UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

HOMEOSTASE DE FERRO EM MICORRIZAS

GABRIELA CHAVES CANTON

VILA VELHA

FEVEREIRO / 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

HOMEOSTASE DE FERRO EM MICORRIZAS

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.

GABRIELA CHAVES CANTON

VILA VELHA

FEVEREIRO/2016

Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C232h Canton, Gabriela Chaves.
Homeostase de ferro em micorrizas / Gabriela Chaves Canton – 2016.
81 f.: il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos. .
Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Solo – Poluição. 3. Fungos do solo. 4. Ferro – Contaminação. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

GABRIELA CHAVES CANTON

HOMEOSTASE DE FERRO EM MICORRIZAS

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.

Aprovada 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 pais, Cirilo Luca Canton e Maria Floranor Chaves Canton, à minhã irmã Milena Canton, ao meu marido Rafael Chaves, meu filho Emanuel Chaves, aos meus amigos e orientador.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Às amigas Julietty, Cinthia, Lisiany, Katherine, Izabela e ao professor Leonardo Dobbss pelo apoio essencial no desenvolvimento do projeto.

À minha família pelo apoio, compreensão e amor.

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

À minha prima Juliana Chaves e tia Maria Carmem por toda a ajuda com meu filho durante os dias que precisei me ausentar.

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

Ao meu filho Emanuel Canton por me fazer crescer e aprender mais a cada dia. Esteve bem próximo durante a gestação no laboratório e após seu nascimento. Me fez criar forças que não imaginava existir.

Ao professor Sydney Stürmer pela gentileza ao ceder o inóculo para a montagem do experimento, além da valiosa colaboração na escrita do projeto.

Aos professores do Doutorado do Programa de Ecologia de Ecossistemas pelo aprendizado.

Aos colegas do Doutorado.

Agradeço aos professores Dra Inga Gonçalves, Dr. Adriano de Paula e Dr. João Almeida por terem aceitado o convite para participar da qualificação e contribuído de forma muito importante com meu crescimento no meio científico.

Novamente agradeço aos professores Dra. Inga Gonçalves, Dra. Livia Marini Palma e Dr. Carlos Eduardo Tadokoro por aceitarem o convite para participarem da banca de defesa da tese.

Agradeço à FAPES pelo suporte financeiro, pois sem esse apoio a execução deste projeto não seria possível. Obrigada!

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

“…que seja infinito enquanto dure…”

Vinicius de Moraes

SUMÁRIO

RESUMO 6

ABSTRACT 8

1. INTRODUÇÃO..... 9

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... 12

2.1 Metabolismo do ferro em fungos..... 12

2.1.1 Estratégias de absorção de Fe por fungos..... 12

2.1.2 Sideróforos..... 14

2.2 Mecanismos de tolerância a metais por fungos micorrízicos..... 15

2.2.1 Toxicidade dos metais em fungos..... 17

2.2.2 Principais mecanismos de tolerância a metais por fungos micorrízicos..... 19

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 24

3.1 Experimento *in vitro* do crescimento dos fungos ectomicorrízicos..... 24

3.2 Experimento in vivo do crescimento de plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) micorrizadas expostas ao Fe e dois pHs..... 26

4. RESULTADOS..... 29

4.1 Análise do MSPFe e pH em duas espécies de fungos ectomicorrízicos..... 29

4.2 Análise das plantas de Schinus terebinthifolius Raddi micorrizadas e não micorrizadas expostas ao Fe e dois pHs..... 44

5. DISCUSSÃO..... 51

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 58

7.REFERÊNCIAS..... 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Resumo dos potenciais mecanismos de detoxificação dos metais pesados em uma célula fúngica. Manto atuando como uma barreira física (1), biosorção da parede celular (2), diminuição do fluxo através da membrana plasmática (3), efluxo dos metais através de proteínas de membrana (4), quelação dos metais no citosol por compostos como fitoquelatinas, metalotioneínas ou ácidos (5), transporte do complexo PC-metal para dentro do vacúolo (7) e transporte e acumulação dos metais no vacúolo (8). Adaptado de Hall 2002..... **20**

Figura 2 Regressão dos efeitos de diferentes concentrações de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre a biomassa seca e pH extracelular de *Pisolithus albus* (A) e *Pisolithus tinctorius* (B). Equações: y = -0,0016x2 + 0,0137x + 0,0779Y e R2=0,99 para *P. albus*; y = 0,09594X + 2,994 R2=0,98 para *P. tinctorius*..... **30**

Figura 3 Regressão da porcentagem de inibição (A) ou estimulação (B) na biomassa seca de *Pisolithus albus* e *Pisolithus tinctorius* nas diferentes concentrações de material sólido particulado de ferro (MSPFe) (n=4). Equações: y = -430,64x2 + 5249,4x + 871,96 e R^2 = 0,89 para *P. albus*; y = 4679x - 1406,9 e R^2 = 0,98 para *P. tinctorius*..... **31**

Figura 4 Regressão do conteúdo de ferro (Fe) no micélio de *Pisolithus albus* e *Pisolithus tinctorius* crescendo sob diferentes concentrações de material sólido particulado de ferro (MSPFe) (n=4)..... **32**

Figura 5 Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre o conteúdo de potássio (K) (A), fósforo (P) (B) e enxofre (S) (C) no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe..... **36**

Figura 6 Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre o conteúdo de cálcio (Ca) (A) e magnésio (Mg) (B) no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe..... **37**

Figura 7 Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro

(MSPFe) sobre o conteúdo de manganês (Mn) no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe..... **38**

Figura 8 Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre o conteúdo de boro (B) (A), cobre (Cu) (B) e zinco (Zn) (C) no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe..... **39**

Figura 9 Teores de macro e micronutrientes e ferro (Fe) no micélio fúngico de *Pisolithus albus*..... **41**

Figura 10 Teores de macro e micronutrientes e ferro (Fe) no micélio fúngico de *Pisolithus tinctorius*..... **42**

Figura 11 Análise de componentes principais do conteúdo de nutrientes, peso seco e pH dos fungos *Pisolithus albus* (vermelho) e *Pisolithus tinctorius* (verde) expostos a 0, 1, 2, 4 e 8g L^{-1} de material sólido particulado de ferro (MSPFe)..... **43**

Figura 12 Altura média (cm) das plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi não micorrizadas e em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de FeSO4 (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$..... **45**

Figura 13 Peso da matéria seca da parte aérea (g) das plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi não micorrizadas e em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de FeSO4 (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$..... **46**

Figura 14 Peso da matéria seca da raiz (g) das plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi não micorrizadas e em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de FeSO4 (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado)

correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$..... **47**

Figura 15 Visão geral do experimento *in vivo* de plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* (Mic) e não micorrizadas (Não mic) submetidas a três concentrações de $FeSO_4$ (1, 2 e 4 mM) em pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B)..... **48**

Figura 16 Porcentagem da colonização micorrízica em plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de $FeSO_4$ (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 e pH 5,5. Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$..... **49**

Figura 17 Eficiência micorrízica (%) de plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas às concentrações de $FeSO_4$ (0, 1, 2, 4 mM) em condição de pH 3,0 e 5,5, baseada na biomassa total. Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$..... **50**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantificação dos parâmetros presentes no material sólido particulado de ferro..... **25**

Tabela 2 Análise de correlação de Pearson entre as variáveis concentração de ferro (MSPFe), peso seco, pH e macro (P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn) determinadas no fungo Pisolithus albus. Valores em negrito representam correlações estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade..... **33**

Tabela 3 Análise de correlação de Pearson entre as variáveis concentração de ferro (MSPFe), peso seco, pH e macro (P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn) determinadas no fungo Pisolithus tinctorius. Valores em negrito representam correlações estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade..... **34**

LISTA DE ABREVIATURAS

MSPFe – Material sólido particulado de Ferro.

FMs – Fungos micorrízicos.

FMA – Fungo micorrízico arbuscular.

ECM - Ectomicorriza

RESUMO

CANTON, Gabriela. Universidade Vila Velha - ES, 29 de Fevereiro de 2016. **Homeostase de ferro em micorrizas**. Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

O número crescente de indústrias processadoras de minério de ferro (Fe) no litoral do Espírito Santo tem contribuído na emissão e deposição do material sólido particulado de ferro (MSPFe) e dióxido de enxofre, causador da chuva ácida. A combinação do Fe e a acidez da chuva ácida podem aumentar a disponibilidade do Fe no solo podendo afetar o crescimento das plantas nativas, especialmente de restinga, e causar alterações nas comunidades de micro-organismos do solo. Os fungos micorrízicos (FMs) são micro-organismos benéficos que protegem as espécies vegetais contra níveis elevados de metais no solo. No entanto, escassos são os estudos sobre o efeito do MSPFe na ecologia de FM e no estabelecimento da associação em plantas nativas expostas à contaminação de Fe. Este trabalho descreve o efeito de cinco doses MSPFe sobre o crescimento e ionoma dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus* e os parâmetros de crescimento e estabelecimento da simbiose de plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e o fungo *Claroideoglomus etunicatus* expostos à concentrações de Fe (0, 1, 2 e 4 mM de $FeSO_4$) de pH 3,0 e 5,5. Os resultados mostraram que o tratamento com o MSPFe estimulou a produção de biomassa de *P. albus* e inibiu em *P. tinctorius*, enquanto os menores valores de pH extracelular e maiores conteúdos de Fe micelial foram encontrados em *P. tinctorius* . Em *P. albus*, foram encontrados os maiores conteúdos de P e Mg na dose mais elevada de MSPFe enquanto em *P. tinctorius* elevados conteúdos de B e Cu foram detectados. As duas espécies apresentaram incremento no conteúdo de Mn com o aumento das doses de MSPFe. As plantas de aroeira micorrizadas apresentaram maior altura, peso seco da parte aérea e raiz quando comparadas às não micorrizadas que paresentaram claros sinais de toxidez ao Fe. A colonização micorrízica foi afetada principalmente em soluções de pH 3,0 e na maior dose de Fe (4 mM de $FeSO_4$). A maior porcentagem de eficiência micorrízica foi à dose de 1mM de $FeSO_4$ em pH3,0. Os resultados sugerem que fungos pertencentes ao mesmo gênero, podem adotar estratégias de tolerância distintas à exposição ao MSPFe e a utilização de FMAs

associados à plantas nativas aumenta a tolerância das plantas ao Fe e pode ser uma estratégia inovadora para recuperação ambiental.

Palavras-chave: *Pisolithus* sp., contaminação de ferro, material sólido particulado de ferro, metais pesados, poluição do solo.

ABSTRACT

CANTON, Gabriela C. Universidade Vila Velha - ES, February 29, 2016. **Iron homeostasis in mycorrhizae**. Advisor: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

The increasing number of processing iron ore industries (Fe) on the coast of the Espírito Santo have contributed to the emission and deposition of iron ore solid particulate matter (MSPFe) and sulfur dioxide (SO_2), which causes acid rain. The combination of Fe and the acidity of acid rain can increase the availability of Fe in the soil can affect the growth of native plants, especially sandbank, and cause changes in the communities of soil microorganisms. The mycorrhizal fungi (FM) are beneficial microorganisms protecting plant species against high levels of metals in the soil. However, few studies have been conducted on the effect of MSPFe the ecology of FM and the establishment of the association in native plants exposed to iron contamination. This paper describes the effect of five MSPFe doses on growth and ionome of ectomycorrhizal *Pisolithus tinctorius* and *Pisolithus albus* and growth parameters and establishment of plants mastic symbiosis (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and the fungus *Claroideoglomus etunicatus* exposed to Fe concentrations (0, 1, 2, and 4 mM $FeSO_4$) pH 3,0 and 5,5. The results showed that treatment with MSPFe stimulated the production of biomass *P. albus* and inhibited *P. tinctorius*, while the lower extracellular pH values and higher mycelial Fe content were found *P. tinctorius*. In *P. albus*, the highest content of P and Mg at the highest dose MSPFe while in *P. tinctorius* high contents of B and Cu were detected were found. Both species showed an increase in Mn content with increasing doses of MSPFe. Plants mastic mycorrhizal had higher height, dry weight of shoot and root when compared to non mycorrhizal that showed clear toxicity signals to Fe. The mycorrhizal colonization was affected mainly in pH 3.0 solutions and at the highest dose of Fe (4 mM $FeSO_4$). The highest percentage of mycorrhizal efficiency was at a dose of 1 mM $FeSO_4$ in pH3,0. The results suggest that the two fungi, although belonging to the same genus, tolerance can adopt different strategies to exposure to MSPFe and use of FMAs associated with native plant increases tolerance of plants to Fe.

Keyword: *Pisolithus sp.,* iron contamination, iron ore solid particulate matter, heavy metals, soil pollution.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a contaminação dos solos por atividades industriais vem se tornando um problema global e gerando grande preocupação (Das *et al.* 2014).

Devido ao desenvolvimento industrial e consequente aumento na emissão de poluentes, substâncias contaminantes vão se acumulando no meio ambiente, principalmente no solo (Clemens *et al.* 2013), podendo afetar a funcionalidade, biodiversidade e sustentabilidade dos ecossistemas (Pauwels *et al.* 2008; Niemeyer *et al.* 2012). Dentre os principais agentes poluentes se encontram o MSPFe, os quais são lançados através das atividades do setor de mineração e beneficiamento de minério de Fe (Neves *et al.* 2009; Mohiuddin *et al*. 2014; Arrivabene *et al*. 2015), e quando suspensos na atmosfera se depositam sobre a vegetação e solo (Grantz *et al.* 2003).

Outro agravante está nas intalações das unidades de processamento de minério de Fe, as quais se encontram localizadas em regiões vizinhas a formações de restinga. Este ecossistema é caracterizado por impor naturalmente às espécies vegetais diversos estresses abióticos (Scarano 2002; Gessler *et al*. 2008). Entretanto, com a ação humana, outros fatores estressantes, como a deposição de MSPFe, podem comprometer a sobrevivência de espécies vegetais nativas importantes. A espécie nativa de restinga de formação pós-praia como *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae), colonizam uma faixa deste ecossistema e foram avaliadas fisiologicamente sobre condições de estresse com Fe metálico. Os resultados mostraram uma alta sensibilidade desta espécie ao MSPFe (Araújo & Lacerda, 1987).

O MSPFe é considerado um poluente primário lançado na atmosfera diretamente pela fonte emissora e consiste de matéria subdividida em diminutas frações suficientemente pequenas para serem suspensas e carreadas pelo vento sob a forma de aerossol (Grantz *et al.* 2003; Prusty *et al.* 2005). Em plantas, o MSPFe causam abrasão e aquecimento foliar e ao danificar o controle estomático; ou por mecanismos químicos, ao provocar a lixiviação de nutrientes das folhas e ao afetar o pH e o estado nutricional (Grantz *et al.* 2003; Prusty *et al.* 2005; Bao *et al.* 2015; Chen *et al.* 2015).

A magnitude do impacto do MSPFe ao ambiente dependerá das características de suas partículas, da intensidade e frequência das deposições, bem

como da susceptibilidade e do estágio de desenvolvimento dos organismos afetados (Wong *et al*. 1978; Rocha *et al.* 2014; Arrivabene *et al*. 2015). A acidez do solo causada pela chuva ácida, como consequência da emissão industrial de dióxido de enxofre (SO_2), condiciona baixos valores de pH o que torna o Fe prontamente disponível para absorção (Hell & Stephan, 2003; Ricachenevsky & Sperotto, 2014), podendo levar seu acúmulo a níveis tóxicos nos tecidos vegetais (Silva *et al*. 2005, Silva *et al*., 2006).

Para amenizar tais efeitos nos ecossistemas, o uso de micro-organismos associados às plantas vasculares com tolerância aos MSPFe podem ser uma alternativa promissora na recuperação de ambientes contaminados por este poluente (Landeweert *et al*. 2001; Crane *et al*. 2010; Lermen *et al.* 2015). Neste caso, os fungos micorrízicos podem conferir à planta hospedeira um efeito fitoprotetor em níveis de toxidez por Fe, imobilizando-o no solo e impedindo que sejam translocados pelas raízes dos vegetais (Sousa *et al*. 2012). Além disso, na associação com plantas hospedeiras podem apresentar aumento da eficiência na absorção de nutrientes do solo, tolerância a estresses bióticos e abióticos, e por fim nas respostas adaptativas das plantas sob condições de campo (Beniwal *et al.* 2010; Colpaert *et al.* 2011; Luo *et al.* 2014; Pena e Polle 2014). No entanto, as respostas positivas nas plantas hospedeiras dependem da espécie de fungo micorrízico envolvido e de como o estabelecimento da simbiose são afetados pelo solo contaminado (Gohre & Paszkowski 2006)

Algumas espécies de fungos micorrízicos têm a capacidade de aumentar a habilidade das plantas hospedeiras em crescer e se desenvolver em solos contaminados com metais (Van Tichelen *et al.* 2001; Rajkumar *et al.* 2012). Acredita-se que os mecanismos associados a esta tolerância fúngica envolva a exsudação de ácidos orgânicos (Ahonen-Jonnarth *et al*. 2000; Ray & Adholeya 2009; Sazanova *et al*. 2015). Os ácidos orgânicos de baixo peso molecular são conhecidos por serem fortes quelantes de metais trivalentes como Al^{3+} e Fe^{3+} (Jones 1998). Estudo realizado por Ray e Adholeya (2009), mostrou ácidos orgânicos exsudados por diferentes espécies de fungos ectomicorrízicos, quando expostos a metais *in vitro,* tinham um papel de complexador de metais. Similarmente, Sazanova *et al*. (2015) observaram que a produção de ácido oxálico está diretamente relacionada com a desintoxicação de metais pesados por fungos, sendo confirmado pela presença de cristais no meio de cultura.

Atualmente não existem estudos que avaliem o efeito do MSPFe sobre o crescimento de fungos ectomicorrízicos, sendo que único estudo existente abordou a eficiência de mineralização do MSPFe por plantas de *Pinus patula* inoculadas com fungos ectomicorrízicos (Adeleke *et al*., 2012). Além disso, poucos são os estudos que avaliem o potencial da simbiose na tolerância de plantas ao Fe. Dada a grande exposição deste material nos solos, fazem-se necessários estudos que avaliem a tolerância de micro-organismos a este poluente para posterior utilização da associação em ambientes contaminados.

Com base no exposto, a primeira hipótese deste trabalho é que fungos ectomicorrízicos, do mesmo gênero e de espécies diferentes (*Pisolithus tinctorius* e *Pisolithus albus)*, podem apresentar respostas distintas quando expostos ao MSPFe no meio de crescimento. A segunda hipótese é a de que a associação micorrízica em plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) irá aumentar a tolerância das plantas expostas ao Fe, principalmente em condição de baixo pH. Para testar essas hipóteses, os objetivos específicos foram: (I) avaliar o crescimento e produção de biomassa *in vitro* dos fungos ectomicorrízicos *P. tinctorius* e *P. albus* submetidos a diferentes doses de MSPFe; (II) avaliar se as oscilações no pH extracelular dos fungos crescendo nas diferentes doses de MSPFe pode estar relacionada ao nível de tolerância da espécie ao MSPFe; (III) avaliar o efeito do MSPFe sobre o ionoma, ou seja, acumualção de macro e micronutrientes no micélio dos fungos ectomicorrízicos estudados, e por fim, (IV) avaliar os parâmetros de crescimento e massa seca de aroeira não micorrizada e em associação com o fungo *Claroideoglomus etunicatuse* expostas ao ferro em condições de pH ótimo e ácido (V) analisar a eficiência micorrízica, sob alto ferro nas duas condições de pH, avaliando se a colonização micorrízica pode induzir tolerência em plantas de aroeira.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Metabolismo do ferro em fungos

O Fe é o segundo metal de transição mais abundante da litosfera (Pantopoulos & Hentze, 2000; Johnson *et al.* 2012), com simbologia química Fe e densidade de 7,87 g cm^{-3}. É o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre sendo essencial para quase todos os organismos vivos, pois participa como co-fator em vias metabólicos vitais (Jeong & Gerinot 2009; Mulholland *et al*. 2015).

