005). Além disso, são observadas várias alterações nas atividades de enzimas-chave de várias rotas metabólicas, incluindo do Ciclo de Calvin, da glicólise e da assimilação do sulfato (Cardoso et al., 2002; Pereira et al., 2002).

### **2.3. Fitorremediação**

Desde o surgimento das primeiras cidades, a humanidade vem utilizando plantas para minimizar os efeitos nocivos das atividades antrópicas. Em 1910, nasce na Rússia a fitorremediação para o tratamento de solos poluídos com metais pesados com a publicação dos trabalhos de Vernadsky ("A biosfera"). O estudo dos fluxos biogeofísicos entre o solo (litosfera), os vegetais (biocenose) e a atmosfera levaram à definição das regras de cálculo de bioacumulação de metais pesados nos vegetais. Na década de 90, nos EUA, o russo Ilya Raskin, inspirando nos antigos trabalhos científicos soviéticos sobre fitoacumulação, desenvolve o conceito de fitoextração. Assim, surgem as primeiras empresas de despoluição através das plantas em solos contaminados por metais pesados (Zhang et al., 2010).

No ano de 2000, o conceito de fitorremediação se generaliza no mundo a partir de vários programas de pesquisas científicas. A Agência de Proteção do Meio ambiente dos EUA publica o primeiro guia de fitorremediação. Hoje os estudos continuam evoluindo, para tornar a prática deste processo uma ferramenta eficiente e economicamente viável. Sendo também, uma alternativa capaz de empregar sistemas vegetais fotossintetizantes e sua microbiota com o fim de desintoxicar ambientes degradados ou poluídos. Em virtude do aumento progressivo de teores de metais pesados no ambiente através das atividades humanas, a sociedade está reagindo quanto as consequências dos poluentes ao meio ambiente aos seres vivos. A ocorrência de áreas degradadas por tais elementos torna-se cada vez mais frequente e preocupante. A fitorremediação é uma tecnologia acessível, com capacidade de atender uma maior demanda, e que apresenta o maior potencial de desenvolvimento futuro (Chekol et al., 2004).

As substâncias alvo da fitorremediação incluem metais chumbo, zinco, cobre, níquel, prata, selênio e cádmio (Pb, Zn, Cu, Ni, Hg, Se, Cd), compostos inorgânicos ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), elementos químicos radioativos urânio, cério e estrôncio (U, Cs, Sr), hidrocarbonetos derivados de petróleo: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos (BTEX), entre outros (Dinardi, 2003). Esta técnica oferece algumas vantagens; grandes áreas podem ser tratadas de diversas maneiras, a baixo custo, com possibilidades de remediar, o solo e subsolo contaminados e ao mesmo tempo ter uma camada de vegetação protetora no ambiente tratado. Entretanto, o tempo para se obter resultados satisfatórios pode ser a longo prazo (Gratão et al., 2005).

Atualmente existe uma necessidade crescente de ampliar técnicas biológicas da remediação com a retirada de metais pesados do solo, como a fitoremediação, que trata de plantas com a capacidade de remoção, transferência, estabilização ou degradação dos metais pesados do solo em consórcio com outros organismos como as bactérias ou através também da mico-rremediação, que consiste no uso de fungos micorrízicos para acumulação de metais, evitando que estes sejam absorvidos pelos seus hospedeiros. Utilizando estas técnicas de remediação, as propriedades biológicas e a estrutura física do solo são mantidas e por não ser tão impactante e de baixo custo, visualmente altera-se positivamente a paisagem e ainda oferece a possibilidade de bio-recuperação dos metais acumulados (Khan et al., 2000). A destruição das coberturas vegetais em áreas

contaminadas por elementos de alta toxicidade potencializa a degradação do solo, promovendo assim: a lixiviação dos contaminantes para o lençol freático, erosão hídrica e eólica, e desta forma pode desencadear o processo de contaminação para outras áreas. A recuperação desses ambientes necessita de estudos de diversas naturezas sobre solo, vegetação e a água. A importância na identificação de espécies tolerantes ou com capacidade de acumular os contaminantes mostra-se fundamental para o sucesso do processo de revegetação da área contaminada (Cunningham et al., 1996).

Segundo Newman, (2004) existem alguns requisitos para a implantação de programas de fitorremediação que devem ser levados em considerações, como as características físico-químicas do solo e do contaminante, e sua distribuição na área. É desejável que as plantas que apresentem potencial para fitorremediação possuam algumas características que devem ser usadas como indicativos para seleção. Qualquer fator que venha ocasionar alguma interferência negativamente no desempenho das plantas deve ser controlado ou minimizado, para favorecer sua ação descontaminante (Baker, 1981).

Há também estudos, desenvolvidos pela Universidade da Geórgia, nos EUA, nos quais a *Arabidopsis thaliana* foi modificada geneticamente, só que com dois genes da bactéria *Escherichia coli*. e com isso, a nova variedade da planta se torna capaz de absorver arsênico do solo (Dinardi et al., 2003).

Como citado anteriormente, a utilização de apenas uma única técnica de remediação às vezes não é eficiente para a retirada de substâncias tóxicas do ambiente. Neste caso a Fitorremediação, torna-se uma técnica importante de consórcio que utiliza plantas, bactérias e até fungos micorrízicos para ser aplicado em solos contaminados por compostos orgânicos e/ou inorgânicos. Como exemplo neste processo pode ser empregado plantas associadas às bactérias para descontaminar sítios com resíduos químicos orgânicos em sua porção superficial. De fato, as áreas contendo plantas apresentam uma biodegradabilidade mais acelerada devido a expansão da população ativa dos microrganismos no solo próximo as raízes das plantas (rizosfera), que se utilizam da fração exudada das raízes como fonte de alimento (Smith & Read, 1997; Chekol et al., 2004).

Para cada elemento, a espécie de planta e a fase de crescimento a distribuição e acúmulo de contaminantes metálicos variam a sua locação. No

sistema metal-planta, o metal pode tender a se acumular nas raízes para uma determinada espécie, enquanto que em outras espécies vegetais, o metal pode tender a se acumular em outros órgãos como caule, folha e fruto (Baker, 1981). (Malavolta, 1994; Kabata Pendias & Pendias, 2000).

Seguindo na associação simbiótica entre planta e microorganismos. Neste âmbito Carneiro et al., (2001) avaliaram plantas herbáceas em solo contaminado por metais pesados e inoculadas por fungos micorrízicos arbusculares, e puderam observar que a mostarda (*Brassica juncea*), com a inoculação dos fungos, teve o melhor resultado em relação à acumulação do chumbo, cádmio e zinco.

Assim, todos os experimentos têm procurado por espécies que possam tolerar e crescer sob as condições inóspitas das áreas pós-mineração e que sejam hiperacumuladoras de metais e, potencialmente, facilitadoras do processo subsequente de revegetação (Raskin et al., 1997). Uma planta pode ter habilidade de extrair, em grande quantidade os metais pesados sendo consideradas hiperacumuladoras, e desta forma podem extrair os metais do solo e armazená-las preferencialmente nas partes aéreas. Além disso, em determinadas situações, a dependendo do objetivo do projeto de revegetação, espera-se que estas espécies possam também funcionar como nucleadoras, formando microhabitats propícios para o surgimento de uma série de novas espécies, dando início ao processo de colonização e sucessão ecológica, aumentando a diversidade de organismos, melhorando as condições de solo, e conseqüentemente, restaurando alguns processos ecossistêmicos (Nascimento & Xing, 2006).

#### **2.4 Uso do eucalipto como planta fitorremediadora.**

O Eucalipto é uma planta pertencente ao gênero *Eucalyptus sp* da família das Mirtáceae, sendo nativo da Oceania e cultivado em diversos países (Hass et al., 2008). Em muitos países utilizam esta cultura em plantios comerciais, entre eles o Índia, Brasil, África do Sul, China, Itália, Israel, Chile e Argentina. No Brasil, existe evidências desde 1825, já se usava com a finalidade de ornamentação e quebra-vento (Pereira et al., 2005). O Brasil destaca-se como a maior área plantada de eucalipto do mundo, sendo a cultura arbórea exótica mais utilizada para

reflorestamento (Pavan et al., 2010). É uma planta que produz grande volume de fitomassa (Santana et al., 1999). Desse modo, verificou-se que o *E. grandis* em solo de acidez média e baixa fertilidade, acumulou 99,4% do metal pesado (Zn) até os seus 5 anos de idade (Bellote et al., 1980).

O eucalipto já foi utilizado para fitoextração de céσιο e estrôncio (Entry e Emmingham, 1995). Devido a sua capacidade de transpiração de 200 a 800 litros árvore<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, foi utilizado no controle hidráulico de metais pesados como: cádmio, cobre e sódio, bem como, para a fitoestabilização e rizodegradação de níquel e mercúrio. Magalhães (2011), ao avaliar o potencial de duas espécies de eucalipto na fitoestabilização de solo contaminado com Zn, observaram que o *E. urophylla*, acumula Zn principalmente no caule, e o *E. saligna* mantém maior parte do Zn retido nas raízes. Sendo considerada uma espécie tolerante a metais pesados (Salt et al., 1998).

Sabe-se que em *E. grandis* o Zn é o segundo micronutriente mais exportado pela colheita, 258,92 mg de Zn por caule aos 7 anos de idade. Desse modo, as espécies de *E. grandis* e *E. urophylla* aparentam uma promissora técnica para fitorremediação de solos contaminados por metal pesado (Bellote et al., 1980).

