

CLÁUDIA ELIZABETE LIMA LINS

**EFEITO DO COBRE SOBRE FUNGOS MICORRÍZICOS
E TREVO VERMELHO (*Trifolium pratense* L.)**

RECIFE

JUNHO/2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

EFEITO DO COBRE SOBRE FUNGOS MICORRÍZICOS
E TREVO VERMELHO (*Trifolium pratense* L.)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração:
Micologia Aplicada

Orientadora

Dra. Leonor Costa Maia (UFPE)

Co-orientadora

Dra. Zaida Inês Antonioli (UFSM)

RECIFE

JUNHO/2006

Lins, Cláudia Elizabete de Lima

Efeito do cobre sobre fungos micorrízicos e trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) / Cláudia Elizabete de Lima Lins. – Recife : O Autor, 2006.

125 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Micologia – Fungos micorrízicos. 2. Micorrizas e metais pesados – Crescimento dos organismos – Efeito do cobre. 3. Áreas degradadas por mineração (cobre) – Fungos micorrízicos arbusculares – Identificação e glomalina. 4. Simbiose micorrízica – *Trifolium pratense* L. (trevo vermelho) – *Glomus etunicatum* – Nutrição vegetal – Influência do cobre. 5. Fungos ectomicorrízicos – Crescimento e atividade enzimática. I. Título.

582.28
579.53

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-438

Efeito do cobre sobre fungos micorrízicos e trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)

Cláudia Elizabete de Lima Lins

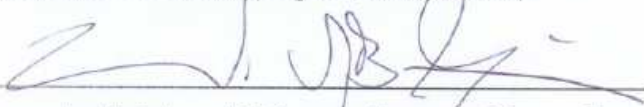
Comissão examinadora

Membros titulares



Dra. Leonor Costa Maia (Depto. Micologia, UFPE)

Zaida Inês Antonioli (Depto. Solos, UFSM)



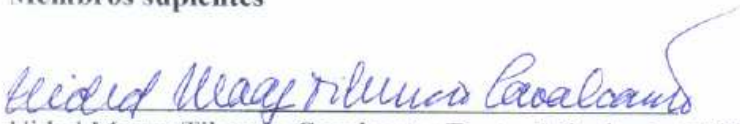
Everardo Valadares Sá Barreto Sampaio (Depto. Energia Nuclear, UFPE)



Ana Lúcia Figueiredo Porto (Depto. Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE)

Gladstone Alves da Silva (CEFET-PI)

Membros suplentes



Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (Depto. Micologia, UFPE)

Sônia Valéria Pereira (Instituto Tecnológico de Pernambuco)

“Quando você se lança numa jornada
e o fim parece cada vez mais distante,
então você percebe que o verdadeiro fim é o percurso”.

Emile Durkheim

Ao meu filho Arthur, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e consciência.

Aos meus pais pela base familiar, amor, dedicação e imenso apoio que me foi dado diante dos obstáculos enfrentados e das conquistas alcançadas.

A Ronaldo pela paciência e compreensão de sempre.

Ao meu filho Arthur pela força, graça e alegria de viver.

À Dolores pela paciência e dedicação em cuidar do meu filho na minha ausência.

À Dra. Leonor Costa Maia pela confiança, compreensão e orientação desde o início da minha caminhada entre as micorrizas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Dra. Zaida Inês Antonioli por me receber de braços abertos junto à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), me incentivando, apoiando, orientando e dando oportunidades para o meu crescimento profissional.

Ao Dr. Cosme Rafael Martínez Salinas por toda amizade, dedicação, incentivo e colaboração na conclusão deste trabalho.

À Dra. Vetúria Lopes de Oliveira pelos valiosos ensinamentos na área das Ectomicorrizas.

À Dra. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante e ao Dr. Everardo Valadares Sá Barreto Sampaio por toda atenção, amizade e aprendizado.

À Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto e ao Dr. José Luiz de Lima Filho por disponibilizar o Laboratório de Biotecnologia para análise das enzimas, bem como pelas sugestões.

À Dra. Maria Taciana Soares, Marília Sales e Rômulo Campos pelo apoio e contribuição na finalização deste trabalho.

À Ana Paula Pretto e Janete Baumgardt pela amizade, dedicação e por acreditarem no meu trabalho.