O Fe pode existir em vários estados de oxidação, mas as principais formas que ocorrem naturalmente no ambiente são o Fe ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}) e são altamente dependentes do estado redox do sistema (Ilbert & Bonnefoy 2013). A forma de Fe férrico é geralmente a mais abundante, entretanto, com baixa solubilidade. Sendo assim, encontra-se menos disponível para absorção. A biodisponibilidade das fontes de Fe é afetada principalmente pelo pH. Em pH ácido predominam as formas solúveis de Fe, e em pH alcalino, as formas insolúveis (Kim & Guerinot 2007; Ricachenevsky & Sperotto 2014).

Apesar da baixa disponibilidade na maioria dos solos, em alguns ambientes, como alagados e solos com alta influência de usinas mineradoras, o Fe solúvel pode estar altamente disponível, se tornando tóxico. O excesso de Fe livre é prejudicial para as células vivas, pois gera radicais hidroxila citotóxicos. Apenas quantidades muito pequenas de metais essenciais são tolerados dentro da célula como íons livres. Isto pode ser aplicado a todos os metais, mas especialmente para íons-redox de metais ativos tais como cobre (Cu) e Fe, que são capazes de provocar a formação de radicais hidroxila e outros tipos de danos oxidativos (Jeong & Guerinot 2009; Ravet *et al*. 2009).

2.1.1 Estratégias de absorção de Fe por fungos

Como discutido anteriormente, o Fe está geralmente indisponível para absorção. Este fato fez com que os organismos precisassem aprender a lidar com tal limitação e desenvolver, portanto, estratégias para assimilar este nutriente essencial.

As plantas requerem Fe adicional, pois este nutriente participa da formação de algumas enzimas (catalase, peroxidase, citocromo oxidase e xantina

oxidase), além de ser indispensável nos processos de respiração, fotossíntese, fixação de N_2 e transferência de elétrons através do ciclismo entre o Fe^{2+} e Fe^{3+} (Guerinot & Yi 1994; Araki *et al* .2011). Os vegetais absorvem do solo o Fe na forma de minerais primários como Fe férrico (Fe^{3+}) e os óxidos: $Fe(OH)^{2+}$, $Fe(OH)_3$ e $Fe(OH)^{-4}$. A um pH neutro, o Fe férrico é praticamente insolúvel, e para que as plantas pudessem absorvê-lo, as raízes desenvolveram mecanismos para aumentar sua solubilidade e, consequentemente, sua disponibilidade (Guerinot & Yi 1994). Um primeiro mecanismo envolve a redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} com a acidificação da rizosfera a partir da extrusão de prótons por ATPases do tipo P de membrana plasmática (Guerinot & Yi 1994; Hell & Stephan 2003; Colangelo & Guerinot 2006; Revathi & Venugopal 2013). A segunda estratégia adotada pelas plantas é a secração na rizosfera de compostos que possuem alta afinidade por Fe, os fitossideróforos. Estes unem-se ao Fe^{3+} formando um complexo quelato (Fe^{3+}-FS), passando por transportadores específicos conhecidos como Yellow Stripe (YS) para dentro das células (Guerinot & Yi 1994; Briat *et al*. 1997; Ishimaru *et al*. 2007; Marschner *et al.* 2011).

Similar à estratégia das plantas, alguns micro-organismos, como os fungos, desenvolveram três mecanismos de solubilização de Fe: (i) acidificação do meio; (ii) redução de Fe (Fe^{3+} a Fe^{2+}) e (iii) produção de sideróforos (peptídeos de síntese não-ribossômica com altíssima afinidade por Fe). Estas estratégias são utilizadas em diferentes graus dependendo da espécie fúngica envolvida (Yun *et al.* 2000;. Kosman 2003;. Machuca *et al.* 2007; Arantes & Milagres 2007; Kornitzer 2009; Adeleke *et al.* 2012). A grande maioria dos fungos absorve o Fe por redução, levando a duas estratégias: a absorção antes da redução e a redução antes da captação. A síntese e utilização de sideróforos é um mecanismo de absorção antes da redução. Um sideróforo livre de Fe pode ser armazenado em vesículas intracelulares até que seja necessária sua secreção. Após se carregar com Fe, é possível uma reentrada através de um próton simporte que, posteriormente, é liberado por um redutase ligada ao NADPH. O segundo mecanismo começa com a redução de Fe^{3+}, que em leveduras, é catalisada por uma redutase transmembranar ligada de NADPH, que tem homologia com a oxidase de NADPH de neutrófilos. Redutores externos, que podem ser importantes em certos fungos incluem o ácido 3-hidroxiantranico, melanina, celobiose-desidrogenase e 2,5-dimetilhidroquinona. Em levedura, uma alta afinidade envolve a absorção de Fe via reoxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+}, provavelmente para conferir especificidade para o Fe. Este esquema é

catalisado por uma proteína de cobre que tem homologia com a ceruloplasmina, e está estreitamente ligado ao transporte de Fe^{3+}. Em muitos fungos, mecanismos com redução internos ou externos são importantes. A redução externa é aplicável a praticamente qualquer complexo de Fe^{3+}, enquanto a redução interna é mais eficiente em baixas concentrações de Fe, mas requer uma sideróforo permease através da qual as toxinas podem entrar (De Luca & Wood 2000).

Estudos com o fungo *Saccharomyces cerevisiae* descrevem que a absorção de Fe^{3+} na membrana plasmática é iniciada pela redução de Fe (Fe^{3+} a Fe^{2+}) e catalisada pela enzima Fre1p. O Fe^{2+} formado é um substrato para Fet3p, que faz parte do complexo de alta-afinidade de absorção de Fe. Fe^{+3} é gerado por Fet3p, transportado por uma Fe-permease (Ftr1p) para dentro da célula. O sistema não redutor reconhece exclusivamente sideróforos (De Luca & Madeira 2000; Kornitzer 2009). Em condições de baixo oxigênio as células vão expressar um transportador de baixa afinidade íon ferroso (Fe^{2+}), que funciona como um sistema independente de oxigênio para transporte do nutriente para dentro da célula. Este mecanismo de baixa afinidade (que não é regulado pela presença de Fe) também transporta cobalto, cádmio e níquel (Pantopoulos & Hentze, 2000; Lemanceau *et al*. 2009; Marschner *et al.* 2011).

Tanto fungos patogênicos como os não patogênicos expressam duas vias principais para captação de Fe (Kosman 2003; Kosman 2013). Uma dessas vias envolve a absorção mediada pelo receptor de sideróforo ou heme com recuperação intracelular do Fe após a degradação do ligante ou liberação do Fe reduzido. Na segunda via, o Fe liberado de seu ligante pela ferri-redutase é substrato para uma ferroxidase. O Fe (III) produzido pela reação da ferroxidase é transportado para o citoplasma por meio de um transportador de Fe férrico (Kosman 2013).

2.1.2. Sideróforos

Os siderófors são metabólitos secundários produzidos pela biossíntese de enzimas conhecidas como peptídeo sintetase não ribossômica e policetídeo sintase. Sua principal função é ligar-se ao Fe^{3+} em condições de baixo Fe livre. Diversos micro-organismos são conhecidos por sintetizarem sideróforos, sendo amplamente produzidos por espécies aeróbicas e facultativamente por espécies anaeróbicas, onde desempenham a função de sequestrar e transportar Fe(III) (Neilands 1995; Luu *et al.* 2003).

Os grupos funcionais nos sideróforos incluem α-hidroxicarboxilato, hidroxamato, catecolate, carboxilato e amina (Kraemer, 2004). As bactérias produzem sideróforos contendo uma variedade de grupos funcionais, mas a maioria dos fungos produzem sideróforos do tipo hidroxamato. Sideróforos fúngicos do tipo hidroxamato podem ser divididos em três famílias estruturais: fusariminas, coprogens e ferricromos. (Neilands 1995; Renshaw *et al.* 2002; Earhart 2009).

A função do sideróforo envolve o transporte de Fe através da membrana plasmática do micro-organismo, sendo que essa entrada ocorre somente após a redução do Fe ou desmembramento do seu ligante. Os sideróforos, em alguns casos, podem ser reciclados para iniciar o processo de absorção de Fe novamente (Neilands 1995; De Luca & Wood 2000). O fato do complexo sideróforo-Fe(III) possuir peso molecular maior que 400-2000 g/mol, faz com que sua capacidade para permear estruturas porinas seja baixa e, portanto, proteínas transportadoras específicas tornam-se necessárias (Guerinot *et al.* 1994; Earhart 2000).

A remoção do Fe do sideróforo é feita de três formas. No primeiro mecanismo, o complexo Fe-sideróforo é transportado através da membrana celular e o Fe libertado intracelularmente através de um passo de redução, já que o sideróforo tem uma baixa afinidade para Fe(II). Neste esquema, o ligante permanece intacto, podendo ser novamente excretado e reutilizado. O segundo mecanismo envolve o recolhimento do complexo de Fe-sideróforo para dentro da célula microbiana e a libertação do metal é conseguida através de uma modificação química ou destruição do ligante. No terceiro mecanismo, o sideróforo atua trazendo o Fe para a membrana celular, mas não entra na célula. O Fe é, portanto, doado a um segundo agente quelante ligado à membrana, seguido por redução, e o sideróforo permanece extracelular (Luu & Ramsay 2003)

2.2 Mecanismos de tolerância a metais por fungos micorrízicos

As atividades humanas, como a agricultura e mineração são conhecidas por suprimir a cobertura vegetal e liberar grandes quantidades de metais no meio ambiente. Dessa forma, um novo panorama de estresse foi criado a partir da contaminação do ar, solo e água, fazendo com que as plantas precisem ser capazes de crescer e desenvolver. A exposição a quantidades excessivas de elementos como o arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) e Fe levam, muitas vezes, à efeitos tóxicos nas plantas a nível celular e molecular e, posteriormente, em

morte (Harms *et al*. 2011). No entanto, algumas plantas são capazes de lidar com a fitotoxicidade dos metais e sua presença em áreas contaminadas já foi verificada (Gomes & Garcia 2013; Gomes *et al*. 2013). Este é um forte indicador de que algumas plantas desenvolveram diversos mecanismos de tolerância que lhes permitiram competir com sucesso as duras condições ambientais (Hildebrandt *et al*. 2007). Além disso, essas espécies de plantas são úteis em programas de recuperação de áreas degradadas, pois são capazes de remover, transferir, estabilizar e/ou degradar metais do solo (Khan *et al*. 2000). A fitorremediação (o uso de plantas para recuperação de ambientes contaminados) surgiu como uma proposta ecológica e pode ser o tratamento mais rentável para solos contaminados por metais pesados, principalmente em casos de contaminação extensa (Dary *et al*. 2010). Sendo assim, é importante compreender a tolerância de espécies potencialmente fitorremediadoras.

Dentre as técnicas de remediação de solos contaminados, a fitorremediação é a única que promove a restauração da estrutura da comunidade microbiana do solo, se destacando em relação aos métodos físicos e químicos. As plantas tolerantes podem naturalmente acumular altas concentrações de metais em seus tecidos, mas a maioria produz baixas quantidades de biomassa, o que limita sua eficiência na fitorremediação (Cunningham *et al*. 1996; Krämer 2005).

Contudo, um dos fatores que permitem a permanência de plantas tolerantes em áreas contaminadas é a colonização de suas raízes por fungos mícorrizicos (FMs). Estes fungos específicos do solo formam associações simbióticas mutualistas com raízes de plantas. Durante esta simbiose, a planta hospedeira tem maior crescimento, produtividade, maior capacidade de absorção de nutrientes do solo, principalmente fósforo (P), além de facilitarem a absorção de água e reduzirem danos provocados por patógenos (St-Arnaud *et al*. 2007; Smith & Read 2008; Ismail *et al*. 2012). Cerca de 80% das plantas expostas à condições de estresse ambiental são colonizadas por FMs (Smith & Read, 2008), pois associação fungo-planta reduz consideravelmente a absorção de metais pesados pelas células vegetais (Weissenhorn *et al*. 1995; Leyval *et al*. 1997; Ouziad *et al*. 2005; Hildebrandt *et al*. 2007).

A utilização de FMs para acumulação de metais, evitando que estes sejam absorvidos pelos seus hospedeiros é chamada de micorremediação. Esse método de remediação é capaz de manter as propriedades biológicas e a estrutura física do solo, além de ser uma técnica não impactante, de baixo custo, e visualmente

desobstrutiva, oferecendo ainda a possibilidade de bio-recuperação dos metais (Khan *et al*. 2000).

Vários estudos mostraram a capacidade de FMs em aleviar à toxicidade de metais para uma planta hospedeira a partir de quelantes desses elementos no interior da estrutura fúngica ou por aumento na oferta de nutrientes para o hospedeiro. No entanto, os mecanismos envolvidos em aumentar essa tolerância são diversos e possuem uma alta especificidade entre metais, sua concentração no solo, os fungos associados e o cresicmento das plantas (Hartley *et al*. 1997; Hildebrandt *et al*. 2007). Os mecanismos de tolerância dos FMs envolve o micélio fúngico extracelular agindo como uma barreira física de proteção pra o hospedeiro, além de processos biológicos como quelação dos metais na parede celular ou processos internos que envolvem complexação, compartimentalização e volatilização (Galli *et a*l. 1994; Hildebrandt *et al*. 1999; Khan *et al*. 2000; Entry *et al*. 2002).

2.2.1 Toxicidade dos metais em fungos

Alguns metais pesados do solo, como Zn, Cu, Ni, Co, Mn e Fe são micronutrientes essenciais para a vida biológica. Apesar de serem reconhecidos como ''micronutrientes '', metais na célula não podem exceder um determinado limite, acima do qual, eles indiscriminadamente ligam e reagem com vários componentes celulares (incluindo ácidos nucleicos), causando toxicidade celular e eventos de mutação. Sendo assim, exercem efeitos nocivos à vegetação e aos micro-organismos do solo em muitos aspectos (Hall 2002; Ott *et al*. 2002; Cobbett 2003; Liu *et al*. 2012). Tais efeitos incluem o bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes e dos sistemas de transporte de íons e nutrientes essenciais, o deslocamento e substituição de íons metálicos de biomoléculas e unidades celulares funcionais, modificação conformacional, desnaturação e inativação de enzimas, além da interrupção da célula e integridade da membrana. Em geral, quase todos os aspectos do metabolismo, crescimento e diferenciação pode ser afetado, dependendo da espécie de micro-organismo em questão, do metal envolvido e sua concentração na solução do solo (Gadd 1994; Fomina *et al*. 2005).

Quando se fala em desenvolvimento de FMs em presença de metais, termos como tolerância e resistência são comumente usados, porém se distinguem pelo mecanismo de ação. A resistência pode ser definida como sendo a habilidade de

sobreviver em presença de metal, por ação de um mecanismo produzido como resposta direta aos metais. Tolerância pode ser definida como a capacidade de um organismo sobreviver em presença de doses elevadas de metais por propriedades intrínsecas e/ou modificações ambientais, como parede celular impermeável e excreção de metabólitos que levam à detoxificação dos metais. Entretanto, é muito difícil distinguir exatamente qual o mecanismo envolvido no processo de detoxificação dos metais, uma vez que inúmeros fatores físico-químicos (pH, matéria orgânica solúvel, ânions e cátions) e biológicos (biosorção e bioacumulação) estão envolvidos na biodisponibilidade do metal e influenciam diretamente o mecanismo utilizado no processo de tolerância (Gadd 1994; Godbold *et al*. 1998; Bellion *et al*. 2006).

Muitos fatores estão envolvidos na tolerância de FMs à contaminação por metais pesados, dentre eles a especificidade do metal tóxico envolvido e sua concentração no meio ambiente, o desenvolvimento da espécie vegetal e o fungo associado (Hartley *et al*. 1997; Hildebrandt *et al*. 2007). Por exemplo, em um estudo feito por Ray *et al*. (2005), foi testado o nível de tolerância de oito ectomicorrizas (ECMs) em relação a várias concentrações de seis diferentes metais pesados (Al, As, Cd, Cr, Ni e Pb), concluindo que apenas três isolados (*Hysterangium incarceratum*, *Laccaria fraterna* e *Pisolithus tinctorius*) possuíram tolerância considerável aos metais em questão. Dois fungos ectomicorrízicos *Thelephora terrestris* e *Suillus bovinus* testados por Van Tichelen *et al*. (2001), protegeram o *Pinus sylvestris* contra a toxicidade do cobre, porém os dois fungos acumularam quantidades diferentes de Cu e demonstraram diferenças também na sensibilidade.

Vários mecanismos biológicos e físicos têm sido propostos para explicar a menor toxicidade de metais em plantas colonizadas por FMs. Estes incluem a adsorção na parede celular de plantas ou das células fúngicas, ou no micélio extraradicular no solo, a quelação por compostos como sideróforos e metalotioneínas liberadas por fungos, e sequestro de compostos derivados de plantas como fitoquelatinas ou fitatos. Além disso, existe a possibilidade de maior tolerância a metais devido à diluição pelo aumento de raízes e parte aérea do hospedeiro, a exclusão por precipitação de grânulos de polifosfato e, ainda, compartimentalização em plastídios ou outras organelas das membranas (Galli *et al*. 1994; Hildebrandt *et al*. 1999; Entry *et al*. 2002)

2.2.2 Principais mecanismos de tolerância a metais por fungos micorrízicos

Diversos estudos testaram e provaram a eficiência da associação micorrízica no melhoramento dos efeitos da toxicidade do metal na planta hospedeira (Brown & Wilkins 1985; Jones & Hutchinson 1986; Colpaert & Van Assche 1992; Blaudez *et al*. 2000; Crane *et al*. 2010; Jourand *et al*. 2010; Jin *et al.* 2015). Entretanto, não são todas as associações micorrízicas que conferem estes benefícios (Jones & Hutchinson 1986). Uma interação fungo-hospedeiro eficiente é essencial na tolerância à metais, pois diferentes espécies de FMs podem ter efeitos diferenciados quanto à translocação e acúmulo de metais em suas plantas hospedeiras (Bai *et al*. 2008; Liang *et al*. 2009).

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

Os processos-chave que contribuem para a homeostase de metais incluem: (i) controle no transporte (captação e extrusão) de íons metálicos através de bio-membranas; (ii) imobilização (por exemplo, a quelação extracelular por compostos orgânicos secretados); (iii) o sequestro e compartimentação intracelular mediados por bio-quelantes de baixo peso molecular (por exemplo, glutationa, fitoquelatinas, metalotioneínas e nicotianamina) (Bolchi *et al*. 2011). Sendo assim, a parede celular do fungo possui uma importante propriedade de proteção, pois controla a absorção dos solutos na célula, incluindo metais potencialmente tóxicos, e também afeta, indiretamente, a composição iônica intracelular pelo fato de restringir a água celular (Gadd 1994). Muitos produtos fúngicos extracelulares, como os ácidos orgânicos, podem complexar ou precipitar os metais. O ácido cítrico e ácidos orgânicos de baixo peso molecular são conhecidos por serem eficientes quelantes metal-íon, e o ácido oxálico pode interagir com os metais na sua forma iônica e formar insolúveis cristais de oxalato ao redor da parece celular e no meio externo (Murphy & Levy 1983; Ahonen-Jonnarth *et al.* 2000; Ray & Adholeya 2009; Sazanova *et al*. 2015).