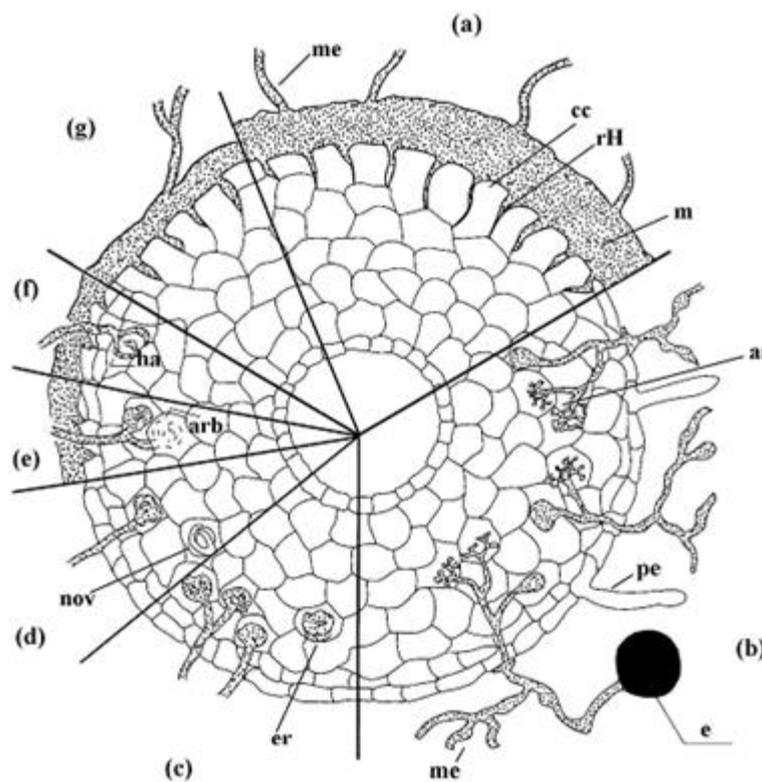
## **2.5 Importância da simbiose fungos micorrízicos – plantas e sua função biológica em áreas com concentrações de metais pesados.**

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre as raízes das plantas e fungos do solo. Esta associação está presente a mais de 450 milhões de anos e tem sido considerada fundamental para a evolução das plantas terrestres (Smith e Read, 2008).

Existem três grupos mais importantes de micorrizas: as ectomicorrizas com crescimento de hifas ao redor da raiz forma uma estrutura chamada de manto e ao redor das células do córtex formando a rede de Hartig, sem ocorrer a penetração de hifas nas células vegetais; as micorrizas arbusculares caracterizadas pelo desenvolvimento de hifas inter e intracelular, formando intracelularmente estruturas como arbúsculos e vesículas (Figura1); e as micorrizas orquidoides, específica às plantas da família Orchidaceae, possuindo desenvolvimento intracelular de hifas

formando estruturas emaranhadas e enoveladas, os pelotons, cuja função é fornecer açúcares simples para o embrião da planta (Smith e Read, 2008; Imhof, 2009).

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



**Figura1:** Esquema modificado de corte transversal de raiz demonstrando os diversos tipos de associação micorrízica entre plantas e fungos os mais frequentes: ectomicorrizas (ECM) (a), micorrizas arbusculares (AM) (b), micorrizas ericóides (c), micorrizas orquídeas (d), micorrizas arbutóides (e), micorrizas monotrepóides (f) e arbusculo (ar), “arbutóides” (arb), célula cortical (cc), esporo (e), enrolamentos (er), “haustórios” (ha), manto (m), micélio extrarradicular (me), novelos (nov) e rede de Hartig (rH) (Azul 2002, modificado a partir de Deacon 1997)

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

Em geral as plantas com esse tipo de associação produzem maior quantidade de massa vegetal, tendo a capacidade de absorver e acumularem mais metais pesados em comparação a plantas sem esta interação (Silva et al., 2006). Através de programas de recuperação de solos contaminados com vários metais, a introdução de espécies vegetais é uma alternativa favorável principalmente se for atrelada aos potenciais de microrganismos bioacumuladores de metais como os fungos micorrízicos (Jones & Hutchinson, 1986; Dixon, 1988; Dixon & Buschena, 1988). (Shaw, 1989; Carneiro et al., 2001).

Com as raízes micorrizadas ocorre o aumento da área de superfície para absorção de nutrientes. O efeito desta simbiose repercute no aumento da absorção de fósforo, na ciclagem de micronutrientes entre o solo e as raízes e no fornecimento para plantas de diferentes formas de N (Street et al., 2007). Os fungos micorrízicos produzem substâncias que induzem alterações morfológicas nas raízes, promovendo o crescimento de plantas. Benefícios indiretos a esta simbiose, proporciona maior tolerância a diversos estresses bióticos ou abióticos em que as plantas são submetidas (Brundett, 2009; Sousa et al., 2006).

A inoculação de fungos ectomicorrízicos, para as aplicações biotecnológicas visando à produção de mudas vigorosas e resistentes às condições de estresse de campo, é um dos métodos hoje utilizado na inoculação das mudas ainda no viveiro, contribuindo para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas na área de plantio. Além disso, antecipa a simbiose entre fungo e planta, gerando mudas de maior qualidade. É possível que as ectomicorrizas contribuam significativamente para a tolerância de espécies arbóreas, como o eucalipto, a solo contaminado por metais pesados (Moreira, 2006).

## 2.6 O mecanismo de tolerância e a importância das enzimas anti-oxidantes a metais pesados

O micélio fúngico apresenta entre outras a capacidade de retenção de metais devido à sua densidade extraradicular, podendo reduzir a absorção de metais na planta hospedeira (Brown & Wilkins, 1985; Colpaert & Van Assche, 1992). Desta forma os mecanismos de tolerância a metais por fungos ectomicorrízicos podem envolver a ligação de metais pesados com componentes da parede celular, como: quitina, melanina, celulose e seus derivados (Galli et al., 1994; Graziotti et al., 2001), algumas proteínas, como: metalotioneína, fitoquelatinas e glutatona (Morselt et al., 1986; Hall, 2002; Courbot et al., 2004) e grânulos (Tam, 1995).

No caso dos fungos ectomicorrízicos, a grande maioria dos metais pesados podem ser translocados 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 a glicose (Portillo, 2000).

O transporte de metais pesados na membrana plasmática pode ocorrer devido à presença de transportadores primários e secundários. As bombas são proteínas de membrana que realizam o transporte ativo primário de íons como o  $H^+$  ou  $Ca^{2+}$ , que gera um gradiente eletroquímico ao transportar íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se para isso compostos ricos em energia como o ATP (Taiz e Zeiger, 2002).

Outro mecanismo é necessário para direcionar a absorção ativa da maioria dos nutrientes, chamado transporte secundário de  $H^+$ . Neste mecanismo, os solutos podem ser transportados pela membrana, a favor de um gradiente eletroquímico, por meio da combinação do  $H^+$  com o íon. Este tipo de co-transporte é denominado de transporte secundário de  $H^+$ , em que a energia necessária para esta ação é proveniente da força próton-motriz, gerada pela hidrólise do ATP realizada pelas  $H^+$ -ATPases (Morsomme e Boutry, 1999).

O efluxo de íons na membrana plasmática e o transporte destes para dentro dos vacúolos são dois mecanismos potencialmente importantes para reduzir os níveis de metais tóxicos no citosol e garantir a tolerância a tais metais (Hall, 2002).

Segundo Rauser, 1999; Clemens, 2001, uma vez dentro da célula, a quelação dos metais por ligantes de alta afinidade, como exemplo, os aminoácidos, ácidos orgânicos e duas classes de peptídeos, as metalotioneínas e as fitoquelatinas, pode ocorrer. Um segundo sistema de defesa entra em ação, a compartimentalização vacuolar, em que o complexo metal-quelante é transportado e acumulado no vacúolo através de um co-transporte do tipo antiporte Metal/H<sup>+</sup>, cuja energia é proveniente do gradiente eletroquímico gerado pelas ATPases e íons de H<sup>+</sup>, promovendo, desta forma, a redução da concentração dos íons tóxicos no citoplasma, prevenindo danos à fisiologia e bioquímica dos processos celulares e mantendo a homeostase celular

Em plantas tolerantes especula-se que os sistemas de transporte do tonoplasto sejam resistentes a estes metais tóxicos uma vez que esta organela exerce vários papéis chave no metabolismo vegetal. Um grande número de enzimas está presente no vacúolo como as proteases, ribonucleases, e outras hidrolases ácidas, o que lhe confere o caráter de organela lítica da célula vegetal, degradando e reciclando compostos durante a senescência ou na morte celular programada (Taiz, 1992).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

Este fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (isolado 24), originário de Michigan-EUA, foi cedido da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). *P. tinctorius* (isolado ES01) foi coletado em um solo latossolo vermelho-amarelo de um plantio de eucalipto no distrito de Biriricas (20°22'16"S/40°35'08") no município de Marechal Floriano, estado do Espírito Santo, Brasil.

#### Metal pesado (Cádmio)

As atividades desenvolvidas nas instituições de ensino e pesquisa empregam substâncias e produtos de diversas classes. Entre eles estão os considerados perigosos por apresentarem características como inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade estabelecidas pela NBR 10.004 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT\_NBR 10.004) e que oferecem risco potencial aos seres vivos e/ ou ao ambiente. Essas atividades, conseqüentemente, geram resíduos também considerados perigosos. Destinar corretamente esses resíduos é responsabilidade de seus geradores o que é determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Desta forma todos os resíduos de solo, soluções de Cádmio e embalagens utilizadas na casa de vegetação, foram destinadas a Empresa Marca Ambiental, localizada no Município de Cariacica, que faz a destinação correta dos materiais e substâncias tóxicas (Cádmio) utilizadas nesta pesquisa.

#### 3.2 Especificação e meio de cultura

Discos de ágar contendo micélio de *P. tinctorius* (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<sub>2</sub> (0,05g/L), NaCl (0,025g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,15g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,15g/L), FeCl<sub>3</sub> (1g/L); e 4mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,125g/L) e tiamina (25µg/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±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 cádmio, 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 Cd<sup>2+</sup>, pois a composição do mesmo oscilava com a dose de metal estudada.

### **3.3 Experimento in vitro do crescimento do fungo *Pisolithus tinctorius***

Micélios de 11 mm de diâmetro foram retirados das extremidades de culturas puras de *P. tinctorius* (isolado 24) com 27 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, 10, 50, 100 e 200 µmol L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> na forma de CdCl<sub>2</sub>, sob três status de glicose (1 e 1g L<sup>-1</sup>).0,1 e 1 gL<sup>-1</sup> Foi adicionada uma baixa concentração de tampão MES 100 µmol L<sup>-1</sup>, 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.