É possível que a proteção das ECMs contra os metais pesados seja devido ao manto formar uma barreira física impedindo a absorção dos metais pela planta hospedeira (Khan *et al*. 2000). Também existem os mecanismos biológicos, os quais incluem processos de precipitação extracelular, biossorção da parede celular através de troca iônica, adsorção, complexação e cristalização, e processos internos nas

células dos fungos, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados (Gadd 1994; Colpaert *et al*. 2011). Todos estes mecanismos estão resumidos na Figura 1.

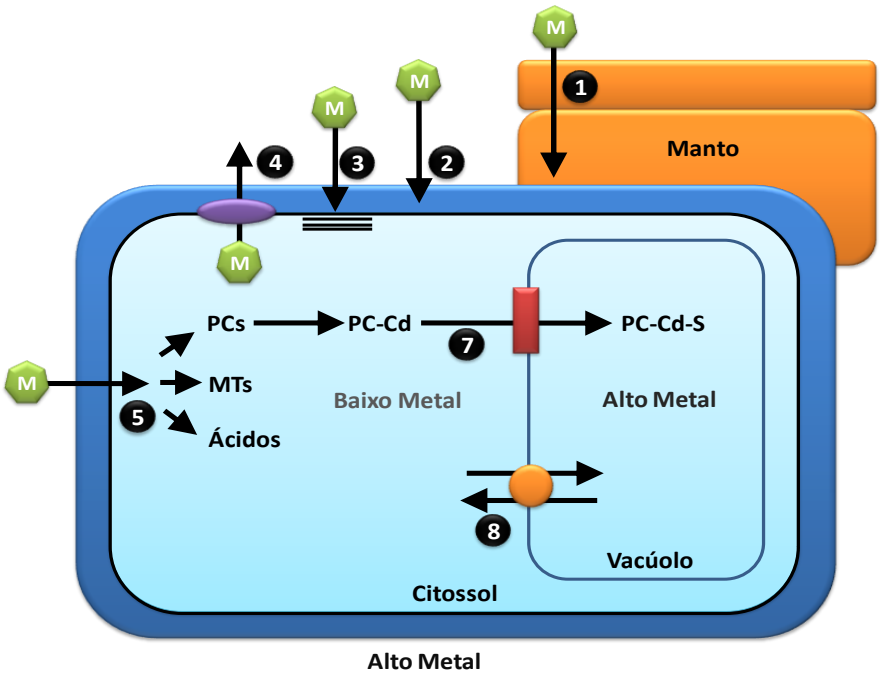

Figura 1. Resumo dos potenciais mecanismos de detoxificação dos metais pesados em uma célula fúngica. Manto atuando como uma barreira física (1), biosorção da parede celular (2), diminuição do fluxo através da membrana plasmática (3), efluxo dos metais através de proteínas de membrana (4), quelação dos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

A produção de pigmentos extracelulares como melaninas tem sido considerada o principal mecanismo de precipitação extracelular de metais pesados. As melaninas são pigmentos de alto peso molecular, marrom-escuros ou pretos formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (Fogarty & Tobin 1996). Além disso, possuem diversos grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos, aminas e quinonas, os quais fornecem muitos sítios potenciais para ligação ou bioadsorção dos metais (Gadd & De Rome 1988; Gadd 1994). Em fungos, estas estão localizadas na parede celular ou como polímeros extracelulares. Grazziotti *et al*. (2001) confirmando tal fato, demonstrou que um isolado de *Pisolithus tinctorius*

teve sua produção de pigmentos extracelulares aumentada com a adição de solo contaminado ao meio de cultura, e esta produção foi máxima na mistura próxima àquela em que ocorreu a produção máxima de micélio.

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

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) também são conhecidos por ser um fator chave no solo para desenvolvimento e estabelecimento de plantas em áreas contaminadas com metais (Bonfante & Genre 2010; Phieler *et al*. 2013). As FMAs tem um papel fundamental na aquisição de fosfato durante associações micorrízicas e, segundo Smith *et al*. (2010), o arsenato, metal que em excesso provoca toxicidade em plantas, é um análogo químico do fosfato. Dessa forma, as FMAs podem tanto aumentar potencialmente a absorção de arsênio, como também podem aleviar sua toxicidade e aumentar a tolerância da planta hospedeira ao metal. Os mecanismos básicos sobre os efeitos protetores de FMAs em plantas hospedeiras para arsênio (As), absorção de arsenato /fosfato, bem como a desintoxicação, ainda são desconhecidas e mais estudos são necessários (Smith *et al*. 2010). Porém, existem alguns relatos de mecanismos em fungos com o sequestro de As nos vacúolos, metilação de As inorgânico para produzir derivados voláteis, e alguns mecanismos de exclusão. Neste último, o fungo resiste ao arsenato reduzindo As(V) à As(III), bombeando-o para fora da célula fúngica, e o micélio extraradicular e os arbúsculos podem ter papel importante na tolerância ao As (Gonzáles-Chavéz *et al*. 2011).

Alguns resultados com um FMA, conhecido hoje como *Claroideoglomus intraradices,* mostraram que os metais Zn, Cu e Cd foram acumulados na parede da célula e em grânulos densos em elétrons no citoplasma dos fungos, enquanto que o

seu próprio citoplasma era essencialmente livre desses elementos (González-Guerrero *et al*. 2008). Além disso, a glomalina, uma glicoproteína insolúvel produzido por hifas de FMAs, foi mostrada por ligar-se a elementos potencialmente tóxicos, incluindo metais pesados (González-Chávez *et al*. 2004).

Estudos dos genes e vias relacionadas com a homeostase de metais em FMs é essencial para a compreensão de mecanismos de tolerância. Bolchi *et al*. (2011), avaliando a sequência do genoma de um fungo ectomicorrízico *Tuber melanosporum* e em análises de transcriptoma, se propuseram a identificar sistematicamente genes relacionados com a homeostase de metais. Neste estudo, produtos de genes foram subdivididos em três principais classes funcionais: (i) o transporte do metal; (ii) defesa estresse oxidativo; e (iii) a desintoxicação do metal. Esta última classe inclui uma metalotioneína de tamanho pequeno (TmelMT) que foi validada funcionalmente em levedura, e uma fitoquelatina sintase (TmelPCS). Recombinante TmelPCS foi mostrado para apoiar GSH-dependente, ativar metais pela síntese de fitoquelatina in vitro e para dar maior tolerância ao Cd/Cu em cepas de leveduras hipersensíveis ao metal. Transportadores de metais, especialmente os relacionados com a absorção de Cu e Zn apresentou os maiores níveis de expressão em micorrizas, sugerindo extensa translocação de ambos os metais para células da raiz, bem como para metaloenzimas fúngicas (por exemplo, lacase).

Outros pesquisadores mostraram que a expressão de um gene metalotioneína (GmarMT1) do FMA *Gigaspora margarita* (BEG 34) é expresso no micélio na fase simbiótica por Cu (Lanfranco *et al*. 2002) e o aumento dos níveis de transcrição de um gene do transportador putativo de Zn (GintZnT1) da família de facilitadores de difusão de cátions (FDC) foram observados no micélio de *Claroideoglomus intraradices* sob exposição a curto e longo tempo de Zn, indicando um possível papel desta enzima na proteção contra estresse a esse metal (González-Guerrero *et al*. 2005).

Também em solo contaminado com Zn, Ouziad *et al*. (2005), mostraram que tomates colonizados com o FMA *Claroideoglomus* cresceram nitidamente melhor do que os controles não micorrizados nestes solos com alto teor do metal tóxico. Sendo assim, os autores realizaram uma análise das formações de transcritos de RNAm diferencial em vários genes das plantas, que codificam produtos potencialmente envolvidos na tolerância a metais pesados. A análise Northern blot indicou que um gene Lemt2 (codifica metalotioneínas) foi fortemente expressa apenas nas raízes não colonizadas por FMAs, e somente após o crescimento no solo com metais. A

colonização por FMAs reduziu o nível de transcritos Lemt2. Este também foi o caso para um transportador LeNramp1 (codifica uma ampla gama de transportadores de metal pesado) específico de raiz. Do mesmo modo, os níveis de transcritos LeNramp3 foram reduzidos pela colonização por FMAs nas raízes, mas não nas folhas. Todos os dados sugerem que os níveis de transcrição de alguns, mas não todos os genes do Nramp ou família mt são elevados sob estresse a metais pesados. Tais resultados mostraram que a colonização com FMAs promove uma regulação destes genes, provavelmente devido ao fato de o teor de metais pesados ser inferior em raízes micorrizadas quando comparadas à não colonizadas.

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento *in vitro* do crescimento dos fungos ectomicorrízicos

Dois isolados de fungos ectomicorrízicos foram escolhidos para realização dos experimentos. O *Pisolithus tinctorius* (isolado 24), originário de Michigan-EUA, foi obtido da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e o fungo *Pisolithus albus* (isolado ES01) foi coletado em um solo Latossolo Vermelho – Amarelo (LVA) de um plantio de eucalipto no distrito de Biriricas (20°22'16"S/40°35"08"), no município de Domingos Martins, estado do Espírito Santo, Brasil. Ambas regiões de coleta dos fungos são influenciadas pela poluição de Fe. Discos de ágar de 11 mm, contendo micélio dos fungos ectomicorrízicos, foram inoculados em placas de Petri contendo 25 ml (10 x 100 mm) de meio de cultura MNM - Merlin Norkrans Modificado (Marx 1969) autoclavado à 121º C por 30 minutos e vertido em câmara de fluxo laminar vertical, as quais foram incubadas na ausência de luz, à temperatura de 25±1ºC em incubadora BOD. Os fungos foram replicados, quinzenalmente, para manutenção das culturas. No preparo do meio MNM, foram adicionados os seguintes reagentes para 1L: $CaCl_2$ (0,05 g L^{-1}), NaCl (0,025 g L^{-1}), $(NH4)_2HPO4$ (0,15 g L^{-1}), $MgSO_47H_2O$ (0,15 g L^{-1}), $FeCl_3$ (1 g L^{-1}), 4mL de KH_2PO4 (0,125 g L^{-1}) 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.

Micélios de 11 mm de diâmetro foram retirados das extremidades de culturas puras de *P. tinctorius* (isolado 24) e *P. albus* (isolado ES01) com 25 dias de idade e transferidos para erlenmeyers (três discos em cada), contendo 80 ml de meio MNM sem adição de ágar para as doses de pó de ferro: 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g L^{-1}. Para cada dose, foram feitas 5 repetições. O pH do meio MNM foi ajustado para 5,5 - 5,6. Os fungos, em meio líquido, permaneceram sob agitação, à temperatura de 25±1ºC, em incubadora BOD, durante 20 dias.

Após esse período, os fungos foram retirados do meio de cultura com auxílio de uma peneira e gaze, e lavados 3 vezes com água deionizada para eliminar possíveis resíduos do pó de ferro. Posteriormente, realizou-se o peso úmido

(g) dos isolados fúngicos e mediu-se o pH do meio de cultura MNM de cada dose de pó de ferro. As amostras dos fungos e do meio de cultura foram congeladas e secas por liofilização para posterior análise química. Os isolados fúngicos secos foram pesados.

Material sólido particulado de Fe

O MSPFe utilizado no experimento foi o minério de Fe em pó que é estocado no quintal de indústrias de mineração. O minério apresentou 264,0 mg/dm^3 de Fe e é composto por diversos outros elementos e matéria orgânica (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação dos parâmetros presentes no MSPFe

PARÂMETROS	VALORES
pH	9,6
Fe (mg/dm^3)	264,0
P (mg/dm^3)	60
K (mg/dm^3)	45
Ca (cmol$_c$/dm^3)	3,6
Mg (cmol$_c$/dm^3)	0,3
Cu (mg/dm^3)	3,5
Zn (mg/dm^3)	3,4
Mn (mg/dm^3)	294,5
S (mg/dm^3)	65,6
B (mg/dm^3)	0,80

Análise nutricional do micélio fúngico

A análise de nutrientes do micélio dos isolado 24 e ES01 foi realizada após a secagem por liofilização e pesagem da massa seca. Os teores de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu e B foram quantificados, simultaneamente, por espectrômetro de

emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES), após digestão com HNO_3 concentrado (Merck) e H_2O_2 (Merck), em sistema de digestão aberta (Peters, 2005). Condições do ICP: fluxo do plasma: 8,0 L min^{-1}, gás auxiliar 0,70 L min^{-1} e gás carreador 0,55 L min^{-1}.

3.2 Experimento *in vivo* do crescimento de plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) micorrizadas expostas ao Fe e dois pHs

Uma espécie nativa de restinga, *Schinus terebinthifolius* Radii (Anacardiaceae) foi utilizada para ter seu crescimento testado sob a influência de sulfato de Fe (0, 1, 2 e 4mM de $FeSO_4$) e níveis de pH diferentes (3,0 e 5,5). Esta espécie arbustiva é componente da comunidade vegetal de restinga após duna, e ajuda a estabilizar as dunas de areia.

As sementes foram coletadas de plantas no parque Paulo César Vinha, levadas ao laboratório onde foram escarificadas e lavadas em água destilada e embebidas em solução a 5% de hipoclorito de sódio por 5 min e depois em uma solução de Captan 0,1% por 1 min, para evitar a infestação de micro-organismos. Após a secagem à temperatura ambiente, as sementes foram selecionadas para uniformidade no tamanho e usadas dentro de 15 dias.

Substrato de plantio das mudas de Schinus terebinthifolius Raddi

O substrato de plantio para germinação das sementes foi composto por areia previamente esterilizada em autoclave a 121º C, durante 60 minutos, três vezes consecutivas, com um intervalo de 24 horas entre cada esterilização.

Obtenção do inóculo e densidade de esporos

O inóculo da espécie de FMA *Claroideoglomus etunicatus* (Inóculo SCT101A) foi obtida da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG – www.furb.br/cicg - FURB, Blumenau, SC).

Foi realizada uma extração de esporo do inóculo SCT101A de acordo com o método descrito por Gerdemann e Nicolson (1963), para análise da densidade de esporos contida no inóculo. A densidade obtida foi de 307,6 esporos /cm^3.

Inoculação das plantas de Schinus terebinthifolius Raddi

Sementes de *S. terebinthifolius* Raddi foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 2,5% por 5min e em álcool etílico 70% por 2 min, posteriormente lavadas 3x

em água deionizada e embebidas durante 30min em água corrente. Em seguida, a germinação foi feita em bandejas plásticas contendo substrato de areia autoclavada.

Após a germinação, o plantio foi realizado em substrato composto da mistura de areia previamente autoclavada e 10ml de inóculo SCT101A do *C. etunicatus* (307,6 esporos/cm^3)distribuídos em vasos de 1L para que favorecesse o contato imediato da radícula das plântulas de restinga com o fungo.

Neste experimento, foram utilizadas 64 plântulas da espécie. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações sulfato de Fe (0, 1, 2 e 4mM de $FeSO_4$) aplicado em solução, e pH diferenciado (3,0 e 5,5), na superfície do solo. O experimento em um estudo randomizado desenhado foi replicado com arranjo de blocos de 8 tratamentos não micorrizados e 8 micorrizados com *C. etunicatum*, sendo cada repetição representada por um vaso. Devido à natureza arenosa do solo, os tratamentos foram regados com água destilada a cada 2 dias e receberam, 2 vezes por semana, solução nutritiva de Clark e as doses de $FeSO_4$ com pH diferenciado.

Após 90dias no plantio as amostras de plantas foram desidradatas 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 (MStotal = MSPA + MSR) segundo a fórmula:

Eficiência Micorrízica (%) = [(MStotal planta micorrizada - MStotal planta-controle)/(MStotal planta-controle)] 100

Determinação da taxa de colonização micorrízica

Aos 90 dias avaliou-se o grau de colonização micorrízica das raízes de aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi), 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).

Análise dos dados

No experimento *in vitro*, as cinco doses de MSPFe utilizadas no experimento foram definidas após testes piloto realizados por integrantes do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB) a fim de escolher doses que

causariam possíveis efeitos representativos nos isolados fúngicos. Com as medidas de pH do meio de cultura e do peso seco dos isolados fúngicos, foram realizadas análises prévias com Excel 2007 for Windows, fazendo-se as diferenças da biomassa dos fungos entre o controle e as doses de MSPFe. O teor de macro e micronutrientes em todos os experimentos foram analisados por meio de gráficos com médias e respectivos desvios padrões e de diagramas de dispersão, a fim de se avaliar as relações da aplicação de diferentes níveis de Fe com demais características monitoradas. Também foi realizado o cruzamento de dados entre os teores de Fe com os demais nutrientes, quando foram calculados os coeficientes de correlação e verificada sua significância estatística. Para análise inferencial das médias, os dados das diferentes doses aplicadas foram confrontados com o controle a partir pelo teste t pareado, para as duas espécies ectomicorrízicas a fim de se verificar a evolução dos diversos parâmetros à medida que as doses de MSPFe aplicadas aumentavam. Para as análises inferenciais, o nível de significância adotado foi 5% e o programa estatístico utilizado foi o SPSS ® 20.0. A análise multivariada de componentes principais (PCA) foi usada para relacionar o teor de nutrientes, a biomassa seca e o pH dos fungos ectomicorrízicos sob cinco concentrações de MSPFe, utilizando o programa Fitopac 2.1.2.85.

O experimento *in vivo* foi disposto em blocos casualizados com quatro repetições. Os efeitos da inoculação do fungo e tratamento com Fe no crescimento e massa seca das plantas de aroeira foram analisados estatisticamente pelo two-way ANOVA. Quando um fator ou nenhuma interação entre os fatores foi considerada estatisticamente significativa, realizamos comparações de pares, por meio de um teste t e corrigidos os resultados correspondentes para comparações múltiplas pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$. Os dados de eficiência micorrízica e de colonização por fungos micorrízicos foram analisados estatisticamente por análises de variância, após transformação percentual. Quando um efeito significativo do tratamento foi encontrado, os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R e GraphPad Prism 6.0 utilizando $p \leq 0,05$ para testar as hipóteses.

4. RESULTADOS

4.1 Análise do MSPFe e pH em duas espécies de fungos ectomicorrízicos

As espécies de fungos ectomicorrízicos estudados (*Pisolithus albus* e *Pisolithus tinctorius*) exibiram resultados diferenciados em relação à acumulação de biomassa fúngica quando expostos ao MSPFe (Figura 2).

A espécie *P. albus* apresentou incremento na sua biomassa seca em todas as concentrações de MSPFe analisadas, sendo as maiores estimulações foram observadas nas concentrações de 2 e 4 g L^{-1} de MSPFe (Figuras 2A e 3). O pH extracelular correlacionou-se positivamente com o aumento das concentrações de MSPFe no meio de cultura (r^2=-0,74; $p<0.05$) (Tabela 2). Os menores valores de pH extracelular foram observados nas concentrações de 2 e 4 g L^{-1} de MSPFe (Figura 2A, Tabela 1). Curisosamente, estas concentrações mostraram ser mais eficientes em promover incrementos na biomassa seca fúngica em comparação com as demais (Figura 2A e 3).

O fungo *P. tinctorius* teve seu crescimento inibido com o aumento na concentração de MSPFe no meio de cultura (Figuras 2B e 3). Nas concentrações de 4 e 8 g L^{-1} de MSPFe, a biomassa seca apresentou inibições significativas de 12.89 e 36.61%, respectivamente, quando comparado ao controle sem exposição ao MSPFe (Figura 3). Por outro lado, o pH extracelular apresentou uma correlação negativa com a biomassa seca (r^2=-0,88; $p<0.05$) (Tabela 3), ou seja, a inibição na biomassa foi acompanhada de aumentos significativos no pH extracelular (Figura 2B).

Ambas as espécies fúngicas apresentaram respostas distintas à exposição ao MSPFe durante a acumulação de biomassa. Os resultados mostraram uma interação significativa entre os fatores “espécie fúngica” e “concentração de MSPFe”, porém no efeito global sobre a biomassa, o fator “espécie fúngica” é responsável por 89.49% do total da variância ($p<0.001$; Tabela 2).

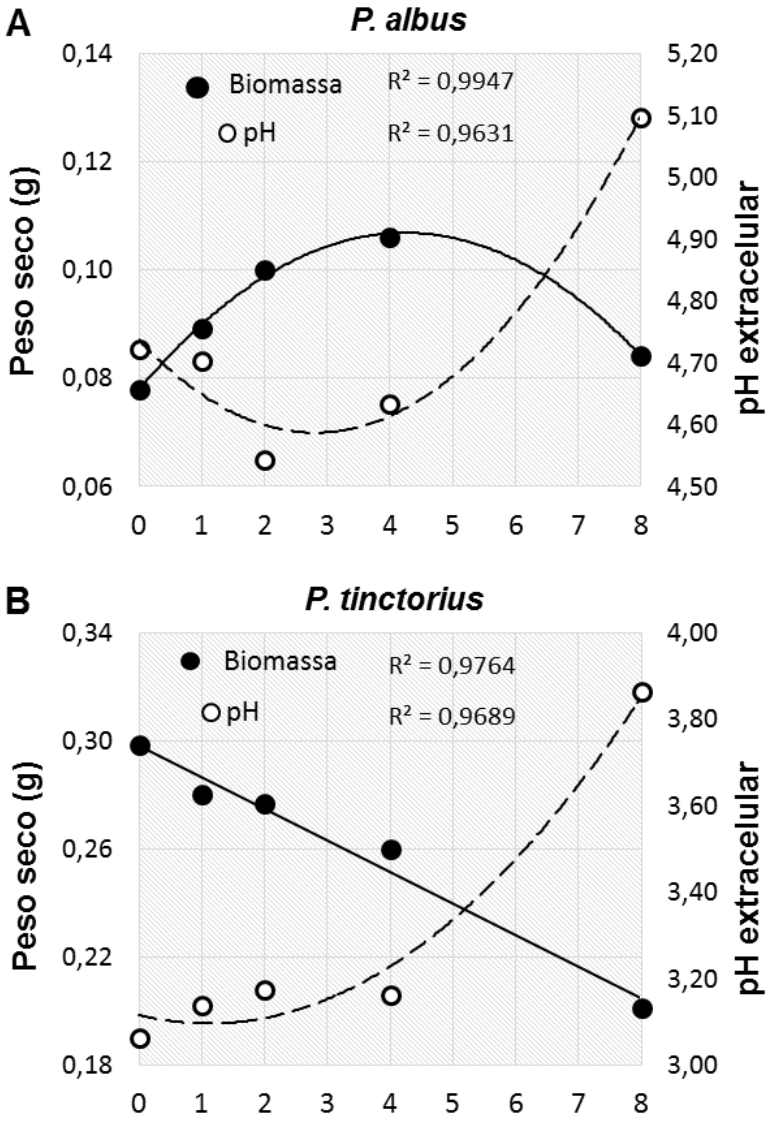

Figura 2. Regressão dos efeitos de diferentes concentrações de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre a biomassa seca e pH extracelular de *Pisolithus albus* (A) e *Pisolithus tinctorius* (B). Equações: $y = -0,0016x^2 + 0,0137x + 0,0779Y$ e $R^2=0,99$ para *P. albus*; $y = 0,09594X + 2,994$ $R^2=0,98$ para *P. tinctorius.*

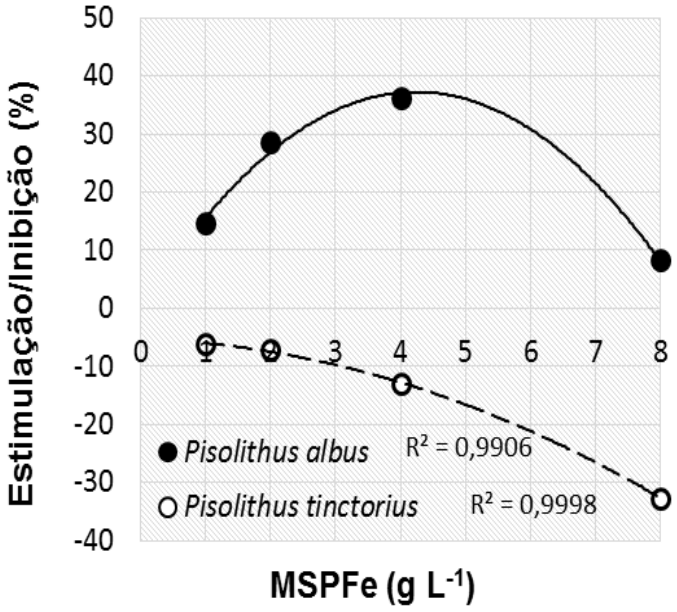

Figura 3. Regressão da porcentagem de inibição (A) ou estimulação (B) na biomassa seca de *Pisolithus albus* e *Pisolithus tinctorius* nas diferentes concentrações de material sólido particulado de ferro (MSPFe) (n=4). Equações: y = -430,64x^2 + 5249,4x + 871,96 e R^2 = 0,89 para *P. albus*; y = 4679x - 1406,9 e R^2 = 0,98 para *P. tinctorius*.

A análise do conteúdo de Fe no micélio de *P. albus* mostrou ser estimulado nas concentrações de 1 e 2 g L^{-1} de MSPFe sendo que a partir desta última concentração a acumulação de Fe foi constante (Figura 4). Entretanto, em *P. tinctorius,* o conteúdo de Fe apresentou aumentos significativos com os incrementos nas concentrações de MSPFe no meio de cultura**,** sendo que o maior conteúdo foi observado na concentração de 8 g L^{-1} (Figura 4). Foi observada uma correlação negativa significativa entre conteúdo de Fe e a biomassa seca de *P. tinctorius* (r^2=-0,88; $p<0.001$) (Tabela 3).

.

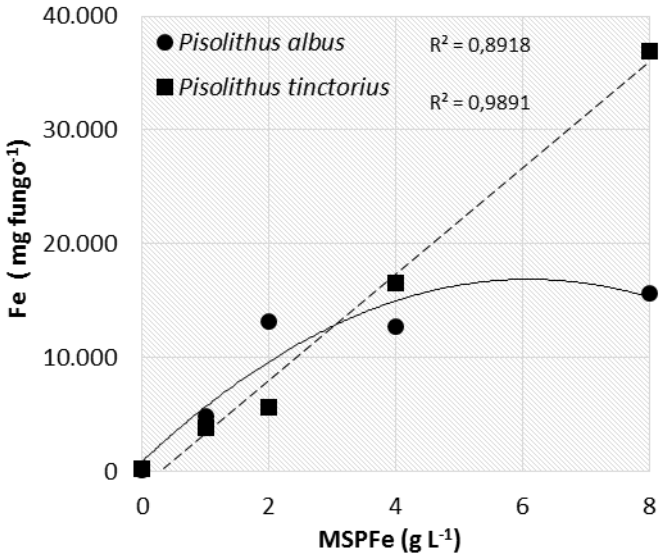

Figura 4. Regressão do conteúdo de ferro (Fe) no micélio de *Pisolithus albus* e *Pisolithus tinctorius* crescendo sob diferentes concentrações de material sólido particulado de ferro (MSPFe). (n=4).

Tabela 2. Análise de correlação de Pearson entre as variáveis concentração de ferro (MSPFe), peso seco, pH e macro (P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn) determinadas no fungo *Pisolithus albus.* Valores em negrito representam correlações estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade.

	MSPFe	Peso Seco	pH	Ca	Mg	K	P	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
MSPFe	1,00	0,08	**0,74**	**0,60**	**0,74**	**0,76**	**0,75**	-0,03	**0,64**	**0,62**	**0,80**	**0,99**	**-0,80**
Peso seco		1,00	-0,41	-0,24	0,30	0,32	0,44	0,40	0,27	0,33	0,42	0,08	**-0,53**
pH			1,00	**0,58**	0,35	0,30	0,28	-0,22	0,23	0,15	0,26	**0,70**	-0,35
Ca				1,00	**0,70**	**0,52**	**0,58**	0,35	0,21	0,11	0,41	**0,64**	-0,35
Mg					1,00	**0,93**	**0,89**	**0,56**	**0,46**	0,39	**0,83**	**0,78**	**-0,81**
K						1,00	**0,87**	0,41	**0,56**	**0,53**	**0,91**	**0,80**	**-0,82**
P							1,00	**0,54**	**0,51**	**0,48**	**0,90**	**0,77**	**-0,78**
S								1,00	-0,16	-0,22	0,25	0,00	-0,21
B									1,00	**0,86**	**0,69**	**0,66**	**-0,62**
Cu										1,00	**0,69**	**0,65**	**-0,64**
Fe											1,00	**0,84**	**-0,83**
Mn												1,00	**-0,80**
Zn													1,00

Tabela 3. Análise de correlação de Pearson entre as variáveis concentração de ferro (MSPFe), peso seco, pH e macro (P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn) determinadas no fungo *Pisolithus tinctorius.* Valores em negrito representam correlações estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade.

	MSPFe	Peso Seco	pH	Ca	Mg	K	P	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
MSPFe	1,00	-0,88	**0,91**	**0,68**	**-0,46**	**-0,54**	**-0,82**	**-0,83**	**0,94**	**0,91**	**0,99**	**0,99**	**-0,59**
Peso seco		1,00	**-0,88**	**-0,71**	**0,44**	**0,57**	**0,75**	**0,59**	**-0,83**	**-0,78**	**-0,88**	**-0,90**	**0,44**
pH			1,00	**0,77**	**-0,27**	**-0,40**	**-0,64**	**-0,75**	**0,80**	**0,74**	**0,93**	**0,91**	**-0,43**
Ca				1,00	**-0,01**	**-0,24**	**-0,33**	**-0,47**	**0,49**	**0,39**	**0,68**	**0,71**	**-0,15**
Mg					1,00	**0,95**	**0,68**	**0,21**	**-0,54**	**-0,58**	**-0,44**	**-0,47**	**0,43**
K						1,00	**0,72**	**0,21**	**-0,55**	**-0,57**	**-0,52**	**-0,57**	**0,43**
P							1,00	**0,67**	**-0,83**	**-0,85**	**-0,79**	**-0,83**	**0,73**
S								1,00	**-0,81**	**-0,76**	**-0,81**	**-0,81**	**0,72**
B									1,00	**0,98**	**0,93**	**0,93**	**-0,63**
Cu										1,00	**0,91**	**0,90**	**-0,63**
Fe											1,00	**0,99**	**-0,56**
Mn												1,00	**-0,60**
Zn													1,00

O teor de macro e micronutrientes no micélio fúngico de *P. tinctorius* e *P. albus* são apresentados nas Figuras de 5 e 8. Os teores de K e P no micélio de *P. albus* aumentaram significativamente de acordo com o acréscimo das concentrações de MSPFe, ou seja, um efeito dose-dependente (Figura 5A, B). Correlações positivas significativas foram observadas entre os teores de P e K com as concentrações de MSPFe (Tabela 2). Contrariamente, *P. tinctorius* apresentou uma redução significativa no acúmulo destes nutrientes com o incremento nas doses de MSPFe (Figura 5A, B), mostrando, portanto, correlação negativa significativa (Tabela 3).

O teor de S em *P. albus* não apresentou alterações significativas em todas as concentrações de MSPFe, enquanto para *P. tinctorius* o acúmulo deste nutriente reduziu significativamente nas concentrações de 2, 4 e 8 g L^{-1} de MSPFe, quando comparado ao controle (Figura 5C). O teor de Ca, em ambos fungos ectomicorrízicos, manteve-se sem alterações significativas em todas as concentrações de MSPFe quando comparadas ao controle (Figura 6A). O nutriente Mg, para o fungo *P. tinctorius,* reduziu significativamente seu acúmulo nas concentrações de 4 e 8 g L^{-1} de MSPFe, diferente de *P. albus*, onde o teor de Mg aumentou significativamente em 2, 4 e 8 g L^{-1} de MSPFe (Figura 6B).

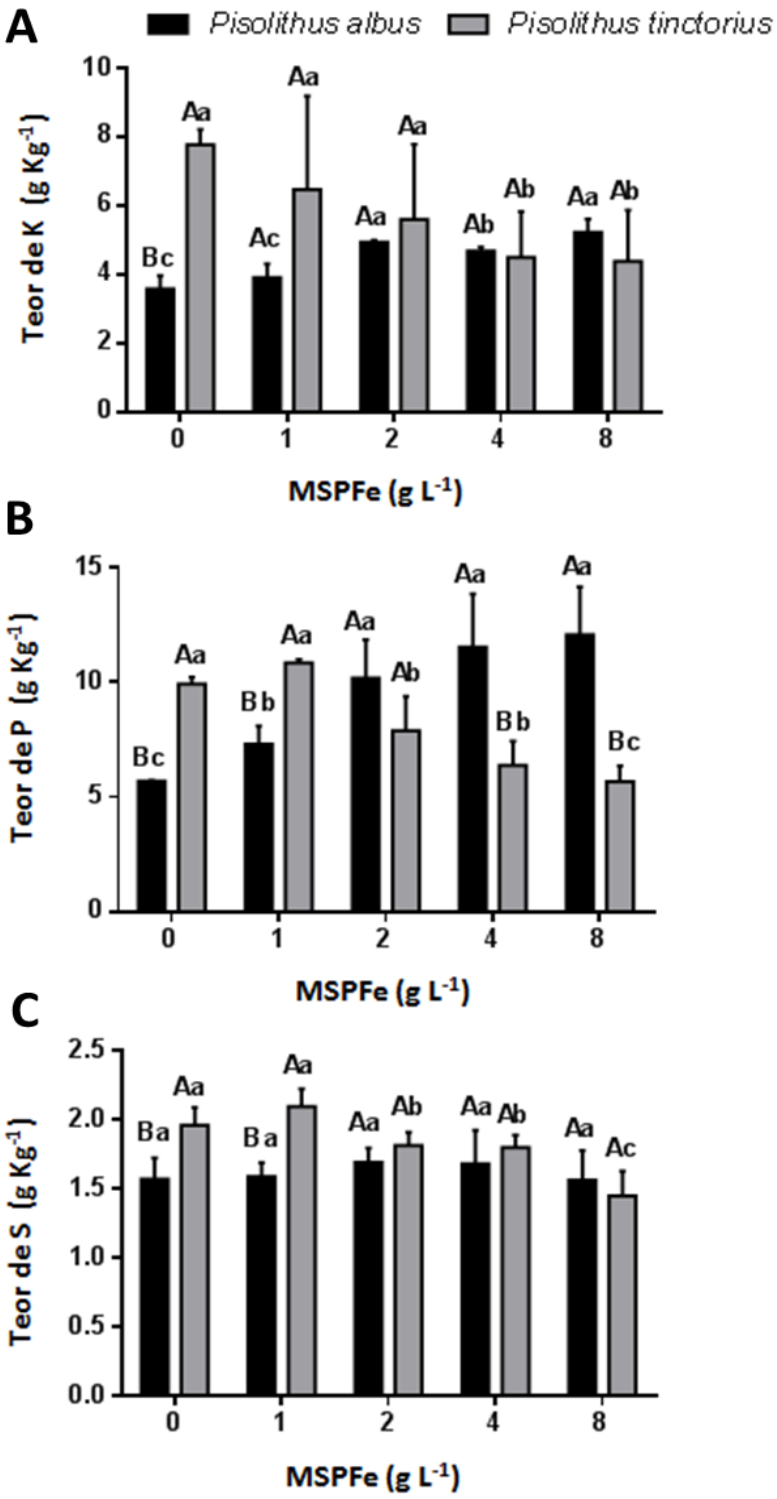

Figura 5. Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre o teor de potássio (P) (A), fósforo (P) (B) e enxofre (S) (C), no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe.

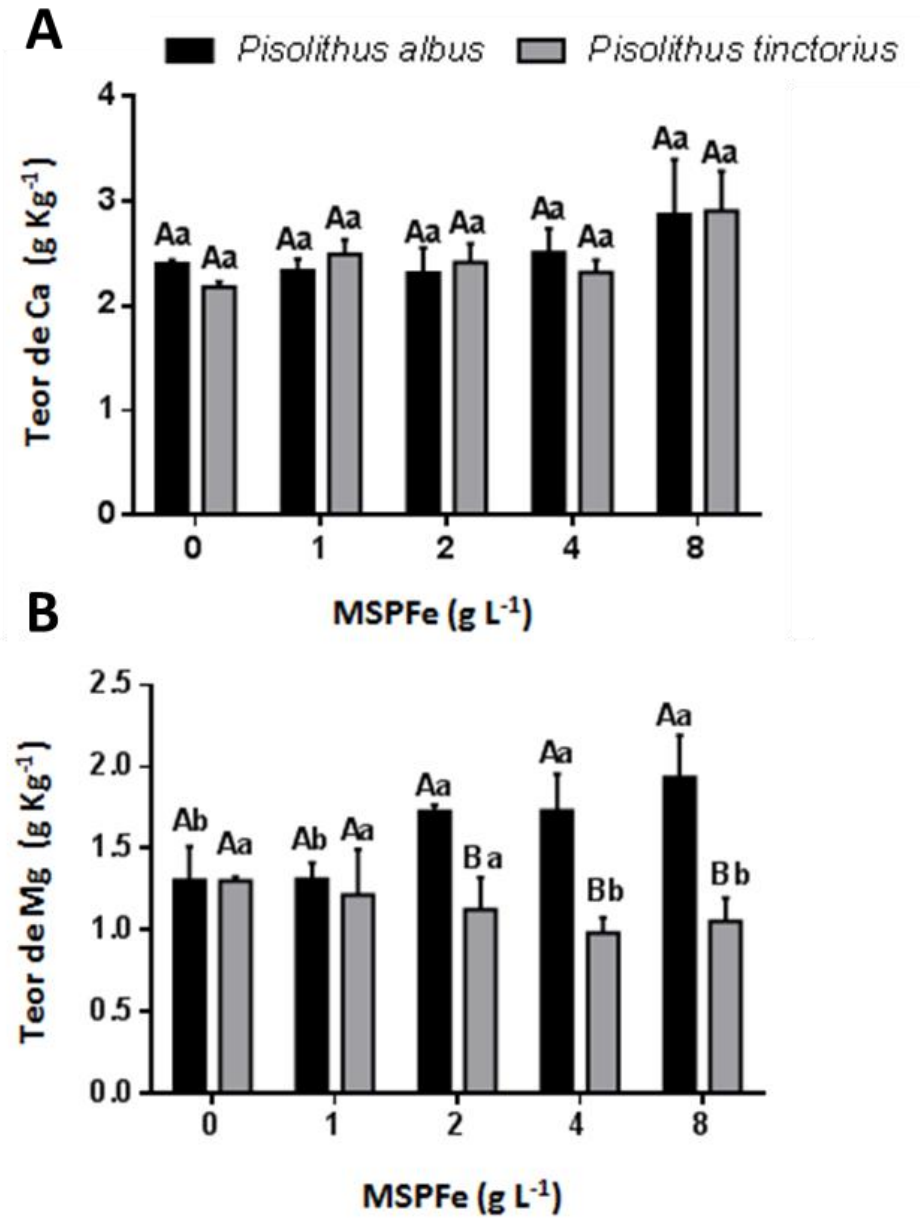

Figura 6. Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre o teor de cálcio (Ca) (A) e magnédio (Mg) (B) no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe.