### **3.4 Experimento in vivo e análise da associação eucalipto-fungo sob doses de Cd<sup>2+</sup>**

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. tinctorius* 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), Controle e mais duas doses de metal e 5 repetições. As plantas foram regadas com solução de metal, pH 5,6, contendo as doses de 0, 15, 35  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  duas vezes por semana, e a solução de Clark diluída (4x) foi administrada nos tratamentos três vezes por semana. Após 90 dias no plantio as amostras de plantas foram desidratadas em estufa de ventilação forçada, a uma temperatura de cerca de 75°C por 48hs. Uma vez desidratado, o material vegetal foi pesado para determinação da matéria seca. A eficiência micorrízica foi calculada com base na massa de material seco total ( $\text{MStotal} = \text{MSPA} + \text{MSR}$ ) segundo a fórmula:

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

### 3.5 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  $\text{cm}^2$ . 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  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , sem aquecimento do tecido foliar.

### 3.6 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., 1997), 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 (MS total = MS PA + MSR) segundo a fórmula: Eficiência Micorrízica (%) = [(MS total planta micorrizada – MS total planta-controle)/(MS total planta-controle)] 100

### **3.7 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).

### **3.8 Determinação de proteínas totais de *Pisolithus tinctorius* 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.

### **3.9 Determinação da catalase em *Pisolithus tinctorius* e raízes de *Eucalyptus grandis* não micorrizadas e em associação ectomicorrízica**

Para a determinação da catalase, o micélio do fungo *P. tinctorius* e as raízes das plantas de *E. grandis* micorrizadas e não micorrizadas foram homogeneizados em 50  $\mu$ M tampão TRIS-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA, e centrifugados a 15.000 x g, durante 15 minutos a 4<sup>o</sup> C. A atividade da CAT foi determinada segundo método descrito por Beutler (1975). O meio de reação, 1 ml, continha 40  $\mu$ M tampão TRISH Cl, pH 8,0 com 5  $\mu$ M de EDTA e 12  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi iniciada pela adição de 10 $\mu$ L 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.

### **3.10. Determinação da glutathione S-transferase em *Pisolithus tinctorius* 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  $\mu$ M tampão de fosfato de potássio, pH 6,5, e centrifugados a 15.000 x g durante 15 minutos a 4<sup>o</sup> C. A atividade da GST foi determinada segundo método definido por Habig et al., (1974). A reação foi iniciada pela adição de 50 $\mu$ L de extrato enzimático em meio de reação contendo 20  $\mu$ M tampão fosfato de potássio pH 6,5, 80  $\mu$ M de glutathione reduzida (GSH) (Sigma G6529) e 20  $\mu$ M 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  $\mu$ mol de substrato por minuto. A atividade de GST foi expressa em porcentagem de estimulação em relação ao controle.

### **3.11 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).

Em experimentos in vivo foram dispostos em blocos casualizados com quatro repetições. O efeito da inoculação de fungos e tratamento Cd no crescimento total da planta, massa seca, os teores de nutrientes, os parâmetros de atividades enzimáticas, fotossíntese e fluorescência da clorofila foram analisados estatisticamente pela ANOVA de duas vias e quando um fator ou qualquer interação entre fatores foram considerados estatisticamente significativos, realizamos comparações de pares, por meio de teste t e corrigir os resultados correspondentes para comparações múltiplas pelo teste de Tukey a  $p \leq 0.05$ . Os dados de eficácia micorrízica e raiz de colonização fúngica foram analisados estatisticamente pela análise de variância após Arc sen de transformação para porcentagens. Quando um efeito significativo do tratamento foi encontrado, os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey's em  $p \leq 0.05$ . Todas as análises foram realizadas no programa de R e Graph Pad Prism 6.0 utilizando um nível de significância de 5% para testes de hipóteses. Análise multivariada de componentes principais (PCA) foi usada para relacionar o teor de nutrientes, o crescimento das plantas e os parâmetros ecofisiológicos, bem como atividades de GST e CAT em tratamentos micorrizadas e não-micorrizadas com as doses de CD, utilizando o programa Fitopac 2.1.2.85.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Biodisponibilidade dos nutrientes e metal pesado no meio de cultura.

De acordo com a especiação feita através do programa Visual MINTEQ foi possível obter uma alta biodisponibilidade de Cd (entre 72% e 73%) e dos macros e micronutrientes em torno de 89% a 99%. 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).

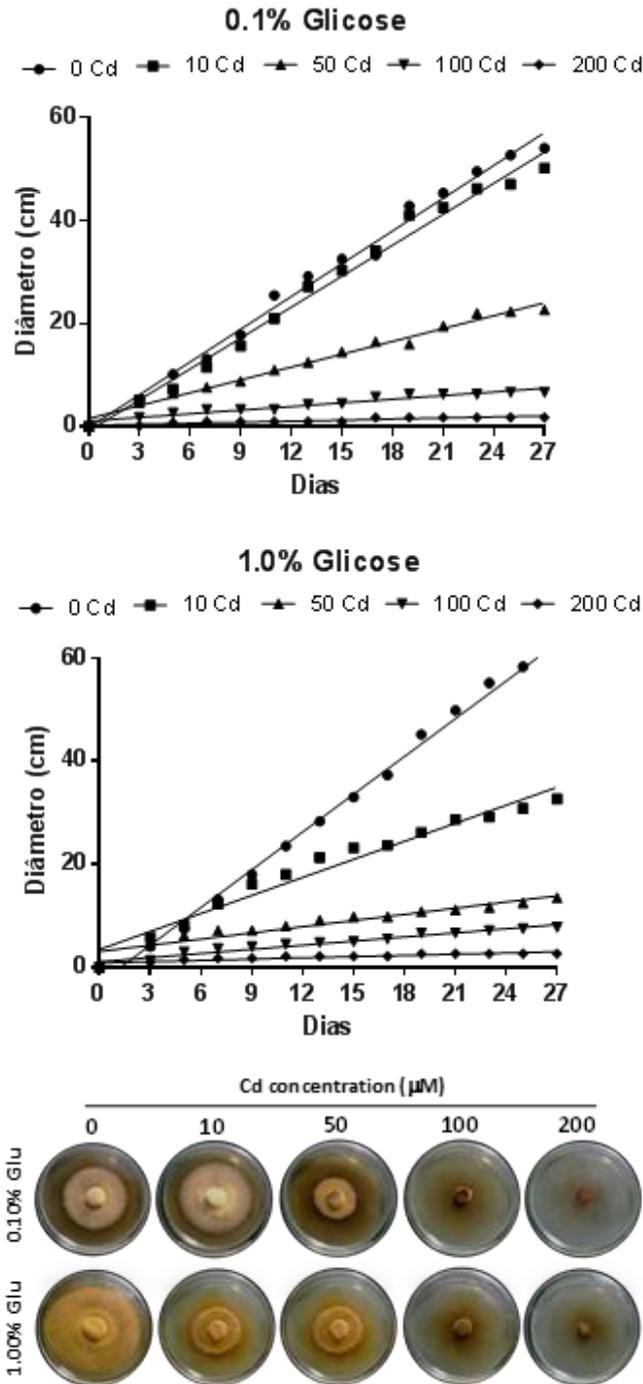
**Tabela 1.** Concentrações de íons prevê a biodisponibilidade (%) de cada metal no de meio cultura MNM modificado e adaptado sendo utilizado tanto para o crescimento ectomicorrízico e síntese in vitro. O estado não associado livre do íon é, na maioria dos casos, assumido como sendo a forma biodisponível do íon. As leituras foram realizadas pelo Visual Minteq v.2.53 (Parker et al., 1995; Ward et al., 2008; Ramos et al., 2009) e foi incluído na análise 180 µM de Fe-EDTA.

		Cd <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
MNM medium	Control	0	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,38
	0,010 M <sup>2+</sup>	0,01	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,40
	0,050 M <sup>2+</sup>	0,05	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,48
	0,100 M <sup>2+</sup>	0,1	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,58
	0,200 M <sup>2+</sup>	0,2	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,78
	Control	0,00	90,81	91,81	99,26	89,44	90,66	99,31	99,71
Predicted	0,10 M <sup>2+</sup>	73,43	90,76	90,74	99,26	89,46	92,69	99,31	99,46
Availability	0,050 M <sup>2+</sup>	72,17	90,55	90,48	99,26	89,51	92,65	99,30	99,47
(%)	0,100 M <sup>2+</sup>	72,93	90,29	90,16	99,26	89,57	92,72	99,31	99,21
	0,200 M <sup>2+</sup>	72,46	89,79	89,54	99,26	89,68	92,78	99,30	98,73

#### **4.2 Crescimento de micélio de *P. tinctorius* com a disponibilidade (0,1 e 1% de glicose para avaliação da sua tolerância ao metal cádmio nas concentrações de (10, 50, 100 e 200 $\mu$ M) por 27 dias.**

Na concentração 0,1% de glicose houve uma inibição significativa do crescimento do micélio fúngico nas doses de 50, 100 e 200 $\mu$ mol de Cd, quando comparado ao controle 0 $\mu$ mol de Cd. Na concentração de 1 % de glicose observou-se uma inibição significativa em todas as doses de Cd analisadas, sendo que, as maiores inibições ocorreram quando o fungo foi crescido sob 10 e 50  $\mu$ M de Cd, em ambas concentrações de glicose. Não foi observado nenhuma diferença significativa entre as doses de 0 e 10  $\mu$ mol Cd na dose de 0,1% de glicose (Figura 2). Mesmo com a inibição pode ser observado crescimento micelial de *P. tinctorius* em meio MMN nas concentrações 0;10 e 50 $\mu$ M em 0,1% (A) e 1% (B) de glicose.

É importante destacar que a maior velocidade máxima de crescimento micelial foi de 2,222 mm/dia no controle e em ambas doses 0,1 e 1% de glicose. Nas demais dosagens foi observado a diminuição da velocidade de crescimento com o aumento das concentrações de doses de Cd administradas (Tabela 2).