O teor de Mn no micélio dos fungos *P. albus* e *P. tinctorius* acompanharam o aumento das concentrações de MSPFe, mostrando , portanto, um efeito dose-dependente (Figura 7). Para o B e Cu, houveram aumentos significativos no teor do nutriente com relação ao controle, principalmente no micélio de *P. tinctorius* (Figura 8A, B). O teor de Zn, em ambos os fungos, apresentaram reduções significativas com o incremento nas concentrações de MSPFe (Figura 8C).

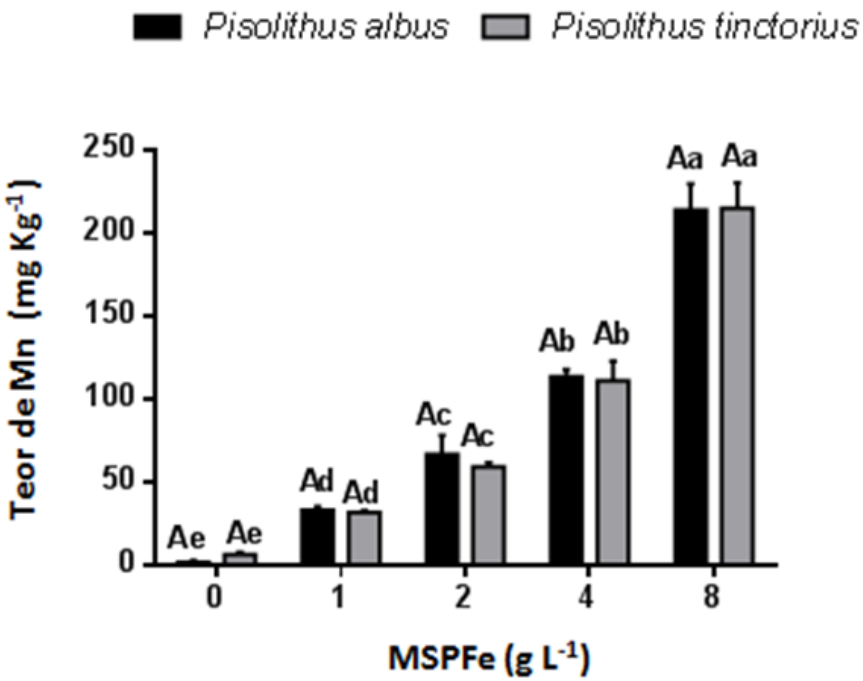

Figura 7. Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre o teor de manganês (Mn) no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe.

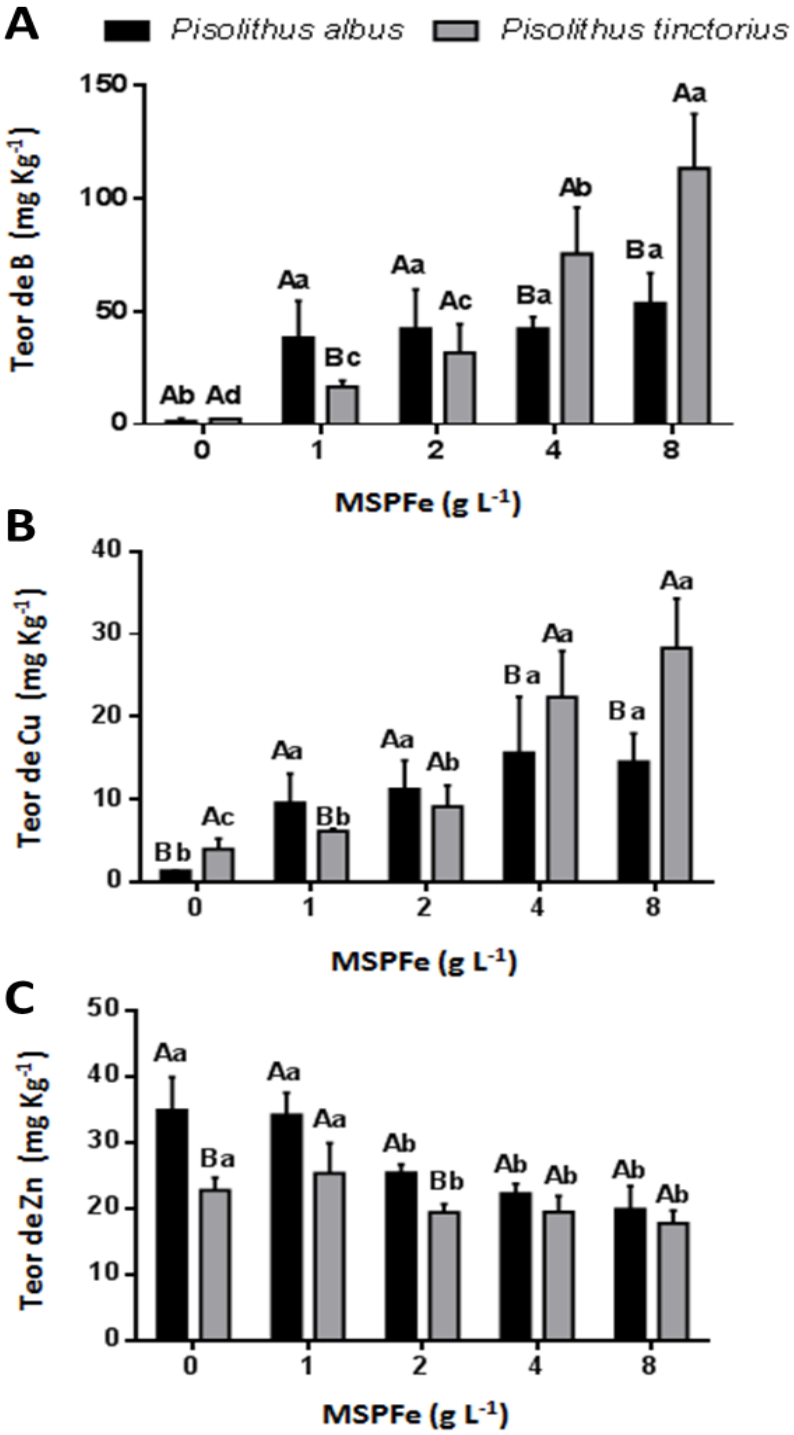

Figura 8. Efeito de diferentes doses de material sólido particulado de ferro (MSPFe) sobre o conteúdo de boro (B) (A), cobre (Cu) (B) e zinco (Zn) (C) no micélio de *Pisolithus albus* (n=4) e *Pisolithus tinctorius* (n=4). Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de MSPFe e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os fungos (*P. albus e P. tinctorius*) na mesma concentração de MSPFe.

As correlações dos teores de macro e micronutrientes com o conteúdo de Fe no micélio dos fungos ectomicorrízicos são apresentados nas figuras 9 e 10.

Para *P. albus* observa-se uma correlação positiva do Fe com todos os nutrientes, com exceção do Zn, que apresentou correlação negativa (Figura 9).

Os nutrientes Cu, B, K, P e Mg apresentaram as melhores correlações, pois os valores do coeficiente se mostraram próximos de 1. As correlações de *P. tinctorius* apresentaram-se variadas para cada nutriente presente no micélio fúngico (Figura 10).

O K, P, S e Mg mostraram correlação negativa, ou seja, quando há um incremento de Fe, o conteúdo destes nutrientes no micélio do fungo reduz significativamente. Entretanto, para Ca, Mn e Cu foram observadas correlações positivas (Figura 10), ou seja, quanto mais Fe presente no meio de cultura, maior o conteúdo desses nutrientes no micélio fúngico.

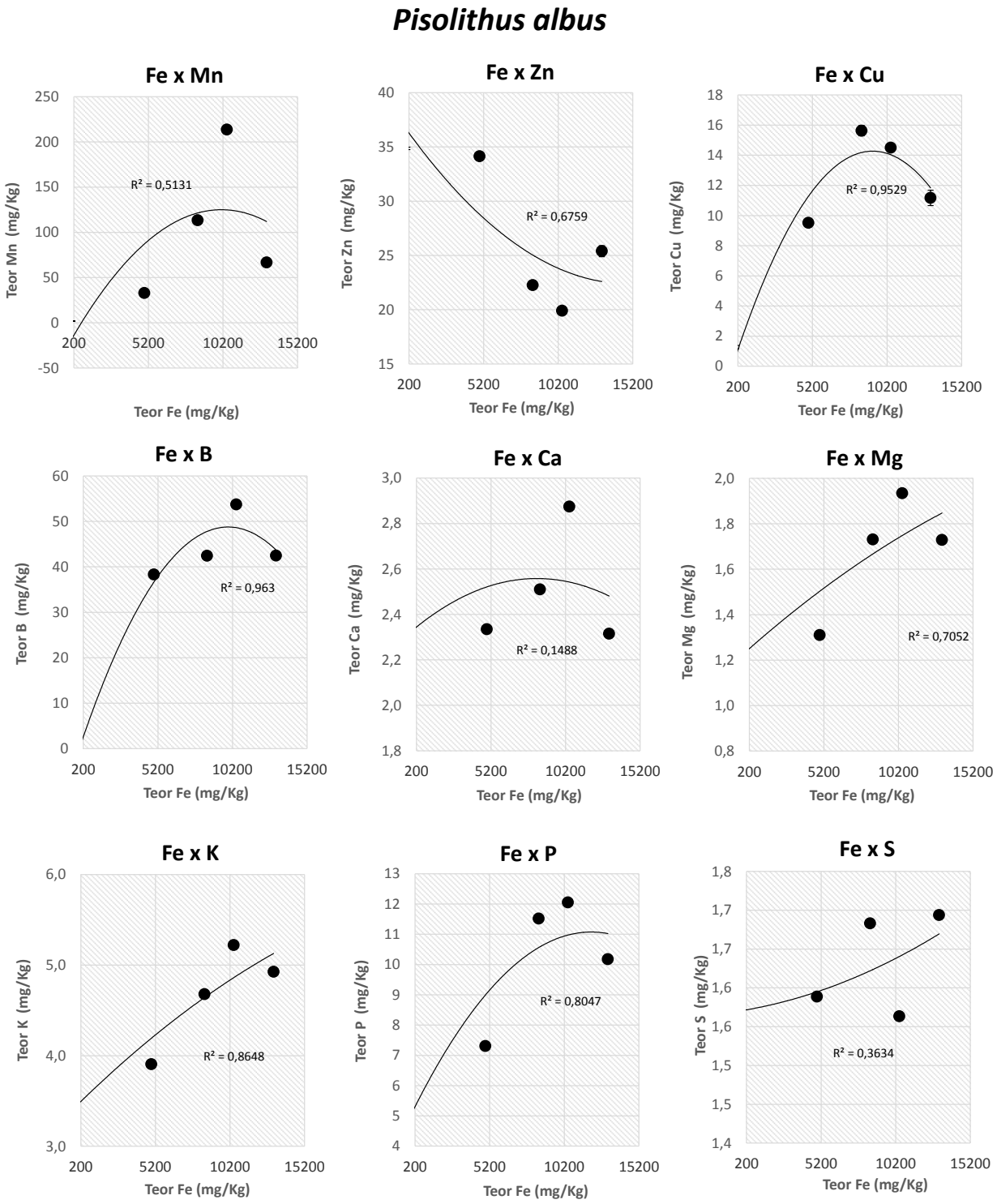

Figura 9. Teores de macro e micronutrientes e ferro (Fe) no micélio fúngico de *Pisolithus albus.*

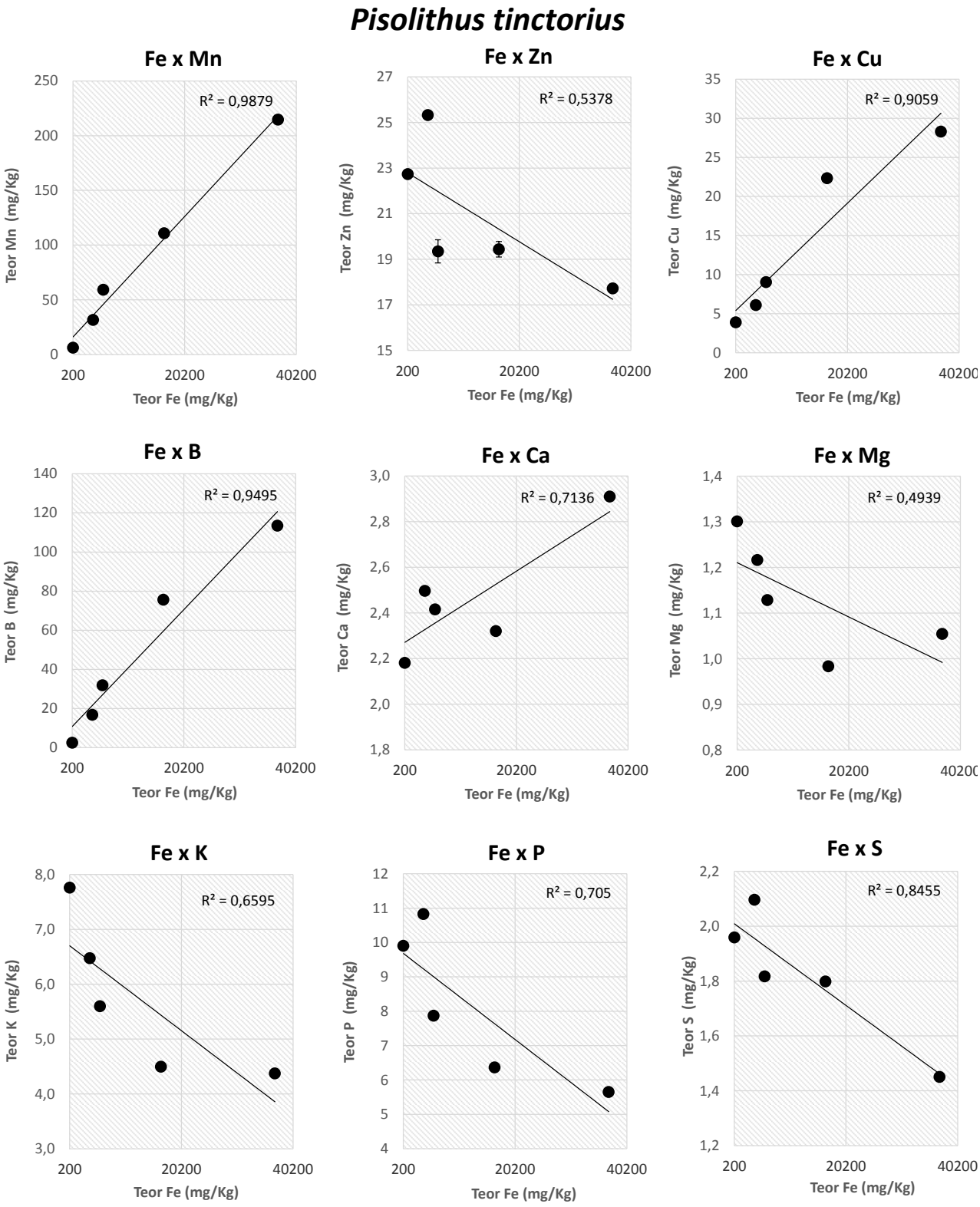

Figura 10. Teores de macro e micronutrientes e ferro (Fe) no micélio fúngico de *Pisolithus tinctorius.*

A análise de multivariada revelou que o fungo *P. tinctorius* apresentou maior biomassa seca e nas concentrações de 0, 1 e 2 g L^{-1} de MSPFe, acumularam mais S e K. Na concentração de 8 g L^{-1} de MSPFe houve maior acumulação de Cu, B, Fe e Mn. Para *P. albus*, a análise mostrou maior influencia do pH ácido, maior acúmulo no conteúdo de Zn nas concentrações de 0, 1 g L^{-1} de MSPFe, e d Mg nas concentrações de 2 e 4 g L^{-1} de MSPFe (Figura 11).

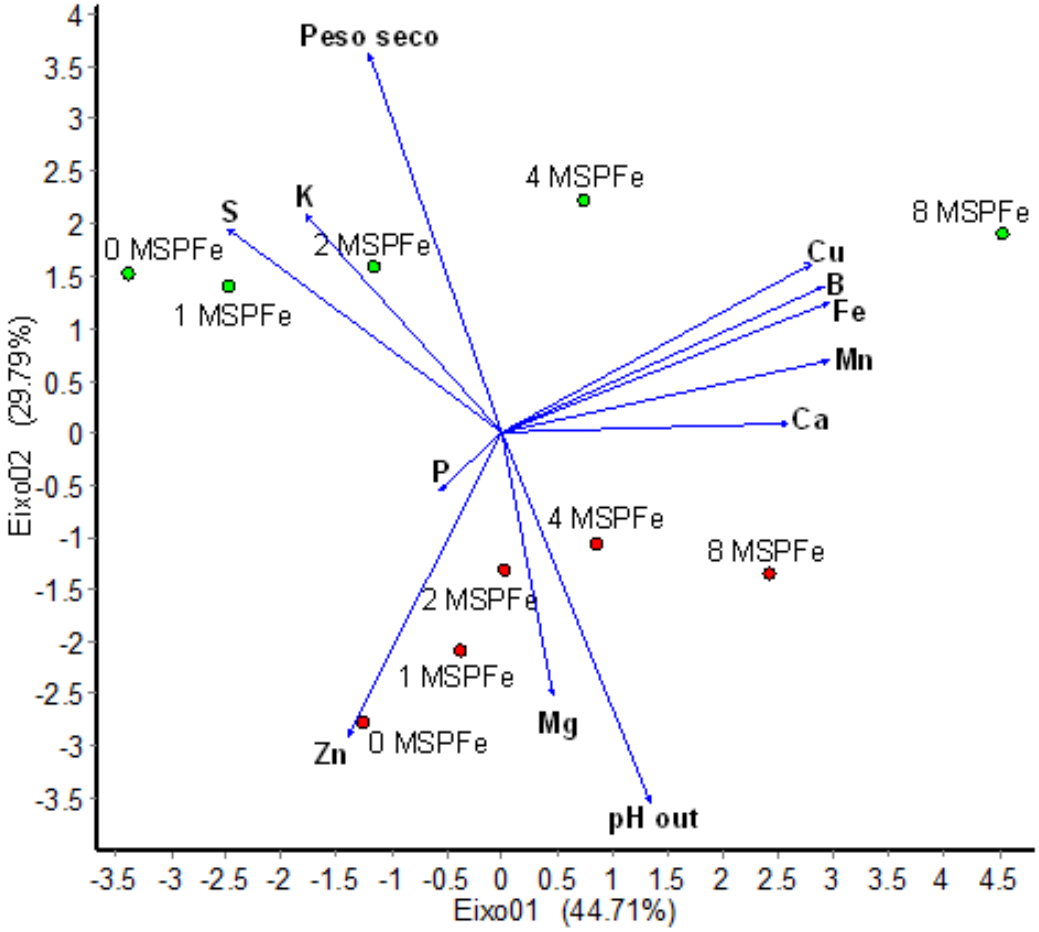

Figura 11. Análise de componentes principais do conteúdo de nutrientes, peso seco e pH dos fungos *Pisolithus albus* (vermelho) e *Pisolithus tinctorius* (verde) expostos a 0, 1, 2, 4 e 8g L^{-1} de material sólido particulado de ferro (MSPFe).

4.2 Análise das plantas de Schinus terebinthifolius Raddi micorrizadas e não micorrizadas expostas ao Fe em diferentes pHs

Os resultados apresentados na Figura 9 revelam as respostas de crescimento de plantas de aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi) cultivadas em solo contaminado por $FeSO_4$ em diferentes valores de pH na presença do FMA *Claroideoglomus etunicatus* (inóculo SCT 101A). Em todas as doses de $FeSO_4$ e em ambos valores de pH (3,0 e 5,5), plantas micorrizadas apresentaram maior e significativo crescimento quando comparadas às plantas sem associação (Figura 12A, B).

Plantas micorrizadas expostas ao $FeSO_4$ em condição de pH 3,0 apresentaram redução significativa na altura, quando comparadas ao controle, nas doses de 1, 2 e 4mM de $FeSO_4$, enquanto em pH 5,5 a redução no crescimento ocorreu nas doses de 2 e 44mM de $FeSO_4$. Plantas sem associação micorrízica não apresentaram diferenças entre o controle e as doses de Fe em ambos os valores de pH (Figura 12A, B).

Os pesos da matéria seca da parte aérea e da raiz também apresentaram diferenças significativas entre as plantas micorrizadas e não micorrizadas em todas as doses de Fe nas duas soluções de pH, com um maior incremento de massa em plantas com a associação simbiótica (Figuras 13 e 14).

Em plantas associadas ao fungo *C. etunicatus* nas soluções de pH 3,0 e 5,5, os pesos secos da parte aérea e raiz apresentaram redução significativa nas três doses de FeSO4 em relação ao controle (Figuras 13, 14). Da mesma forma, plantas não micorrizadas também apresentaram perda no peso seco da parte aérea e raiz em todas as doses utilizadas (Figuras 13, 14). Porém, apenas em pH 3,0 tais plantas não apresentaram diferenças no peso seco da raiz em relação ao controle (Figura 14A).

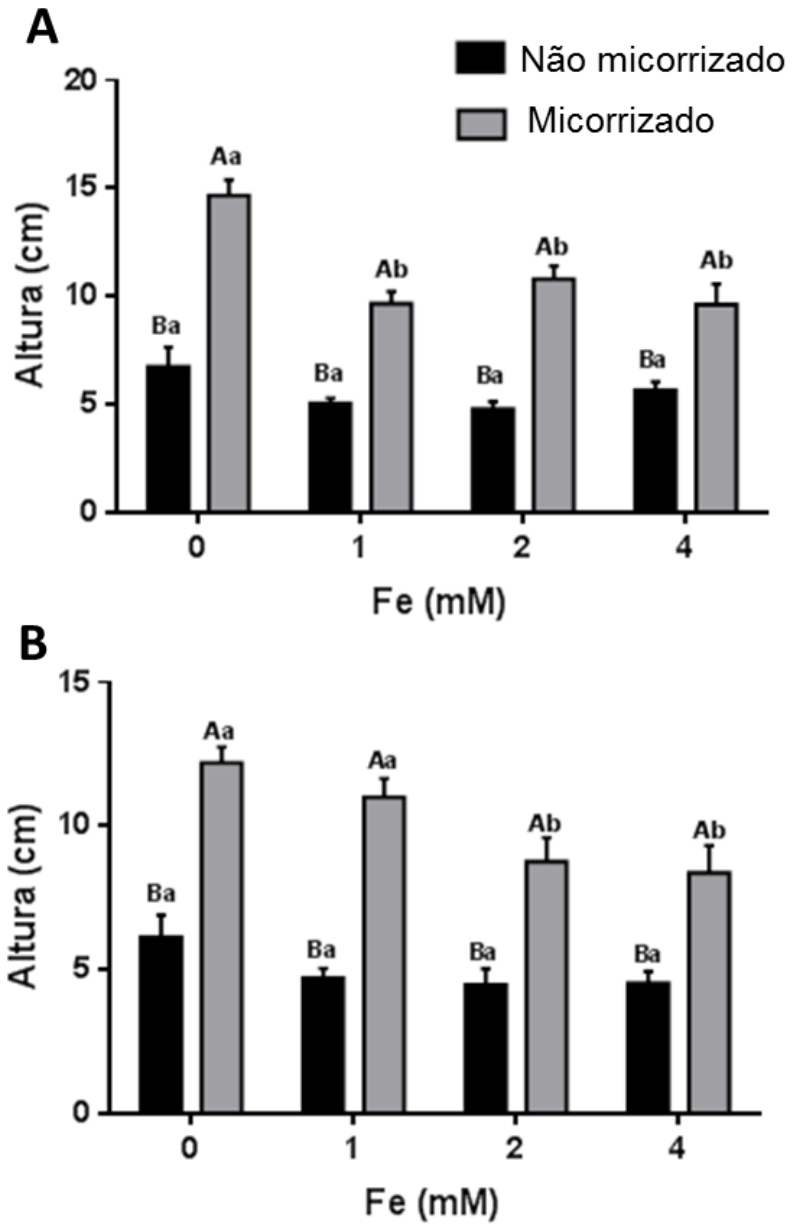

Figura 12. Altura média (cm) das plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi não micorrizadas e em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de $FeSO_4$ (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$.

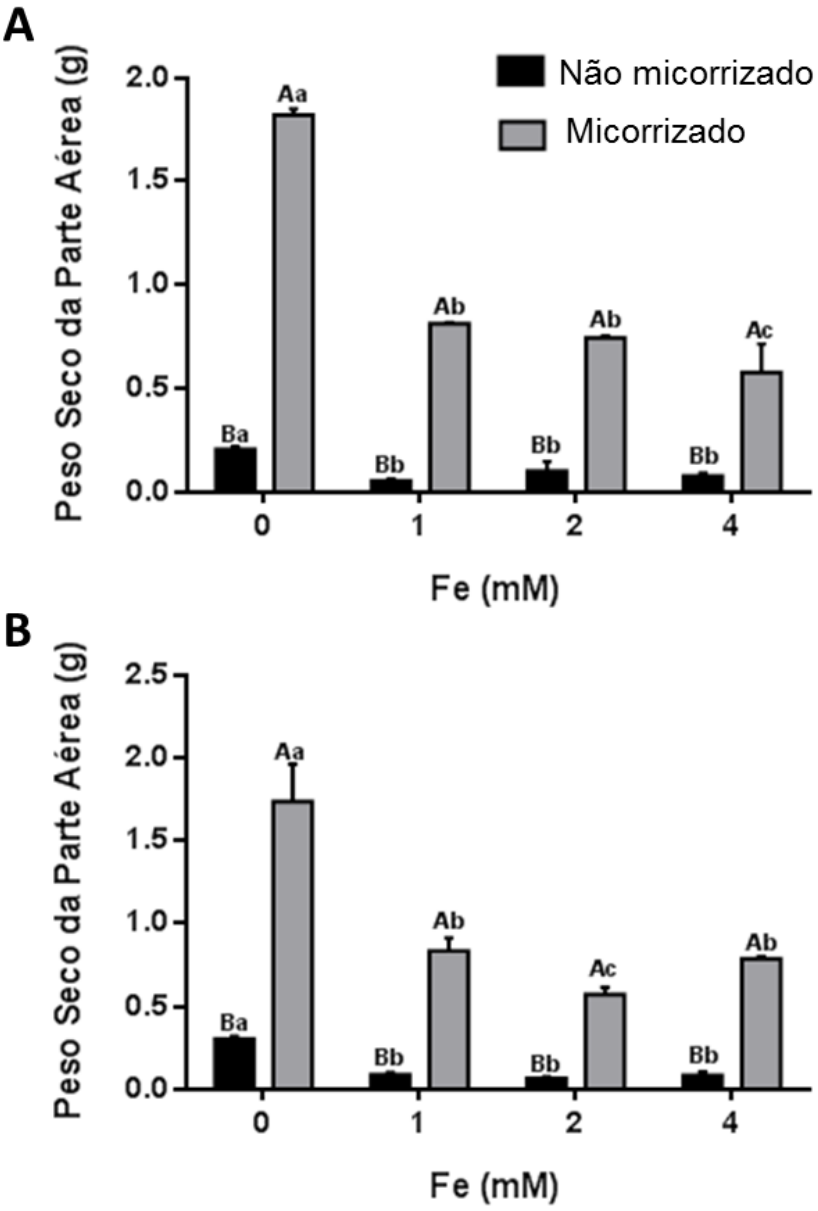

Figura 12. Peso da matéria seca da parte aérea (g) das plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi não micorrizadas e em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de $FeSO_4$ (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$.

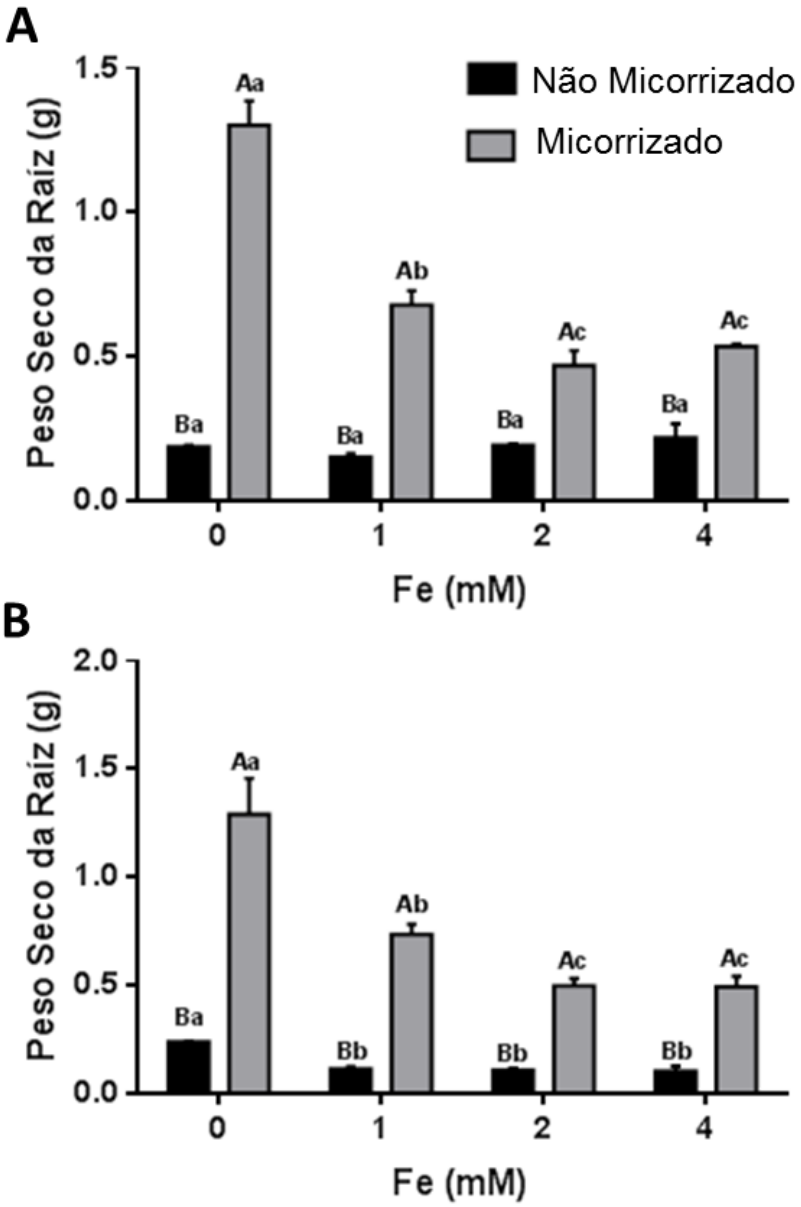

Figura 14. Peso da matéria seca da raiz (g) das plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi não micorrizadas e em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de $FeSO_4$ (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B). Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$.

Na Figura 15 pode-se observar que em todos os tratamentos, inclusive no controle sem a adição de $FeSO_4$, que as plantas com associação micorrízica mostraram-se maiores. As plantas não micorrizadas quando submetidas ás concentrações de $FeSO_4$ apresentaram sinais de toxidez com amarelecimento/bronzeamento das folhas, e também sintomas de deficiência de P com as folhas arroxeadas, menor crescimento e menor peso da matéria seca da parte aérea (Figura 15).

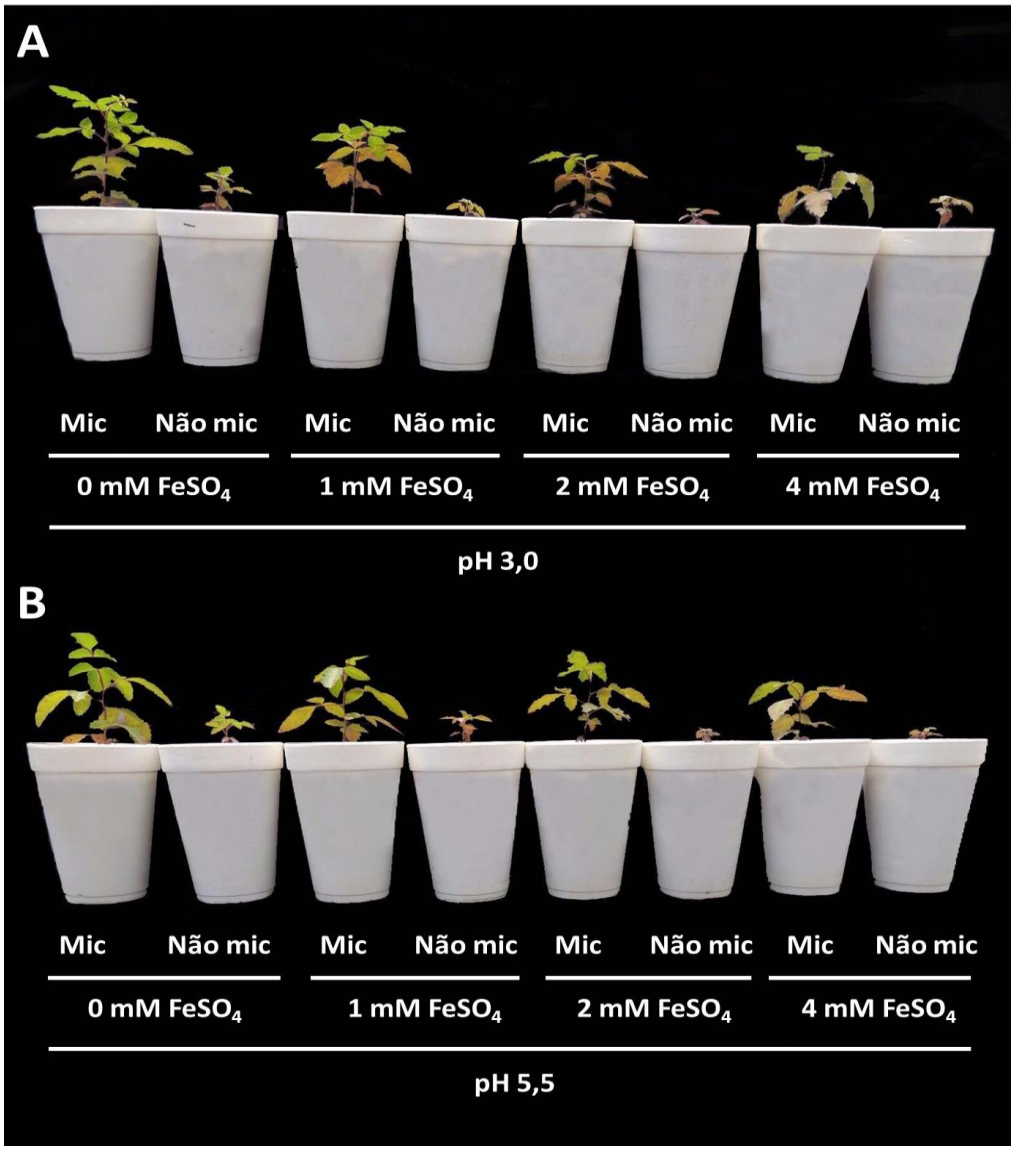

Figura 15. Visão geral do experimento *in vitro* de plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* (Mic) e não micorrizadas (Não mic) submetidas a três concentrações de $FeSO_4$ (1, 2 e 4 mM) em pH 3,0 (A) e pH 5,5 (B).

De acordo com as análises de colonização micorrízica, plantas de *S. terebinthifolius* Raddi sem a adição de metal no solo não tiveram alterações significativas entre as soluções de pH, com porcentagem de colonização acima de 70%. Porém, à medida que foram incrementadas as doses de Fe as porcentagens de colonização micorrízica foram descrescendo significativamente, principalmente em pH 3,0 na dose de 4mM de $FeSO_4$ (Figura 16).

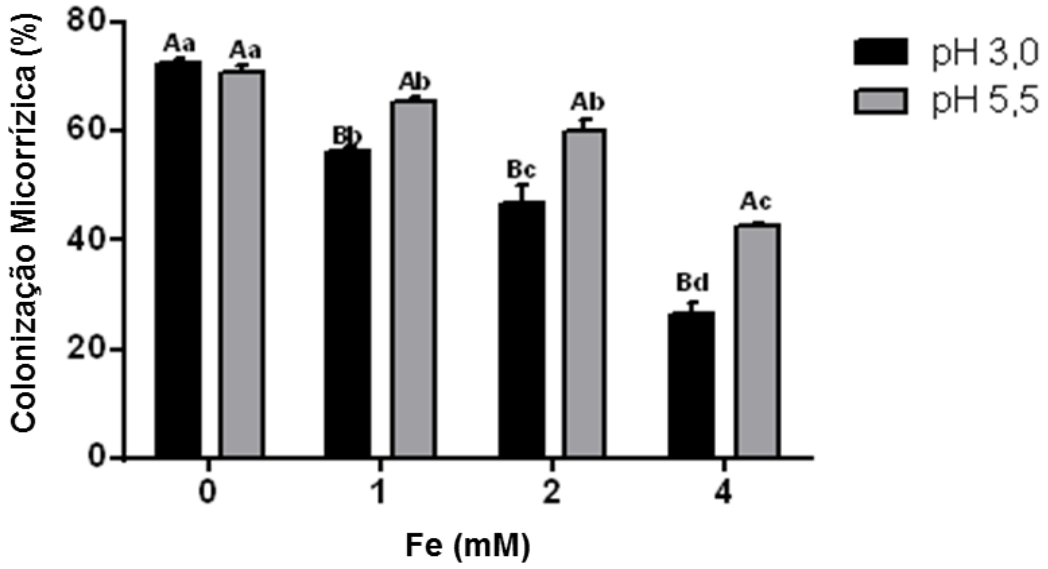

Figura 16. Porcentagem da colonização micorrízica em plantas de Schinus terebinthifolius Raddi em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* submetidas à três concentrações de $FeSO_4$ (1, 2 e 4 mM) em condição de pH 3,0 e pH 5,5. Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$.

Com base nos cálculos da eficiência micorrízica das plantas de aroeira, foi possível observar nas soluções de pH 5,5 que houve uma eficácia de 465,47% sem a adição de Fe e um aumento de acordo com a exposição às concentrações de 1, 2 e 4 mM de $FeSO_4$ (823,20%; 742,64% e 807,47%, respectivamente), sem diferença

significativa entre as doses. Quando as plantas foram expostas à condição de pH 3,0 a eficiência obtida na planta sem a adição de Fe foi de 766,66%. Na dose de 1mM de $FeSO_4$ houve um aumento significativo na eficiência de 1305,17%, enquanto nas doses de 2 e 4 mM as porcentagens foram de 619,81% e 638,22%, respectivamente, diminuindo de forma significativa da eficiência sem adição de Fe (Figura 17).