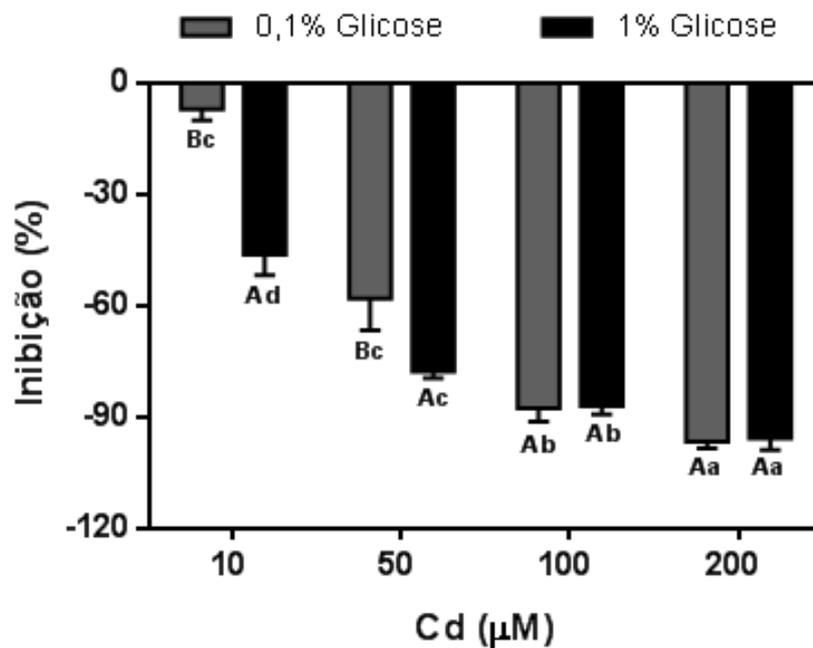


**Figura 2:** Crescimento *in vitro* de micélio fúngico de *P. tinctorius* com adição de 0,1% e 1% de glicose nas concentrações (10, 50, 100 e 200  $\mu\text{mol}$ ) de Cádmio por 27 dias. Fotografia de placas com fungos *P. tinctorius* com percentuais de 0,1 e 1% de glicose e concentrações no meio (10, 50, 100 e 200  $\mu\text{mol}$ ) de Cádmio por 27 dias.

**Tabela 2:** Medidas de velocidade de crescimento do micélio fúngico (mm/dia), nas doses de Cd (0, 10, 50, 100, 200  $\mu\text{mol}$ ) e 0,1% e 1,0% de Glicose.

Medidas de velocidade de crescimento do micélio fúngico (mm/dia), nas doses d Cd (0, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}$ ) e 0,1% e 1,0% de Glicose.		
	Dose de 0,1% Glicose	Dose de 1,0% Glicose
Dose. Cadmio $\mu\text{M}$	Veloc. de Cresc.	Veloc. de Cresc.
0	2,222 mm/d	2,222 mm/d
10	2,148 mm/d	1,111 mm/ d
50	0,925 mm/d	0,444 mm/d
100	0,296 mm/d	0,295 mm/d
200	0,07 mm/d	0,111 mm/d

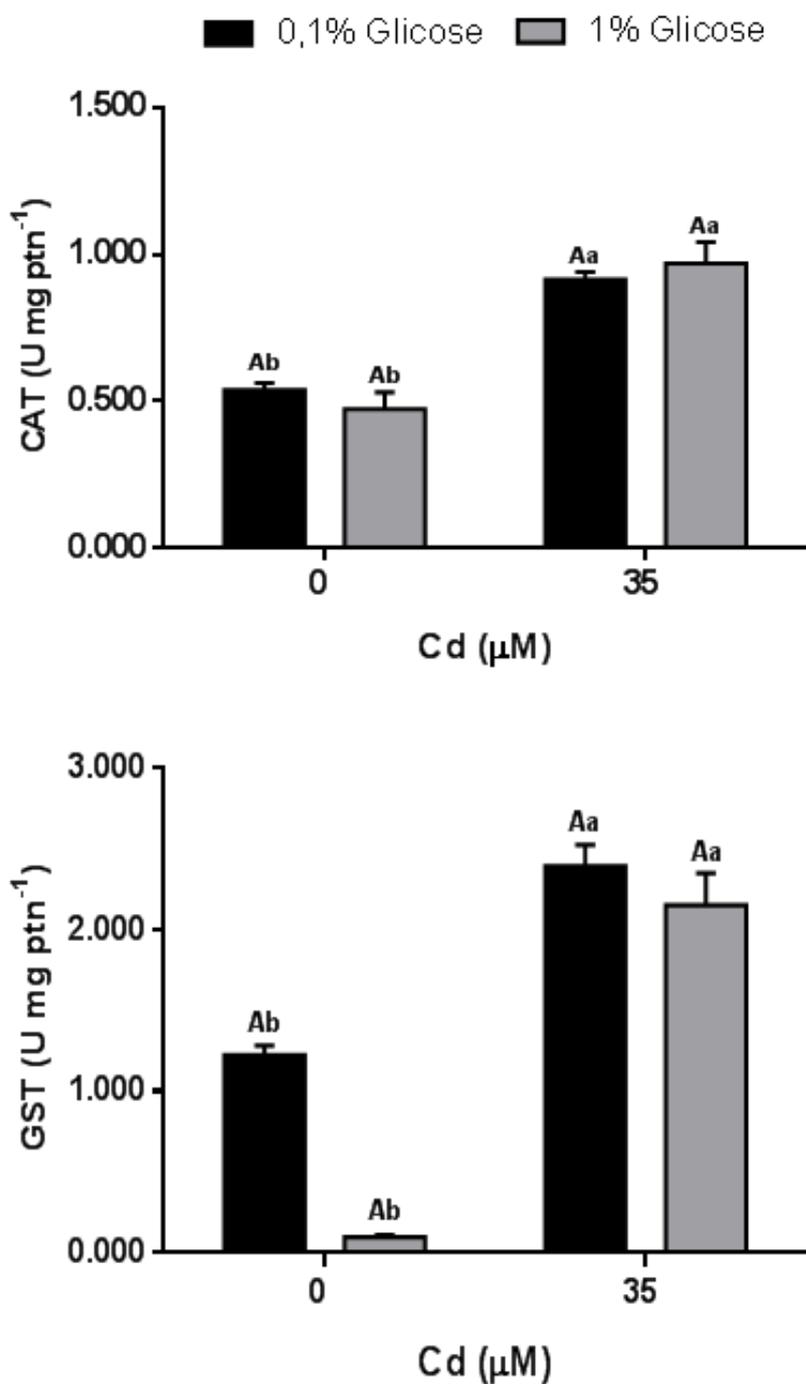
Após o período de 27 dias de crescimento em meio MNM, observou um maior crescimento do *P. tinctorius* nas maiores concentrações de Cd (100 e 200 $\mu\text{mol}$ ) e não apresentaram diferença significativa na taxa de inibição independente das concentrações de glicose (0,1 e 1,0%). Em contrapartida, *P. tinctorius* crescido em 10 e 50  $\mu\text{mol}$  Cd mostrou uma maior inibição, de acordo com as porcentagens de -46,1479 e -77,748 respectivamente, quando o *P. tinctorius* cresceu em meios contendo 1% de glicose (Figura 3).



**Figura 3:** Porcentagem de inibição do crescimento *in vitro* de micélio fúngico de *P. tinctorius* com adição de 0,1% e 1% de glicose nas concentrações (10, 50, 100 e 200 µM) de Cádmio por 27 dias.

**4.3. Avaliação da atividade enzimática da CAT, GST e FAC, no micélio de *P. tinctorius* crescidas *in vitro* em concentrações 0,1 e 1% de glicose (0 e 35 µM) de Cádmio.**

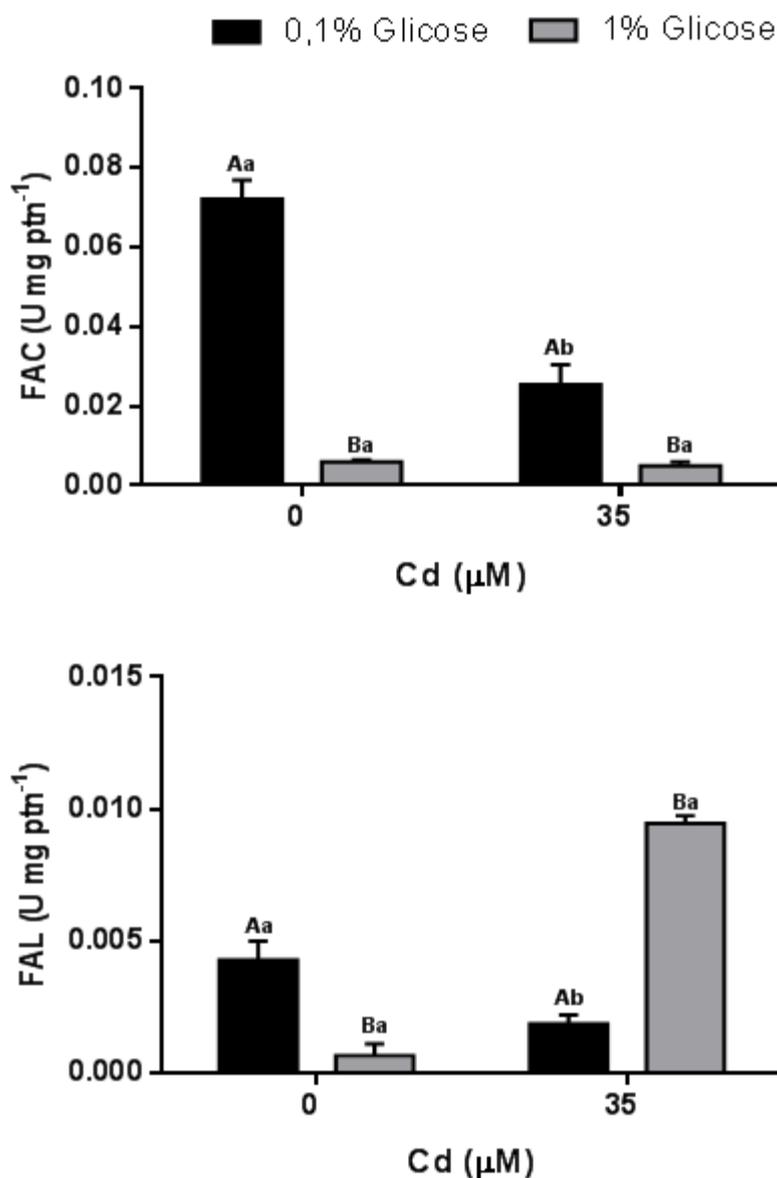
A atividade da CAT em *P. tinctorius* foi estimulada por 35 µm de Cd em ambas concentrações de glicose (Figura 4A). Ativação promovida pela glicose na atividade da Catalase foi observada nas duas doses de concentração de glicose. Similar a atividade de CAT, a atividade da Glutamina-S-Transferase (GST) também apresentou uma significativa estimulação na concentração de 35 µM de Cd. No entanto devemos destacar que a maior estimulação foi observada na concentração de 1% de glicose (Figura 4B).