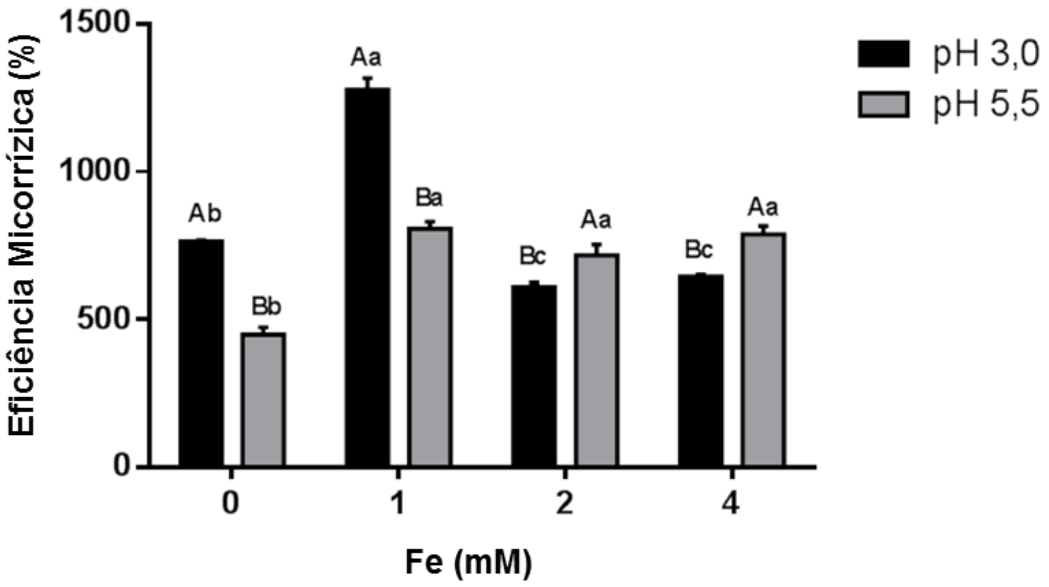

Figura 17. Eficiência micorrízica (%) de plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi em associação simbiótica com o fungo *Claroideoglomus etunicatus* (SCT101A) submetidas às concentrações de $FeSO_4$ (0, 1, 2, 4 mM) em condição de pH 3,0 e 5,5, baseada na biomassa total. Letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento (Não micorrizado ou Micorrizado) correspondem a diferenças significativas entre as concentrações de $FeSO_4$ e letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças entre os tratamentos (Não micorrizado ou Micorrizado) na mesma concentração de $FeSO_4$.

5. DISCUSSÃO

Os fungos micorrízicos são conhecidos por aleviar o estresse a metais em suas plantas hospedeiras, e tal tolerância é dependente da espécie e do seu local de origem (Morselt *et al.* 1986; Rabie 2005; Weishuang *et al.* 2009; Luo *et al.* 2014; Canton *et al*. 2016). O fungo ectomicorrízico *P. albus*, quando comparado ao controle, mostrou uma maior tolerância ao MSPFe nas doses de 2,0 e 4,0 g L^{-1}. Jourand et al. (2010), utilizando o mesmo fungo associado à plantas de *Eucalyptus globulus* sob concentrações tóxicas de Níquel (Ni), observaram que plantas não inoculadas foram significativamente afetadas pelo metal. Porém, quando associadas ao *P. albus*, na ausência e em baixas concentrações de Ni, apresentaram incrementos significativos no desenvolvimento da planta, provando a capacidade do fungo na tolerância ao metal. Jourand *et al.* (2014), também mostraram que isolados de *P. albus* contribuíram para maiores rendimentos na produção de biomassa vegetal, eficiência na nutrição mineral e desintoxicação de solos caracterizados por concentrações elevadas de metais tóxicos como Co, Cr, Fe, Mn e Ni.

O isolado da espécie *P. tinctorius*, apesar de apresentar inibição no crescimento quando exposto à doses elevadas de MSPFe, mostraram maior biomassa micelial. Estudos avaliando o potencial bioacumulador do fungo *P. tinctorius* mostram sua capacidade em melhorar a sobrevivência e desenvolvimento das plantas hospedeiras em condições de toxidez por metais (Silva *et al.* 2010; Targuetta *et al.* 2013). Além disso, experimentos em meio de cultura também revelam a tolerância dessa espécie fúngica a metais tóxicos (Blaudez 2000; Graziotti *et al.* 2001; Crane *et al.* 2010; Canton *et al.* 2016). Este fato pode estar relacionado à produção de pigmentos extracelulares por estes fungos. As melaninas, por exemplo, contêm grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos e aminas que podem fornecer muitos sítios potenciais para ligação ou bioadsorção dos metais. Sendo assim, este pode ser um dos mecanismos de tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados (Gadd 1994; Fogarty & Tobin, 1996; Henson 1999).

Em geral, isolados do gênero *Pisolithus* apresentam grande tolerância a metais, possivelmente por ter ampla distribuição geográfica, habilidade de aumentar o crescimento e tolerância dos hospedeiros em ambientes adversos, além de apresentarem plasticidade e diversidade genética (Marx 1977).

Ambas as espécies avaliadas apresentaram acidificação do meio de cultura em relação ao pH inicial. Esta analogia se mostrou mais evidente nos tratamentos com o *P. tinctorius*. Além disso, para este isolado o teor de P foi menor com o incremento de MSPFe. Zhang *et al*. (2014), mostraram que um isolado de *P. tinctorius* (Pt 715) apresentou alta taxa de efluxo de prótons no meio de cultura, podendo explicar a acidificação ocorrida neste estudo. Os mesmos autores, corroborando com nossas observações, encontraram correlações negativas entre o total de P inorgânico e a concentração total de ácidos orgânicos nas soluções de cultura. A elevada concentração no conteúdo de Fe em *P. tinctorius* pode explicar a menor concentração de P, pois o Fe possui constantes muito elevadas de quelação de P (Zhang *et al.* 2014).

Outra resposta para a acidificação do meio encontrada neste estudo pode estar relacionada à exsudação de ácidos orgânicos pelos fungos. Muitos estudos têm demonstrado que um dos mecanismos que fornecem tolerância a metais para fungos é a quelação extracelular de íons metálicos por metabólitos excretados (Gadd 1994; Ahonen-Jonnarth *et al*. 2000; Ray & Adholeya 2009; Sazanova *et al.* 2015). Devido ao seu baixo peso molecular, os ácidos orgânicos podem interagir com metais tanto fora como dentro da célula, formando complexos estáveis insolúveis e, dessa forma, desempenham um papel especial na adaptação dos fungos para viver em ambientes com altas concentrações de metais (Sazanova *et al.* 2015).

No micélio fúngico de *P. albus*, houve um incremento no teor de P em todas as concentrações de MSPFe, em relação ao controle. Souza *et al.* (2004) realizaram um experimento com 4 isolados fúngicos, dentre eles um isolado da espécie *P. albus*, e observaram que houve um aumento no comprimento radicular e na absorção de P das mudas de *Eucalyptus dunnii* associadas à ECM. Todas as espécies micorrízicas são especialmente conhecidas pelo incremento na absorção de P, principalmente quando este nutriente se encontra em baixas concentrações (Gafur *et al.* 2004; Luo *et al.* 2009ab; Beniwal *et al.* 2010). Recentemente, Ma *et al.* (2014) demonstraram que a espécie vegetal *Populus x canescens* inoculada com *Paxilus involutus* apresentava maior área de superfície de raiz, concentrações mais elevadas de P, Ca, Fe e Zn, aumento da taxa fotossintética e outros fatores. Ademais, tais plantas sugeriam melhoria nutricional, aumento de desintoxicação, e

preparação de defesa nas plantas hospedeiras, contribuindo, provavelmente, para sua tolerância ao Cd.

Foram observadas diferenças no teor de K nos fungos *P. tinctorius* e *P. albus*. Em *P. tinctorius*, quanto maior a concentração de MSPFe utilizada, menor o teor de K, enquanto em *P. albus* houve um aumento no teor de K com o incremento de MSPFe. Em plantas, baixas concentrações de K podem comprometer a capacidade das raízes para oxidar Fe^{2+} em Fe^{3+}, o que resulta na absorção de Fe mais elevada e aumenta a probabilidade de ocorrência de toxicidade (Araújo et al., 2014). Tal fato pode explicar a alta inibição no crescimento micelial do fungo *P. tinctorius*. Além disso, o tipo de fungo pode afetar significativamente a mobilização de K a partir de minério de Fe. Segundo Adeleke et al. (2012), maior perda em porcentagem de K a partir do minério de Fe foi de tratamentos contendo fungo da espécie *Pisolithus tinctorius*.

O teor de Mg em *P. albus* aumentou significativamente com o incremento de MSPFe. Em trabalho realizado por Araújo et al. (2014), o conteúdo de nutrientes da parte aérea de plantas expostas à altas concentrações de Fe mostraram diferenças significativas na interação entre as Fe-EDTA e os nutrientes Zn, Ca e Mg. Além disso, o maior acúmulo de Mg têm sido relatado como atenuador dos efeitos tóxicos de Mn em plantas de *Zea mays* associadas ao fungo *Glomus claroideum* (Malcová *et al.* 2002). Pode-se sugerir, portanto, que o conteúdo de Mg mais elevado observado neste trabalho é, possivelmente, um mecanismo de aleviação aos metais promovido por fungos ectomicorrízicos, uma vez que o MSPFe utilizado também continha alta concentração de Mn.

O teor de Zn, em ambos fungos ectomicorrízicos estudados, apresentou uma diminuição em resposta ao incremento do MSPFe. Araújo et al. (2014), observaram diminuição no teor de Zn devido à exposição ao Fe-EDTA na parte aérea da espécie vegetal *Serapias parviflora*.

O teor de S foi significativo nos dois isolados, porém, somente em *P. albus* houve um aumento na concentração de S à medida que MSPFe foi incrementado. Araújo *et al*. (2014) observaram um aumento significativo na concentração de S nas raízes de *S. parviflora*, o que pode ser explicado pela alta afinidade de ligação entre hidróxidos de Fe e óxidos de S.

As ECMs são capazes de mobilizar diversos nutrientes orgânicos e inorgânicos, porém as habilidades de diferentes fungos ectomicorrízicos em mobilizar esses nutrientes podem ser espécie específica (Landeweert *et al*. 2001).

Ambos os fungos ectomicorrízicos utilizados foram isolados de locais com influência do MSPFe. Muitos autores sugerem a existência desta relação (Jones & Hutchinson 1986; Colpaert & Van Assche 1987; Weissenhorn *et al*. 1994; Adriaensen *et al.* 2003). Sendo assim, este pode ser motivo dos fungos se mostrarem tolerantes à contaminação por MSPFe, apesar das diferenças de biomassa.

Os trabalhos nessa área ainda são muito escassos, e poucos estudos são referentes ao efeito do Fe no crescimento de fungos ectomicorrízicos. Porém, a eficiência desses fungos já foram testadas e aprovadas em muitos estudos com outros metais (Silva *et al*. 2010). As ECMs se mostram tolerantes aos metais pesados na maioria dos estudos e podemos observar que elas melhoram o crescimento de plantas em solos contaminados. Porém, os fungos possuem diferenças quanto a sua tolerância, como foi relatado por Targuetta *et al*. (2013), cujo trabalho mostrou que dos 4 isolados fúngicos utilizados, apenas 2 se destacaram quanto a sua eficiência na sobrevivência e aumento de matéria seca das plantas. Para que se obtenham resultados satisfatórios, deve-se levar em consideração a associação planta-fungo, já que cada um responde ao metal de uma forma, apesar de serem eficientes, os fungos ectomicorrízicos se diferenciam na capacidade de tolerar o metal presente no local. O gênero *Pisolithus* se destaca em muitos trabalhos por melhorar o crescimento e sobrevivência das plantas em solos contaminados (Grazziotti *et al*. 2001; Silva et al. 2010; Targuetta *et al*. 2013).

Após avaliação *in vitro* de fungos micorrízicos expostos à altas concentrações de Fe, foram avaliadas plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) micorrizadas e submetidas a soluções de pH 3,0 e 5,5 do metal. Tais análises *in vivo* são importantes para a compreensão de como o estabelecimento da simbiose é afetado pelo Fe.

A toxicidade de Fe nas plantas normalmente é encontrada nos solos de pH baixo e/ou que tem pouca drenagem. No litoral do Espírito Santo, crescente número de usinas do setor de mineração e beneficiamento de minério de Fe é responsável pela emissão de poluentes atmosféricos. Sendo assim, o efeito combinado de

MSPFe e o baixo pH da chuva ácida condicionada pela emissão de SO_2, aumentam a disponibilidade do Fe prontamente disponível para absorção, podendo comprometer a sobrevivência de espécies nativas sensíveis (Hell & Stephan 2003; Kuki *et al*. 2008; Ricachenevsky & Sperotto, 2014). Neste trabalho não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados em relação ao pH, principalmente em plantas sem associação micorrízica. Ambas as doses de pH combinadas às concentrações de Fe afetaram fortemente o crescimento da planta, peso da matéria seca tanto da parte aérea quanto da raiz e sintomas visíveis nas folhas, possivelmente, relacionados à toxicidade de Fe. De acordo com Rodrigues e Rodrigues (2015), o pH do solo, níveis de P e acúmulo de Fe foliar são os principais fatores que determinam o crescimento das plantas em minas de minério de Fe. O acúmulo excessivo de Fe foliar causa estresse oxidativo severo, principalmente do radical hidroxil (*OH) através da reação de Fenton (Hendry & Brocklebank, 1985; Becana *et al.* 1998), pela utilização do Fe^{2+}, que produz excesso de radicais livres e provoca danos nas membranas e na estrutura das células num processo irreversível (Kobayashi & Nishizawa, 2012).

Plantas sem a associação também apresentaram algumas folhas arroxeadas próximas às margens, as quais podem estar relacionadas à sintomas de deficiência de P. Esta deficiência pode estar relacionada à alta concentração de Fe no solo funcionando como um quelante de P (Zhang *et al*. 2014).

Contrário aos resultados de plantas não micorrizadas, plantas associadas ao FMA *C. etunicatus* apresentaram maiores parâmetros de crescimento. A redução da toxicidade à metais em plantas associadas com FMAs foi descrito anteriormente (González-Guerrero *et al*. 2008; Bonfante & Genre 2010; Phieler *et al*. 2013; Jin *et al.* 2015), porém, poucos avaliam a toxicidade ao Fe. Tais plantas geralmente apresentam maior crescimento, menores concentrações de Fe nas raízes e parte aérea, e sem sintomas de toxicidade ao metal, o que pode ser devido a uma nutrição melhorada (Nogueira *et al.* 2007; Rodrigues & Rodrigues 2015). Nossos resultados também demonstraram claramente uma diferença significativa na altura e peso seco da raiz e parte aérea de plantas de aroeira micorrizadas tanto em pH 3,0 quando em pH 5,5 quando comparadas à plantas sem associação. Nogueira *et al*. (2007), avaliando plantas de soja associadas ao *C. etunicatus* e *Glomus macrocarpum* e Canton *et al*. (2016), analisando o efeito do Mn em plantas de eucalipto micorrizadas, também mostraram que plantas em associação à fungos micorrízicos

não apresentaram sintomas de toxidez ao Mn e Fe e os conteúdos dos metais na parte aérea das plantas foi menor em comparação com plantas não micorrizadas. Podemos sugerir, dessa forma, que o FM protege a planta hospedeira da absorção excessiva de Fe.

Rodrigues e Rodrigues (2015), avaliaram o crescimento de plantas de *Macaranga peltata* em minas de minério de Fe abandonadas com adição do FM *Rhizophagus irregulares.* Os autores mostraram efeitos positivos da micorrização na altura, diâmetro do caule e biomassa das plantas.

A colonização micorrízica sem a adição de Fe não foi afetada pela diferença de pH. Corroborando com tais resultados, Wang *et al*. (1994), mostraram que em duas culturas de aveia e uma de batata colonizadas com FMAs, a porcentagem de colonização micorrízica foi pouco afetada pelo pH do solo de um intervalo de 4,5 para 7,5. Segundo os autores, mudanças na porcentagem podem surgir a partir de alterações na taxa de crescimento da raiz ou de crescimento dos fungos.

A eficiência micorrízica em pH 5,5 foi maior quando adicionadas concentrações de Fe ao solo, exceto na dose de 1mM, em relação à eficiência sem a adição do metal. Canton *et al.* (2016) avaliando o potencial de micorrizas em plantas de eucalipto, também observaram aumento na eficiência micorrízica à medida que as plantas foram expostas ao Mn.

Em pH ácido, segundo Shavrukov e Hirai (2016),o excesso de prótons no externo ambiente pode ser prejudicial, destruir a função de células normais. As plantas são organismos sésseis e, portanto, não podem se mover para escapar do estresse à acidez. Os solos com pH menor que 5,0-5,5 na camada de superfície são classificados como solos ácidos e são conhecidos para limitar o crescimento de plantas, como foi observado neste trabalho em plantas não associadas à fungos micorrízicos. O aumento na eficiência micorrízica na dose de 1mM de Fe em pH 3,0 deveu-se, provavelmente, ao aumento da tolerância das plantas proporcionado pela presença do FM.

A capacidade de fungos micorrízicos para suportar o estresse induzido por metais tóxicos em seu ambiente pode ser conectada com a sua habilidade em imobilizar, sequestrar e compartimentalizar metais. Esses mecanismos de tolerância incluem adsorção pela parede celular, precipitação na matriz extracelular, e processos intracelulares de quelação por metalotioneínas ou sequestro por

fitoquelatinas dentro dos vacúolos (Gadd 1993; Hall 2002; Bolchi *et al.* 2011). Para fungos micorrízicos, propriedades de ligação parece ser um fator muito importante na melhoria dos efeitos de toxicidade de metais na simbiose. A maioria dos estudos tem indicado que o micélio extramatrical de fungos micorrízicos fornece os principais sítios de ligação para os metais tóxicos a tais componentes como a quitina, a melanina (Colpaert & Van Asche 1992; Fomina *et al.* 2005). Um recente estudo de Lermen *et al*. (2015), provou que fungos micorrízicos associados à *Cymbopogon citratus* reduziu em cerca de 50% o teor de chumbo (Pb) nas raízes do hospedeiro em relação à plantas não micorrizadas. Além disso, o teor de P e N na parte aérea aumentaram significativamente com a associação micorrízica, mesmo sob níveis elevados de Pb.

Este é o primeiro estudo a avaliar a tolerância de fungos ectomicorrízicos ao MSPFe e o uso de micorrizas arbusculares na tolerância de plantas de aroeira ao Fe, provando seu potencial na micorremediação. Estes resultados são uma importante contribuição para um modelo de tolerância de fungos micorrízicos ao Fe.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *P. albus* se mostrou mais tolerante ao aumento das doses de MSPFe, com estímulo no crescimento em relação ao controle, apesar de ter uma menor biomassa quando comparado à espécie *P. tinctorius*. O teor dos macro e micronutrientes são influenciados pelo incremento do MSPFe, como por exemplo o Zn, que em ambos os fungos, diminuiu seu teor na presença de Fe.

As plantas de aroeira micorrizadas apresentaram maior crescimento, peso seco da raiz e parte aérea. Plantas sem a associação apresentaram alterações nos parâmetros de crescimento e sintomas de toxidez tanto em pH 3,0 quanto em pH 5,5. A colonização micorrízica foi afetada na maior dose de Fe, principalmente em pH 3,0. A eficiência micorrízica foi elevada em todos as doses de Fe e pH 3,0 e 5,5.

Diante do que foi exposto no trabalho, pode-se concluir que os fungos micorrízicos são tolerantes a contaminação por Fe tanto em meio de cultura quando na solução do solo aumentando a tolerância da planta hospedeira ao metal. Sendo assim, as espécies de fungos ectomicorrízicos *Pisolithus*, principalmente, *P. albus* e o FMA *C. etunicatus* podem ser uma boa alternativa em programas de recuperação de ambientes contaminados com Fe.

Poucas são as informações na literatura sobre os efeitos do excesso de Fe em espécies tropicais e do efeito da associação micorrízica na tolerância de plantas ao Fe. Dessa forma, o estudo da absorção, acúmulo e efeitos da toxicidade do Fe poderá contribuir para avaliação da sobrevivência de plantas nativas em ambientes submetidos ao impacto ambiental causado por emissões de poluentes tóxicos, como gases tóxicos e óxidos de Fe.

7. REFERÊNCIAS

Adeleke RA, Cloete TE, Bertrand A, Khasa DP (2012) Iron ore weathering potentials of ectomycorrhizal plants. Mycorrhiza 22:535-544.

Adriaensen K, Lelie D van der, Laere AV, Vangronsveld J, Colpaert JV (2003) A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. New Phytologist 161:549-555.

Ahonem-Jonnarth U, Van Hees PAW, Lundström US, Finlay RD (2000) Organic acids produced by mycorrhizal Pinus sylvestris exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. New Phytologist 146:557-567.

Araki R, Murata J, Murata Y (2011) A novel barley yellow stripe 1-like transporter (HvYSL2) localized to the root endodermis transports metal-phytosiderophore complexes. Plant and Cell Physiology 52:1931–1940.

Araújo T, Freitas-Silva L, Santana B, Kuki K, Pereira E, Azevedo A, Silva L (2014) Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species. Environmental Science & Pollution 21(4):2777-2784.

Arrivabene HP, Souza IC, Có WLO, Conti MM, Wunderlin DA, Milanez CRD (2015) Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. Chemosphere 127:27-34.

Bai J, Lin X, Yin R, Zhang H, Junhua W, Xueming C, Yongming L (2008) The influence of arbuscular mycorrhizal fungi on As and P uptake by maize (*Zea mays* L.) from As-contaminate soils. Applied Soil Ecology 38:137-145.

Bao L, Ma K, Zhang S, Lin L, Qu L (2015) Urban dust load impact on gas-exchange parameters and growth of Sophora japonica L. seedlings. Plant Soil Environmental 7:309-315.

Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I (1998). Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress : toxicity and antioxidant protection 201(1):137-147.

Bellion M, Courbot MC, Jacob C, Blaudez D, Chalot M (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 254:173-181.

Beniwal RS, Langenfeld-Heyser R, Polle A (2010) Ectomycorrhiza and hydrogel protect hybrid poplar from water deficit and unravel plastic responses of xylem anatomy. Environmental and Experimental Botany 69:189-197.

Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert JV, Ahonen-Jonnarth U, Finlay R, Botton B, Chalot M (2000) Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. Mycology Research, London 104:1366-1371.

Briat J, Curie C, Gaymard F (2007) Iron utilization and metabolism in plants. Current Opinion in Plant Biology 10:276-282.

Brown MT, Wilkins DA (1985) Zinc tolerance of mycorrhizal Betula. New Phytologist 99:101–106.

Bolchi A, Ruotolo R, Marchini G, Vurro E, Toppi LS, Kohler A, Tisserant E, Martin F, Ottonello S (2011) Genome-wide inventory of metal homeostasis-related gene products including a functional phytochelatin synthase in the hypogeous mycorrhizal fungus Tuber melanosporum. Fungal Genetics and Biology 48:573-584.

Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature Comm 1:48.

Canton GC, Bertolazi AA, Cogo AJD, Eutrópio FJ, Melo J, Souza SBS, Krohling CA, Campostrini E, Silva AG, Façanha AR, Sepúlveda N, Cuz C, Ramos AC (2016) Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus Pisolithus tinctorius and in association with Eucalyptus grandis. Mycorrhiza 1-13.

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,

Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212:475-486.

Clemens S, Aarts M, Thomine S, Verbruggen N (2013) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. Trends Plant Science 18:92-99.

Cobbett C (2003) Heavy metals and plants - model systems and hyperaccumulators. New Phytologist 159(2):289-293.

Colangelo EP, Guerinot ML (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. Current Opinion in Plant Biology 9:322–330.

Colpaert JV, Van Assche JA (1987) Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. Functional Ecology 1:415-421.

Colpaert, JV, Van assche JA (1992) Zinc toxicity in ectomycorrhizal Pinus sylvestris. Plant and Soil, 143(2): 201-211.

Colpaert JV, Wevers JHL, Krznaric E, Adriaensen K (2011) How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. Annals of Forest Science 68:17-24.

Crane S, Dighton J, Barkay T (2010) Growth responses to and accumulation of mercury by ectomycorrhizal fungi. Fungal Biology 114:873-880.

Cunningham SD, Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. Plant Physiology 110:715-719.

Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares AJ, Pejuelo E (2010) ‘In situ’ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using Lupinus luteus inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. Journal Hazardous Materials 177:323-330.

De Luca NG, Wood PM (2000) Iron uptake by fungi: contrated mechanisms with internal or external reduction. Advances in Microbial Physiology 43:39-73.

Earhart CF (2009) Iron Metabolism. Encyclopedia of Microbiology. 3º ed. Academic Press, pp 210-218.

Entry J, Rygiewicz PT, Watrud LS, Donnelly PK (2002) Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. Advances in Environmental Research 7:123-138.

Fomina MA, Alexander IJ, Colpaert JV, Gadd GM (2005) Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. Soil Biology & Biochemistry 37:851-866.

Fogarty RV, Tobin JM (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. Enzyme and Microbial Technology 19:311-317.

Gadd GM (1993) Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist 124:25-60.

Gadd GM, De Rome L (1988) Biosorption of cooper by fungal melanin. Applead Microbiology Biotechnology, Cambridge 29:610-617.

Gafur A, Schutzendubel A, Langenfeld-Heyser R, Fritz E, Polle A (2004) Compatible and incompetent *Paxillus involutus* isolates for ectomycorrhiza formation in vitro with poplar (*Populus* × *canescens*) differ in H_2O_2 production. Plant Biology 6:91-99.

Galli U, Schüepp H, Brunold C (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. Physiologia Plantarum 92:364-368.

Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transaction of the British Mycological Society 46:235-244.

Giovannetti M, Mosse B (1980) Na evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist. 84:489-500.

Godbold DL, Jentschke G, Winter S, Marschner P (1998) Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. Chemosphere 36(4):757-762.

Gomes MP, Garcia QS (2013) Reactive oxygen species and seed germination. Biologia 68:351-357.

Gomes MP, Carvalho M, Carvalho GS, Garcia QS, Guilherme LRG, Soares AM (2013) Phosphorus improves arsenic phytoremediation by Anadenanthera peregrina by alleviating induced oxidative stress. Int. J. Phytorem 15:633-646.

González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution 130:317–323.

González-Chavéz MDC, Ortega-Larrocea MDP, Carrilo-González R, López-Meyer M, Xoconostle-Cázares B, Gomez SK, Harrison MJ, Figueroa-López AM, Maldonado-Mendoza IE (2011) Arsenate induces the expression of fungal genes involved in As transport in arbuscular mycorrhiza. Fungal Biology 115:1197-1209.

González-Guerrero M, Azcón-Aguilar C, Mooney M, Valderas A, MacDiarmid CW, Eide DJ, Ferrol N (2005) Characterization of a Glomus intraradices gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. Fungal Genetics and Biology 42:130-140.

González-Guerrero M, Melville LH, Ferrol N, Azcón-Aguilar C, Peterson RL (2008) Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices. Canadian Journal of Microbiology 54:103-110.

Grantz DA, Garnerb JHB, Johnson DW (2003) Ecological effects of particulate matter. Environment International 29:213–239.

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.

Harms H, Schlosser D, Wick LY (2011) Untapped potential exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nature 9:177-192.

Hartley J, Cairney JWG, Meharg AA (1997) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment. Plant and Soil, 189:303-319.

Hell R, Stephan UW (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. Planta 216:541-551.

Hendry GAF, Brocklebank KJ (1985) Iron-induced oxygen radical metabolism in waterlogged plants. New Phytology 101:199-206.

Henson JM, Butler MJ, Day AW (1999) The dark side of the mycelium - melanins of phytopatogenic fungi. Annuals Reviews of Phytopatology 37:447-471.

Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H (1999) The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. Journal Plant Physiology 154:709-717.

Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. Phytochemistry 68:139-146.

Ilbert M, Bonnefoy V (2013) Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1827(2):161-175.

Ishimaru Y, Masuda H, Suzuki M, Bashir K, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2007) Overexpression of the OsZIP4 zinc transporter confers disarrangement of zinc distribution in rice plants. Journal of Experimental Botany 58:2909–2915.

Ismail Y, Hijri M (2012) Arbuscular mycorrhisation with Glomus irregulare induces expression of potato PR homologues genes in response to infection by Fusarium sambucinum. Functional Plant Biology 39:236-245.

Jeong J, Guerinot ML (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. Trends in Plant Science 14:280-285

Jin Z, Li J, Li Y (2015) Interactive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and copper stress on flowering phenology and reproduction of elsholtzia splendens. Plos one 10(12):1-10.

Johnson DB, Kanao T, Hedrich S (2012) Redox transformations of iron at extremely low pH: fundamental and applied aspects. Frontiers in Microbiology 3:1-13.

Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. Plant Soil 205:25–44.

Jones MD, Hutchinson TC (1986) The effect of mycorrhizal infection on the response of Betula papyrifera to nickel and copper. New Phytologist 102:429-442.

Jourand P, Ducousso M, Reid R, Majorel C, Richert C, Riss J, Lebrun M (2010) Nickel-tolerant ectomycorrhizal Pisolithus albus ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant Eucalyptus globulus at toxic nickel concentrations. Tree Physiology 30:1311–1319.

Jourand P, Hannibal L, Majorel C, Mengant S, Ducousso M, Lebrun M (2014) Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globules* grown in ultramafic topsoil enhanges plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. Journal of Plant Physiology 171:164-172.

Kim SA, Guerinot ML (20070 Mining iron: Iron uptake and transport in plants, FEBS Letters 581:2273-2280.

Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. Chemosphere 41:197-207.

Kobayashi T, Nishizawa NK (2012) Iron uptake translocation, and regulation in higher plants. Annual Review Plant Biology 63:131-152.

Kornitzer D (2009) Fungal mechanisms for host iron acquisition. Current Opinion in Microbiology 12:377–383.

Kosman DJ (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. Molecular Microbiology 47:1185-1197.

Kosman DJ (2013) Iron metabolism in aerobes: managing ferric iron hydrolysis and ferrous iron autoxidation. Coordination Chemistry Reviews 257:210-217.

Krämer U (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils.Current Opinion in Biotechnology 16:133-141.

Kuki KN, Oliva MA, Pereira EG, Costa AC, Cambraia J (2008) Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Radii and *Sophora tomentosa* L. Science of Total Environment 403:207-214.

Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, Breemen N van (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. Trends in Ecology & Evolution 16:248-254.

Lanfranco L, Bolchi A, Ros EC, Ottonello S, Bonfante P (2002) Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. Plant Physiology 130:58-67.

Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat JF (2009) Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. Plant Soil 321:513-535.

Lermen C, Mohr FBM, Alberton O (2015) Growth of *Cymbopogon citratus* inoculated with mycorrhizal fungi under different levels of lead. Scientia Horticulturae 186:239-246.

Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7 139–153.

Liang CC, Li T, Xiao YP, Liu MJ, Zhang HB, Zhao ZW (2009) Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on maize grown in multi-metal contaminated soils. International Journal of Phytoremediation 11:692–703.

Liu DH, Wang FY, Zhou WL, Yang YJ (2012) Heavy metal pollution in street dusts from different functional zones of Luoyang City and its potential ecological risk. Environmental Science 33:253–259.

Luo ZB, Janz D, Jiang XN, Gobel C, Wildhagen H, Tan YP, Rennenberg H, Feussner I, Polle A (2009a) Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: Insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. Plant Physiology 151:1902-1917.

Luo ZB, Li K, Jiang X, Polle A (2009b) Ectomycorrhizal fungus (Paxillus involutus) and hydrogels affect performance of Populus euphratica exposed to drought stress. Annals of Forest Science 66: 106.

Luo ZB, Wu C, Zhang C, Li H, Lipka U, Polle A (2014) The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. Environmental and Experimental Botany 108:47-62.

Luu YS, Ramsay JA (2003) Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19:215-225.

Ma Y, He J, Ma CF, Luo J, Li H, Liu TX, Polle A, Peng CH, Luo ZB (2014) Ectomycorrhizas with *Paxillus involutus* enhance cadmium uptake and tolerance in *Populus* × *canescens*. Plant Cell Environmental 37(3):627-642.

Malcová R, Gryndler M, Vosátka M (2002) Magnesium ions alleviate the negative effect of manganese on Glomus claroideum BEG23. Mycorrhiza 12:125–129.

Marschner P, Crowley D, Rengel Z (2011) Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis - model and research methods. Soil Biology and Biochemistry 43:883-894.

Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59(2):153-163.

Marx DH (1977) Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Canadian Journal of Microbiology 23:217–223.

Mohiuddin K, Strezov V, Nelson PT, Stelcer E, Evans T (2014) Mass and element distribuitions of atmospheric particles nearby blast furnace and electric arc furnace operated industrial areas in Australia. Science of the Total Environmental 487:323-334.

Morselt AFW, Smits WTM, Limonard T (1986) Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil 96(3):417-420.

Mulholland DS, Poitrasson F, Shirokova LS, González AG, Pokrovsky OS, Boaventura GR, Vieira LC (2015) Iron isotope fractionation during Fe(II) and Fe(III) adsorption on cyanobacteria. Chemical Geology 400:24-33.

Murphy RJ, Levy JF (1983) Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. Transactions of the British Mycological Society 81:165-168.

Neilands JB (1995) Siderophores – structure and function of microbial iron transport compounds. Journal of Biological Chemistry 270:26723-26726.

Neves NR, Oliva MA, Centeno DC, Costa AC, Ribas RF, Pereira EG (2009) Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. Science of The Total Environment 407:3740-3745.

Niemeyer JC, Nogueira MA, Carvalho GM, Cohin-De-Pinho SJ, Outeiro US, Rodrigues GG, da Silva, EM, Sousa JP (2012) Functional and structural parameters to assess the ecological status of a metal contaminated area in the tropics. Ecotox. Environ. Safe 86:188-197.

Nogueira MA, Nehls U, Hampp R, Poralla K, Cardoso EJBN (2007) Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. Plant Soil 298:273-284.

Ott T, Fritz E, Polle A, Schützendübel A (2002) Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete Paxillus involutus (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium. FEMS Microbiology Ecology 42(3):359-366.

Ouziad F, Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H (2005) Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. Journal of Plant Physiology 162:634–649.

Pantopoulos K, Hentze MW (2000) Nitric oxide, oxygen radicals and iron metabolism. Section II- Principles of Biology. Academic press, pp. 293-313.

Pauwels M, Willems G, Roosens N, Frerot H, Saumitou-Laprade P (2008) Merging methods in molecular and ecological genetics to study the adaptation of plants to anthropogenic metal-polluted sites: implications for phytoremediation. Molecular Ecology 17:108-119.

Pena R, Polle A (2014) Attributing functions to ectomycorrhizal fungal identities in assemblages for nitrogen acquisition under stress. The ISME Journal 8:321-330.

Peters JB (2005) Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison, W.I.

Phieler R, Voit A, Kothe E (2013) Microbially supported phytoremediation of heavy metal contaminated soils: strategies and applications. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 141:211-235.

Prusty BAK, Mishra PC, Azeez PA (2005) Dust accumulation and leaf pigment content in vegetation near the national high way at Sambalpur, Orissa, India. Ecotoxicology and Enviromental Safety 60:228-235.

Rabie GH (2005) Contribuition of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. African Journal of Biotechnology 4(4):332-345.

Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. Biotechnology Advances 30:1562-1574.

Rauser WE (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.

Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F (2009) Ferritins control interaction between iorn homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. The Plant Journal 57:400-412.

Ray P, Adholeya A (2009) Correlation between organic acid exudation and metal uptake by ectomycorrhizal fungi grown on pond ash in vitro. Biometals 22:275-281.

Ray P, Tiwari R, Gangi Reddy U, Adholeya A (2005) Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi in vitro. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21:309–315.

Renshaw JC,Robson GD, Trinci APJ, Wiebe MG, Livens FR, Collison D, Taylor RJ (2002) Fungal siderophores: structures, functions and applications. Mycological Research 106:1123-1142.

Revathi S, Venugopal S (2013) Physiological and biochemical mechanisms of heavy metal tolerance. International Journal of Environmental Sciences 3:1339-1354.

Ricachenevsky FK, Sperotto RA (2014) There and back again, or always there? The evolution of rice combined strategy for Fe uptake. Frontiers in Plant Science 5:1-5.

Rocha DI, Silva LC, Pereira EG, Sant´Anna-Santos BF, Gontijo ER, Oliva MA (2014) Early detection of injuries in leaves of *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae) caused by particulate deposition of iron. Revista Árvore, 38(3):423-432.

Rodrigues C, Rodrigues BF (2015) Use of arbuscular mycorrhiza and organic amendments to enhance growth of *Macaranga peltata* (Roxb.) Müll. Arg. in iron ore mine Wastelands. International Journal of Phytoremediation 17: 485-492.

Sazanova K, Osmolovskaya N, Schiparev S, Yakkonen K, Kuchaeva L, Vlasov D (2015) Organic acids induce tolerance to zinc and copper exposed fungi under various growth conditions. Current Microbiology 70:520-527.

Shavrukov Y, Hirai Y (2016) Good and bad prótons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. Journal of Experimental Botany 67(1):15-30.

Silva RF, Lupatini ZIAM, Trindade LL, Silva AS (2010) Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) inoculada com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. Ciência Florestal, Santa Maria 20(1):147-156.

Smith SE, Christophersen HM, Pope S, Smith FA (2010) Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. Plant and Soil 327:1-21.

Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, New York.

Sousa NR, Ramos MA, Marques APGC, Castro ML (2012) The effect of ectomycorrhizal fungi forming symbiosis with *Pinus pinaster* seedlings exposed to cadmium. Science of the Total Environmental 414:63-67.

Souza LAB, Filho GNS, Oliveira VL (2004) Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39(4):349-355.

St-Arnaud M, Vujanovic V (2007) Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In: Hamel C, Plenchette C, editors. Mycorrhizae in crop production. Binghampton, NY: Haworth Press, pp. 67–122.

Targhetta BL, Oliveira VL, Rossi MJ (2013) Tolerância de fungos ectomicorrízicos e plantas associadas a níveis tóxicos de metais. Revista Árvore 37(5):825-833.

Van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. New Phytologist, 150(1): 203-213.

Wang GM, Stribley DP, Tinker PB, Walker C (1993) Effects of pH on arbuscular mycorrhiza I. Field observations on the long-term liming experiments at Rothamsted and Woburn 124:465-472.

Weishuang Z, Yingheng F, Yi H (2009) Soluble protein and acid phosphatase exuded by ectomycorrhizal fungi and seedlings in response to excessive Cu and Cd. Journal of Environmental Sciences 21:1667-1672.

Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J (1995) Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy-metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. Mycorrhiza 5:245-251.

Wong MH, Chan KC, Choy CK (1978) The effect of the iron ore tailing on the costal environment of Tolo harbor, Hong Kong. Environmental Reaserch, 15:342-356.

Zhang L, Wang MX, Li H, Yuan L, Huang JG, Penfold C (2014) Mobilization of inorganic phosphorus from soils by ectomycorrhizal fungi. Pedosphere 24(5):683-689.