**Figura 4:** Atividade das enzimas CAT e GST analisadas no micélio de *P. tinctorius* crescidas *in vitro*, em concentrações de 0,1e 1 % de glicose e na condição de controle e 35 μM de Cádmiio.

A atividade da Fosfatase ácida mostrou-se ser elevada em 0,1% de glicose quando comparada a 1% de glicose. A adição de 35 μM de Cd induziu uma

significativa taxa de inibição quando comparado a 1% de glicose. Já a Fosfatase alcalina sofreu uma regulação negativa em 0,1% de glicose enquanto que foi significativamente estimulada quando o fungo foi crescido na presença de 35  $\mu\text{M}$  de Cd. (Figura 5 A, B)

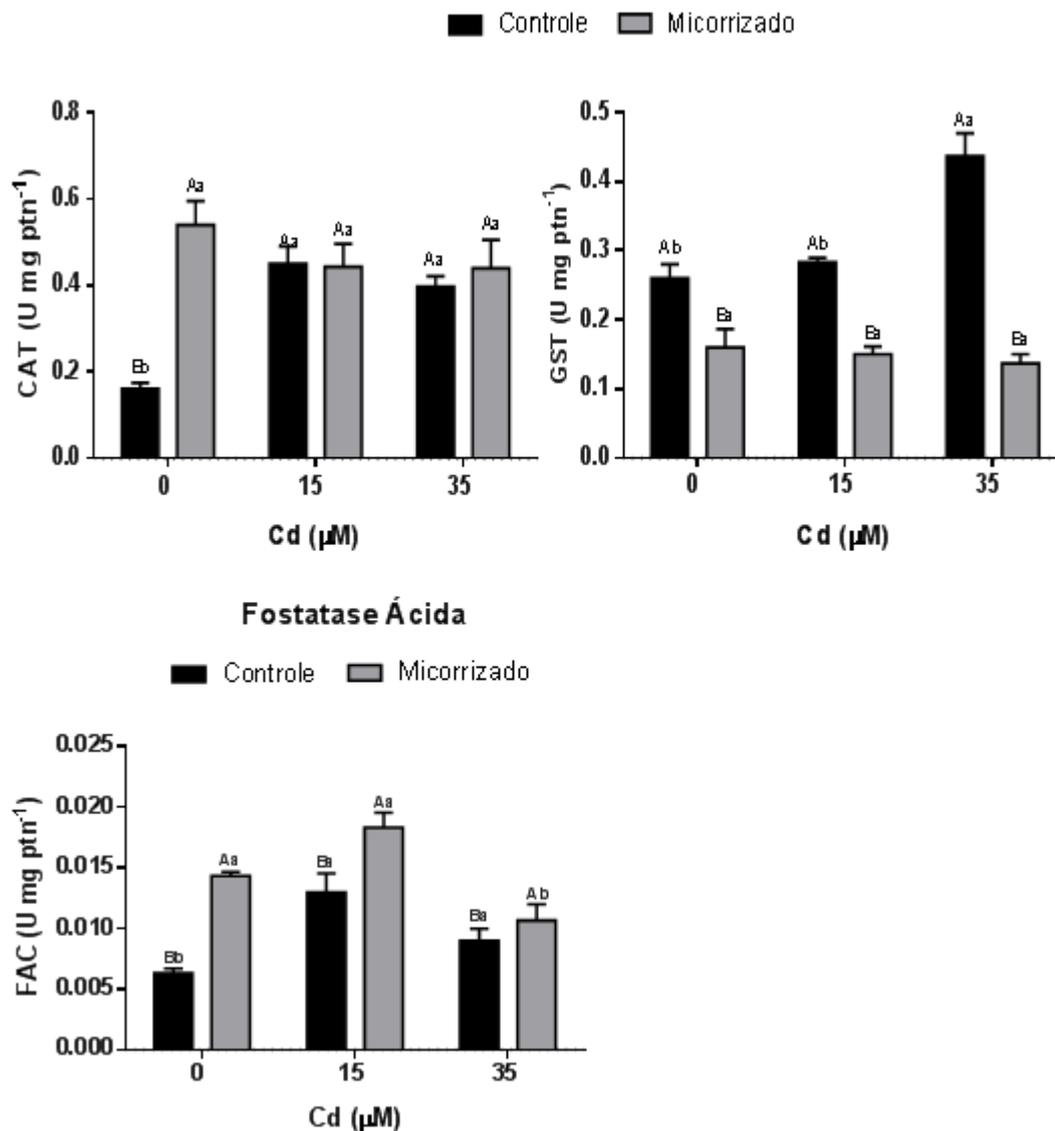


**Figura 5:** Atividade das enzimas FAC (Gráfico A) e FAL (Gráfico B) analisadas no micélio de *P. tinctorius* crescidas in vitro, em concentrações de 0,1e 1 % de glicose e na condição de controle e 35  $\mu\text{M}$  de Cádmiio.

#### **4.4 Avaliação da Atividade enzimática da CAT, GST, FAC FAL em raízes de plantas *Eucalyptus grandis* micorrizadas e não micorrizadas.**

Atividade da CAT em plântulas não micorrizadas foi significativamente estimulada na presença do Cd, enquanto em plântulas micorrizadas não apresentou efeito significativo. No entanto plântulas micorrizadas possuem elevadas atividade dessa enzima mesmo na ausência do metal (Figura 6A). Por outro lado, plântulas micorrizadas apresentaram valores da enzima GST significativamente inferior quando comparadas com o controle. As plântulas não micorrizadas apresentaram significativo estímulo independente do tratamento com o metal (Figura 6B).

A atividade FAC foi relativamente superior em plântulas micorrizadas sem do que a maior estimulação foi em plantas controle (Figura 6C). Não foi constatado atividade da fosfatase alcalina (FAL) em raízes de *E. grandis*.



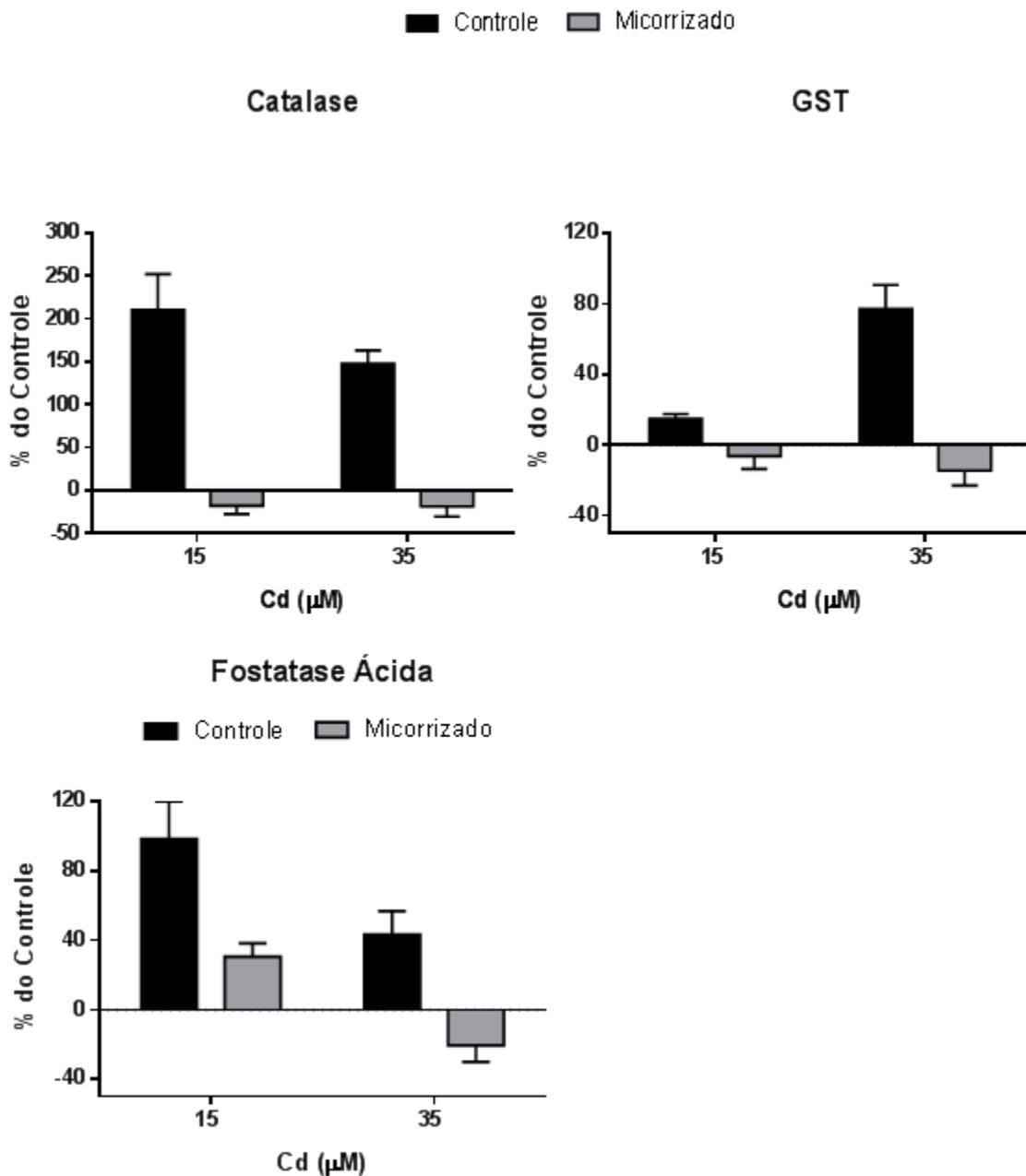
**Figura 6:** Estimulação da atividade da Catalase (gráfico A) glutathione-S-transferase (gráfico B) e da Fostatase ácida (gráfico C) em raízes de plantas de *Eucalyptus grandis* não micorrizada e micorrizada, crescendo em concentrações de 15 e 35 µmol de Cd.

Porcentagem de estimulação da atividade enzimática da Catalase, glutathione-S-transferase e da Fostatase ácida em plantas de *E. grandis* não micorrizada e micorrizada nas concentrações de 15 e 35 µmol de Cd.

Para a atividade enzimática da catalase com tratamento nas doses de 15, 35µmol de Cd foi observado que nas plantulas micorrizadas ocorreu maior inibição da atividade enzimática. Mas que para as plantas controle ocorreu estimulação na atividade enzimática mesmo com o tratamento de 15, 35 µmol de Cd.

Para a atividade de Glutathione-S-Transferase também ocorreu inibição da atividade enzimática das plantas micorrizadas e para as plantas de controle ocorreu a estimulação da atividade enzimática nas doses de 15, 35 $\mu$ mol de Cd. Sendo observado maior estímulo da atividade enzimática na dose de 35  $\mu$ mol de Cd.

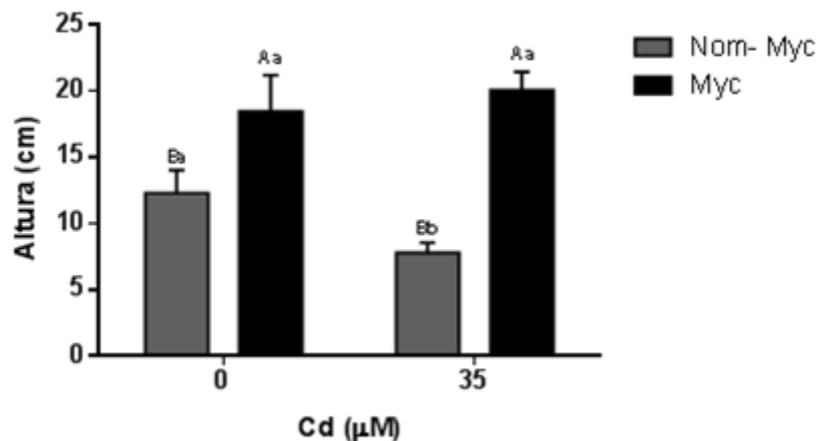
Na atividade da enzima Fosfatase ácida ocorreu estimulação da atividade enzimática nas plantas micorrizadas na dose de 15  $\mu$ mol de Cd e inibição da atividade enzimática GST nas doses de 35  $\mu$ mol de Cd. Para as plantas controle ocorreu estimulação da atividade enzimática, sendo que, com o aumento da dosagem esta estimulação foi reduzida em 35  $\mu$ mol de Cd (Figura 7).



**Figura 7:** Porcentagem de estimulação da atividade enzimática da Catalase, glutationa-S-transferase e da Fosfatase ácida em plantas de *E. grandis* não micorrizada e micorrizada, crescendo em concentrações de 15 e 35 μmol de Cd.

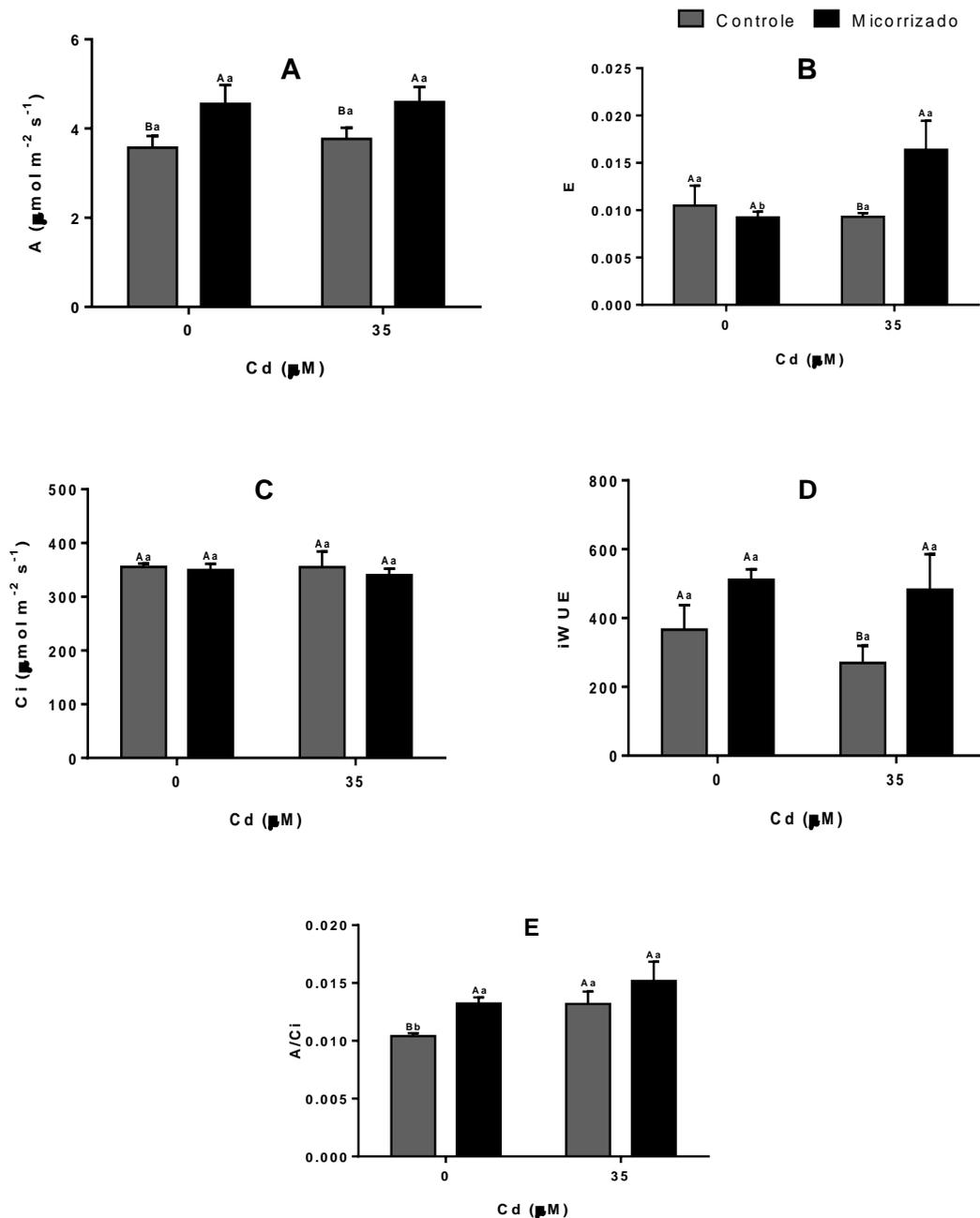
#### 4.5 Respostas ecofisiológicas

O resultado da altura das plantas não micorrizadas mostrou-se uma inibição significativa 30 μmol Cd, enquanto que as plantas micorrizadas não foram influenciadas pelas doses de Cádmio (Figura 8).



**Figura 8:** Gráfico demonstrando o resultado da altura de plantas de *E. grandis* micorrizadas e não micorrizadas com tratamentos de 0 e 35 μmol de Cd.

A capacidade fotossintética medida através da assimilação de carbono (A) em plantas controle e micorrizadas diferiram significativamente tanto na dose de 0 μmol Cd ( $p \leq 0.0053$ ) quanto na dose de 35 μmol Cd ( $p \leq 0.0177$ ), tendo as plantas micorrizadas apresentado maior capacidade fotossintética em relação as plantas controle (Figura 9A). Entretanto as doses de Cd não afetaram significativamente a capacidade fotossintética ( $p \leq 0.4886$ ) (Figura 9A). Plantas controle e micorrizadas apresentaram valores semelhantes de transpiração (E) sem a adição de Cd (Figura 9B). Entretanto plantas de *E. grandis* com adição de 35 μM Cd quando micorrizadas apresentaram valores de transpiração 76,16% superior as plantas controles (Figura 9B), sendo este resultado semelhante ao da eficiência no uso d'água intrínseco (Figura 9D). A inoculação de plantas *E. grandis* não influenciou significativamente nos valores de Carbono Interno (Ci) ( $p = 0.3187$ ), assim como as doses de Cd ( $p = 0.6232$ ) (Figura 9C). Nas plantas controle a eficiência da carboxilação instantânea (A/Ci) foi maior com a adição de 35 μM Cd ( $p = 0.0447$ ) (Figura 9E). Em contrapartida a dose de Cd não influenciou nas plantas micorrizadas, entretanto quando não houve a adição de Cd os valores de A/Ci nestas plantas foram significativamente superiores ao encontrado nas plantas controle ( $p \leq 0.0417$ ) (Figura 9E).



**Figura 9:** Assimilação de Carbono (A) (A); Transpiração (E) (B); Concentração interna de Carbono (Ci) (C); Eficiência no Uso d'água intrínseco (iWUE) (D); Eficiência na Carboxilação (A/Ci) (E) nas folhas plantulas de *E. grandis*, controle e micorrizadas, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados pela two-way ANOVA combinada com o teste de Tukey. Para cada concentração de Cd, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula nos diferentes tratamentos (Controle e Micorrizado), não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $p \leq 0.05$ . Para cada tratamento (Controle e Micorrizado), as barras seguidas da mesma letra minúscula, na mesma concentração de Cd, não são significativamente diferentes a  $p \leq 0.05$  ( $n=4$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Plantas de *Eucalyptus grandis* colonizada por *P. tinctorius* vem a ter um benefício muito importante nesta associação de ectomicorriza sob a forma de tolerância a concentrações de Cd no solo. Assim, as plantas micorrizadas podem ser cultivadas em solos que contêm o metal pesado Cd, como resultado das atividades de mineração ou industriais e contribuir para a sua recuperação (Marschner 2012). A tolerância a metais pesados por fungos ectomicorrízicos é comum em condições axênicas (meio controlado sem contaminação), no entanto, o grande problema nestas condições é que o metal pode interagir com outros nutrientes no meio (Gadd, 1993). 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 do Cd fosse reduzida no meio de cultura.

Em geral, o crescimento in vitro de *P. tinctorius* não foi afetada por Cd em qualquer concentração, mas foi fortemente estimulada por glicose no meio. Similarmente, o crescimento de alguns fungos ectomicorrizos também foram estimuladas pela glicose (Kim et al., 2003). A resposta in vitro de fungos ectomicorrízicos tratados com metais (Zn, Cu, Cd, Pb, Ni e Al) é bastante variável, tanto inter e intra-específica (Jones e Hutchinson 1986; Brown e Wilkins 1985; Colpaert e Van Assche 1993; para 1995; Blaudez et al 2000; Kim et al 2003; Fomina et al 2005).

A tolerância de fungos ectomicorrízicos é tanto extracelular (micélio extramatricial fornece os principais sítios de ligação para os metais tóxicos) e intracelular (ligação a sítios não proteicos e transporte em compartimentos intracelulares), Bellion et al., 2006) Outro fator importante são os pigmentos de melanina presente nos fungos, são responsáveis pela formação de compostos fenólicos da polimerização oxidativa e parece desempenhar um papel na ligação e quelação de metal (Fogarty e Tobin 1996).

A glicose tem efeitos importantes sobre o metabolismo e fisiologia de fungos, tais como em *P. tinctorius* com o aumento da produção de melanina na atividade da

catalase e glutathione-S-transferase (GST) quando a glicose está livremente disponível, sistemas de desintoxicação antioxidantes podem também ser parte de mecanismos de tolerância a metais por fungo ectomicorrízicos na desintoxicação ou reparação. Em *Candida albicans*, foi associado a tolerância ao estresse, mesmo com apenas 0,01% de glicose no meio nutritivo (Rodaki et al. 2009).

Defesas antioxidantes fúngicas, como Catalase, são um mecanismo eficiente para a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado sob condições de estresse em metais (Angelova et al., 2000). As enzimas de desintoxicação como a Glutathione-S-Transferase (GST) são enzimas de desintoxicação envolvidas na desintoxicação celular por catalisar a conjugação de GSH com a xenobióticos e produtos do stress oxidativo endógenos (Hayes et al., 2005). Além disso, os genes de GST são induzíveis por uma variedade de diferentes tratamentos, tais como os metais pesados e fungos podem produzir uma variedade de GSTs (Sato et al., 2009). Em levedura, CAT e GST se sobrepõem como mecanismos de desintoxicação, por exemplo como a CAT pode ser induzida somente quando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exceder a capacidade de desintoxicação de GSH (Grant et al., 1998). Assim, *P. tinctorius* pode ser protegido por ativação destes outros mecanismos de desintoxicação. Por outro lado, seria de esperar que as enzimas (CAT) envolvidas na desintoxicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seriam induzidos a manter o equilíbrio redox celular (Ott et al., 2002; Schützendübel e Polle 2002).

Durante a associação da planta colonizada por fungos micorrízicos responderam fracamente ou não a atividade CAT em 200 µM Cd, em contrário com as plantas não micorrizadas. Atividade GST também foi ativado em plantas não micorrizadas.

Experimentos realizados com plantas que crescem em rejeitos de uma mina de Cd apresentaram maior atividade da enzima antioxidante, incluindo CAT, do que as plantas que crescem em outros lugares. Além disso, a atividade de CAT em *Vigna radiata* em 500 µM Cd foi maior do que nenhuma das plantas tratadas (Sinha et al., 2005). O Cd em grandes quantidades interfere com a absorção e utilização de outros minerais (Clark, 1982), afeta o metabolismo da energia, diminui a fotossíntese (Campbell e Nable 1988; Kitao et al., 1997). E provoca estresse oxidativo (Fecht-Christoffers et al, 2003). O Cd em excesso influencia na estrutura dos cloroplastos, comprometendo as trocas gasosas e reduzindo a concentração de carboidratos solúveis na planta. Alguns passos na fotossíntese também podem estar seriamente

e negativamente afetada pelo excesso de Cd (Mukhopadhyay e Sharma 1991; Macfie e Taylor 2008).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *P. tinctorius* beneficia a associação com plantas de *E. grandis* tornando-se tolerante às concentrações elevadas de Cd no solo, e especialmente, esta tolerância pode ser expressada na presença de concentrações de glicose em meio de cultura.

As enzimas catalase e glutathiona-S-transferase foram ativadas pela glicose, sugerindo que estão envolvidas no mecanismo da tolerância fúngica ao Cd. Quando associado com raízes de plantas de eucalipto, o fungo ectomicorrízico estimulou o crescimento de acolhimento em um substrato com alta concentração de Cd.

Ficou demonstrado claramente que o fungo ectomicorrízico é eficiente na redução do stress das plantas imposta por Cd. Assim, o fungo ectomicorrízico foi eficaz para induzir fitoproteção de plantas de eucalipto sob alta concentração de Cd via respostas de ecofisiológicas e bioquímicas.

Estudos adicionais da análise da expressão de alguns genes que codificam para as bombas de prótons, transportadores e enzimas envolvidas em estresse oxidativo são importantes para elucidar a regulação molecular da forma como a simbiose permite resistência a metais.

## 7. REFERÊNCIA

- Adeleke, R. A.; Cloete, T. E. A Bertrand and DP Khasa (2012) Iron ore weathering potentials of ectomycorrhizal plants. *Mycorrhiza* 22:535-544.
- Alleoni, L. R. F.; Iglesias, C. S. M.; Mello, C. S.; Camargo, O. A.; Casagrande, J. C.; Lavorenti, N. A. (2008) Atributos do solo relacionados à adsorção de cádmio e cobre em solos tropicais-DOI: 10.4025/actasciagron. v27i4. 1348. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 27, n. 4, p. 729-737, ISSN 1807-8621.
- Alloway, B.; Alloway, B. (1990) Soil processes and the behaviour of metals. *Heavy metals in soils.*, p. 7-28.
- Andrade, A. F. M.; Sobrinho, A. N. M. B.; Magalhães, M. O. L.; Nascimento, V. S.; Mazur, N. (2008) Zinco, chumbo e cádmio em plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) cultivadas em solo após adição de resíduo siderúrgico. *Ciencia rural*, v. 38, n. 7, p. 1877-1885, ISSN 0103-8478.
- Angelova, M, B.; Pashova, S. B.; Slokoska, L. S. (2000) Comparasion of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. *Enzyme Microb Tech* 26:544-549.
- Azul, A. M. J. R. (2002) Diversidade de fungos ectomicorrízicos em ecossistemas de Montado.
- Baker, A. J. M. (1981) Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition*, v. 3, n. 1-4, p. 643-654. ISSN 0190-4167.
- 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.; Sarruge, J. R.; Haag, H. P.; Oliveira, G. D. (1980) Extração e exportação de nutrientes pelo *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden em função da idade: 1. Macronutrientes. *IPEF*, v. 20, p. 1-23.

- Benavides, M. P.; Gallego, S. M.; Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 17, n. 1, p. 21-34. ISSN 1677-0420.
- Beutler, E. (1975) Catalase. In: Beutler E (ed) *Red Cells Metabolism - a manual of biochemistry methods*. Grune and Straton, New York, pp 89-90.
- Blaudez, D.; Botton, B.; Chalot, M. (2000) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, v. 146, n. 5, p. 1109-1117. ISSN 1465-2080.
- 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.
- Brown, M. T.; Wilkins, D. A. (1985) Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula*. *New Phytol* 99:101–106.
- Brundrett, M.; Bougher, N. M.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuck, N. (1996) *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Pirie Printers, Camberra, Australia.
- Campbell, L. C.; Nable, R. O. (1988) Physiological functions of Mn in plants. In: Graham RD, Hannan RJ, Uren NC (eds) *Manganese in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 139-154.
- Cardoso, P. F.; Molina, S. M. G.; Pereira, G. J. G.; Vitória, A. P.; Azevedo, R. A. (2002). Response of rice inbred lines to cadmium exposure. *Journal of plant nutrition*, v. 25, n. 5, p. 927-944. ISSN 0190-4167.
- Carneiro, M. A. C.; Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S. (2001) Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 12, p. 1443-1452. ISSN 1678-3921.
- Chekol, T.; Vough, L. R.; Chaney, R. L. (2004) Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils: the rhizosphere effect. *Environment international*, v. 30, n. 6, p. 799-804. ISSN 0160-4120.
- Chen, S.; Polle, A. (2010) Salinity tolerance of *Populus*. *Plant Biol*, 12: 317–333.

- Chen X, Zhou Z, Teng M, Wnag P, Zhou L (2015) Accumulation of three different sizes of particulate matter on plant leaf surfaces: effect on leaf traits. *Archives of biological sciences* 67(4):1257-1267.
- Clark, R. B. (1982) Plant response to mineral element toxicity and deficiency. In: Christiansen MN, Lewis CF (eds) *Breeding Plants for Less Favorable Environments*. John Wiley and Sons, New York, pp 71–142.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212:475-486.
- Cobbett, C. (2003) Heavy metals and plants—model systems and hyperaccumulators. *New Phytologist*, v. 159, n. 2, p. 289-293. ISSN 1469-8137.
- Colpaert, JV, Van assche JA (1992) Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant and Soil*, 143(2): 201-211.
- Colpaert, J. V.; Assche, J. A. (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist*, v. 123, n. 2, p. 325-333. ISSN 1469-8137.
- Courbot, M.; Diez, L.; Ruotolo, R.; Chalot, M.; Leroy, P. (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 12, p. 7413-7417. ISSN 0099-2240.
- Cunha, K. P. V.; Nascimento, C. W. A.; Pimentel, R. M. M.; Accioly, A. M. A.; Silva, A. J. (2008) Cadmium and zinc availability, accumulation and toxicity in maize grown in a contaminated soil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 3, p. 1319-1328. ISSN 0100-0683.
- Cunningham, S. D.; Anderson, T. A.; Schwab, A. P.; Hsu, F. (1996) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in agronomy*, v. 56, n. 4, p. 55-114.
- Dai, A.; Trenberth, K. E.; Qian, T. (2004) A global dataset of Palmer Drought Severity Index for 1870-2002: Relationship with soil moisture and effects of surface warming. *Journal of Hydrometeorology*, v. 5, n. 6, p. 1117-1130. ISSN 1525-7541.
- Deacon, T. (1997) *The symbolic species*: New York: Norton.

- Dinardi, A. L.; Formagi, V. M.; Coneglian, C. M. R.; Brito, N. M. D. E.; Sobrinho, G. D.; Tonso, S.; Pelegrini, R. Fitorremediação. III FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS. São Paulo: Unicamp, 2003.
- 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.
- Entry, J. A.; Emmingham, W. H. (1995) The influence of dairy manure on atrazine and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in pasture soils. *Canadian Journal of Soil Science*, v. 75, n. 3, p. 379-383. ISSN 0008-4271.
- Fecht-Christoffers, M. M.; Maier, P.; Horst, W. J. (2003) Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in Mn toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. *Physiol Plantarum* 117:237-244.
- Finlay, R. D. (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* 59:1115–1126.
- Fogarty, R. V.; Tobin, J. M. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 19, p. 311-317.
- Fomina, M.; Hiller, S.; Charnock, J. M.; Melville, K.; Alexander, L. J.; Gadd, G. M. (2005) Role of oxalic acid over secretion in transformation of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Appl Environ Microbiol* 71:371-381.
- Fornazier, R.; Ferreira, R.; Vitoria, A.; Molina, S.; Lea, P.; Azevedo, R. (2002) Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biologia Plantarum*, v. 45, n. 1, p. 91-97. ISSN 0006-3134.
- Gadd, G. M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124:25-60.
- Galli U, Schüepp H, Brunold C (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 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, n. 10, p. 1389-1414. ISSN 0038-0717.
- Giovannetti, M.; Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84:484-500.
- Grant CM, Perrone G, Dawes IW (1998) Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Bioph Res Co* 253:893-898.
- Gratão, P. L.; Polle, A.; Lea, P. J.; Azevedo, R. A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, v. 32, n. 6, p. 481-494, ISSN 1445-4416.
- Grazziotti PH, Siqueira JO, Moreira FM, Carvalho D (2001) Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 25:839-848.
- Guerinot ML, Yi Y (1994) Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology* 104:815-820.
- Guilherme, L. R. G.; Marques, J. J.; Pierangeli, M. A. P.; Zuliani, D.; Campos, M.; Marchi, G. (2005) Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos em ciência do solo*, v. 4, p. 345-390.
- Haas, H.; Eisendle, M.; Turgeon, B. G. (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol*, 46:149-187.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53:1-11.
- Imhof, S. (2009) Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas—three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification? *Mycorrhiza*, v. 19, n. 6, p. 357-363. ISSN 0940-6360.
- Jackson, M. L. (1965) *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, pp 489.
- Joiner, E.J.; Briones, R.; Leyval, C. (2000) Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226:227-234.

- Jones, M. D.; Hutchinson, T. C. (1986) The effect of mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. *New Phytol* 102:429-442.
- Jourand, P.; Hannibal, L.; Majorel, C.; Mengant, S.; Ducouso, M.; Lebrun, M. (2014) Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *J. Plant Physiol.* 171:164-172.
- Kabir, M.; Wang, H.; Lau, K.; Cardona, F. (2012) Chemical treatments on plant-based natural fibre reinforced polymer composites: An overview. *Composites Part B: Engineering*, v. 43, n. 7, p. 2883-2892. ISSN 1359-8368.
- Khan, A.; Kuek, C.; Chaudhry, T.; Khoo, C.; Hayes, W. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, v. 41, n. 1, p. 197-207. ISSN 0045-6535.
- 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.
- Kitao, M.; Lei, T. T.; Koike, T. (1997) Comparison of photosynthetic responses to manganese toxicity of deciduous broad-leaved trees in northern Japan. *Environ. Pollution* 97:113-118.
- Knecht, J. A.; Dillen, V. M.; Koevoets, P. L. M.; Schat, H.; Verkleij, J. A. C.; Ernst, W. H. O. (1994) Phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris* (chain length distribution and sulfide incorporation). *Plant Physiology*, v. 104, n. 1, p. 255-261. ISSN 0032-0889.
- Lindsay, W. L. (1979) *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons Ltd. ISBN 0471027049.
- Liu, Y. (2012) Advancing data assimilation in operational hydrologic forecasting: progresses, challenges, and emerging opportunities. *Hydrology and Earth System Sciences*, 16 (10), 2012. ISSN 1027-5606.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. (1951) Protein measurement with pholin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

- Macfie, S. M.; Taylor, G. J. (2008) The effects of excess Mn on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture. *Physiol Plantarum* 85:467-475.
- Magalhães, M. O. L.; Sobrinho, A. N. M. B.; Santos, F. S.; Mazur, N. (2011) Potencial de duas espécies de eucalipto na fitoestabilização de solo contaminado com zinco. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, n. 3, p. 805-812. ISSN 1806-6690.
- Malavolta, E. (1994) Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos. *Produção química*.
- Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A de. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: Potafós, 319p.
- Marschner, P. (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3 ed. Academic Press, London.
- Moreira, F. D. S. (2006) Microbiologia e bioquímica do solo. Ufla.
- Morselt AFW, Smits WTM, Limonard T (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 96(3):417-420.
- Morsomme, P.; Boutry, M. (1999) The plant membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465:1-16.
- Mukhopadhyay, M. J.; Sharma, A. (1991) Manganese in cell metabolism of higher plants. *Bot Rev* 57:117-149.
- Nascimento, C. W. A.; Xing, B. (2006) Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia agricola*, v. 63, n. 3, p. 299-311. ISSN 0103-9016.
- Newman, L. A.; Reynolds, C. M. (2004) Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 225-230. ISSN 0958-1669.
- Nriagu, J. O.; Pacyna, J. M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, v. 333, n. 6169, p. 134-139. ISSN 0028-0836.

- Oliveira, F. C.; Mattiazzo, M. E. (2001) Metais pesados em Latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 3, p. 581-593.
- Ott, T.; Fritz, E.; Polle, A.; Schützendübel, A. (2002) Characterization of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium. *FEMS Microbiol Ecol* 42:359-366.
- Page, A.; Bingham, F.; Nelson, C. (1972) Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. *Journal of Environmental Quality*, v. 1, n. 3, p. 288-291. ISSN 0047-2425.
- Pavan, M. A.; Bloch, F. M.; Zempulski, C. H. (1992) Manual de análise química de solo e controle de qualidade. IAPAR Londrina.
- Pereira, G.; Molina, S.; Lea, P.; Azevedo, R. (2002) Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil*, v. 239, n. 1, p. 123-132. ISSN 0032-079X.
- Pereira, O. L.; Kasuya, M. C. M.; Rollemberg, C. D.; Chaer, G. M. (2005) Isolation and identification of Rhizoctonia-like mycorrhizal fungi associated with three species of neotropical epiphytic orchids in Brazil. *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo*, v. 29, n. 2, p. 191-197, Mar-Apr. ISSN 0100-0683.
- 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.
- Raskin, I.; Smith, R. D.; Salt, D. E. (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current opinion in biotechnology*, v. 8, n. 2, p. 221-226. ISSN 0958-1669.
- 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*, 31:19-48.

- Rodaki, A.; Bohovych, I. M.; Enjalbert, B.; Young, T.; Odds, F. C.; Gow, N. A.; Brown, A. J. (2009) Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 20:4845–4855.
- Salt, D. E.; Smith, R. D.; Raskin, I. (1998) *Phytoremediation*. 643-668 ISBN 1040-2519.
- Santos, R. D. (1999) Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G.; MELLO, JCP, p. 323-354.
- Santos, L. C. (2006) Efeito de Cobre na População de Bactérias e Fungos Do Solo, Associação Ectomicorrízica e no Desenvolvimento de Mudanças de Eucalipto e Canafístula: Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Dissertação de Mestrado.
- Sato I, Shimizu M, Hoshino T, Takaya N (2009) The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involve a fungus specific glutathione-S-transferase. *J Biol Chem* 284:8042-8053.
- Schmitt, H.; Sticher, H.; Merian, E. (1991) Heavy metal compounds in the soil. Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance, p. 311-331. ISSN 352726521X.
- Schützendübel, A.; Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351-1365.
- Schuuramann, G.; Markert, B. A. (1998) *Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. Wiley New York, ISBN 0471176443.
- Shah, K.; Kumar, R. G.; Verma, S.; Dubey, R. S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, v. 161, n. 6, p. 1135-1144. ISSN 0168-9452.
- Shaw, A. J. (1989) *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. New York: CRC Press.

- 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.
- Sinha, P.; Dube, B. K.; Chatterjee, C. (2005) Manganese stress alters phytotoxic effects of chromium in green gram physiology (*Vigna radiata* L.) cv. PU 19. *Environ Exp Bot* 57:131-138.
- Smith, S. E.; Read, D. J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3. Ed. London: Academic Press, 787p.
- Soltan, M.; Rashed, M. (2003) Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. *Advances in environmental research*, v. 7, n. 2, p. 321-334. ISSN 1093-0191.
- 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.
- Souza, V. L.; Silva, D. C.; Santana, K. B.; Mielke, M. S.; Almeida, A. F.; Mangabeira, P. A. O.; Rocha, E. A. (2009) Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n. 2, p. 343-354.
- Taiz, L. (1992) The Plant Vacuole. *Journal of Experimental Biology*, 172:113-122.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3.ed. Sinauer, 690p.
- Tam, P.C.F. (1995) Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 5:181-187.
- 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.
- Van Hees, P. A. W.; Jones, D. L.; Finlay, R. D.; Godbold, D. L. (2005) The carbon we do not see, Do low molecular weight compounds have a significant impact on carbon dynamics and respiration in forest soils? *Soil Biol Biochem* 37:1-13.

- Van Tichelen, K. K.; Colpaert, J. V.; Vangronsveld, J. (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytol* 150:203-213.
- Vecchia, D. F.; La Rocca, N.; Moro, I.; De Faveri, S.; Andreoli, C.; Rascio, N. (2005) Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant Science*, v. 168, n. 2, p. 329-338. ISSN 0168-9452.
- Zanini, E.; Bonifacio, E. (1991) Lead pollution of soils from a continuous point source: A case study in Italy. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, v. 26, n. 5, p. 777-796. ISSN 1077-1204.
- Zhang, C.; Liu X.; Dong, F.; Xu, J.; Zheng, Y. (2010) The effect of imazethapyr on soil microbes in soybean fields in northeast China. *Chemistry and Ecology*, v. 26, n. 3, p. 173-182. ISSN 0275-7540.