Aos colegas da UFSM Stefen Pujol, Lineu Leal, Ricardo Steffen, Robson Andreazza, Andréa Hentz, Eduardo Lorensi, Tatiana Benedetti, Marcos Strochein e Antônio Bassaco, que muito me apoiaram e que estiveram comigo durante minha passagem pelo Rio Grande do Sul.

Ao Dr. Fábio Barbosa pela disponibilidade e ajuda na análise de glomalina.

Ao colega Bruno Tomio pela contribuição na identificação das espécies de FMA contidas neste trabalho.

A Katiúcia Silva, Marilene Paiva e Moacir Alcântara pela ajuda dispensada na execução dos experimentos e pelos bons momentos que passamos durante essa caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Micorrizas pelo convívio e troca de conhecimentos.

Aos amigos Sueli Soares, Gladstone Silva e Bartolomeu Santos pela sincera amizade de tantos anos.

Às amigas da Pós-Graduação, Daniela Gomes, Priscila Albuquerque, Silvia Loureiro e Ana Paula Duarte pelo companheirismo e pelos grandes momentos de alegria e descontração.

A todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO GERAL	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO GERAL	XVI
CAPÍTULO 1 - Revisão de Literatura	19
1. Áreas degradadas	20
2. Áreas degradadas por metais pesados	20
3. Micorrizas	23
3.1. Micorriza arbuscular	23
3.2. Ectomicorriza	26
4. Micorrizas e metais pesados	29
5. Toxicidade de metais pesados em leguminosas micorrizadas	32
6. Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO 2 - Fungos Micorrízicos Arbusculares em Área de Mineração de Cobre no Sul do Brasil	51
Resumo	53
Abstract	54
Introdução	55
Material e Métodos	56
Resultados e Discussão	61
Referências Bibliográficas	66

	Pág.
CAPÍTULO 3 – Efeito do Cobre no Crescimento e na Micorrização de	
<i>Trifolium pratense</i> L.	72
Resumo	74
Introdução	75
Material e Métodos	76
Resultados e Discussão	78
Referências Bibliográficas	95
CAPÍTULO 4 Efeito do cobre e da adição de fosfato sobre <i>Pisolithus</i>	
<i>microcarpus</i>, <i>Chondrogaster angustisporus</i> e <i>Suillus</i> sp. (Basidiomycota)	99
Resumo	101
Introdução	102
Material e Métodos	103
Resultados e Discussão	105
Referências Bibliográficas	118
CONCLUSÕES GERAIS	122
ANEXOS	125

LISTAS DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo II	
Figura 1. Aspecto geral das três áreas de estudo nas Minas de Camaquã, Caçapava do Sul: a) rejeito, b) margem e c) cultivo de eucaliptos.....	58
Capítulo III	
Figura 1. Aspecto geral de plantas de <i>Trifolium pratense</i> cultivadas em níveis crescentes de cobre e de fósforo, 40 dias após inoculação com <i>Glomus etunicatum</i> (UFPE 06).....	80
Figura 2. Efeito do cobre e fósforo na matéria seca da parte aérea e raiz (A) e na colonização micorrízica (B) de plantas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) cultivadas e recebendo solução nutritiva por 40 dias após a inoculação com <i>Glomus etunicatum</i>	83
Figura 3. Efeito do cobre e fósforo na produção de esporos (A) e na relação nº de esporos g matéria seca raiz (B) de plantas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>), cultivadas e recebendo solução nutritiva por 40 dias após a inoculação com <i>Glomus etunicatum</i>	84
Figura 4. Efeito do cobre na relação das matérias secas da parte aérea e das raízes de <i>Trifolium pratense</i> cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia.....	86
Figura 5. Efeito do cobre e sua interação com o fósforo na produção de matéria seca da parte aérea e acúmulo de K na raiz (A), de P na raiz e Fe na parte aérea (B), e de Cu na parte aérea e raiz (C) em <i>Trifolium pratense</i> cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia.....	93

Figura 6. Efeito do cobre e da inoculação com <i>Glomus etunicatum</i> no acúmulo de P na parte aérea e raiz (A), de K na raiz e na relação parte aérea/raiz (B) e de Fé na parte aérea e na relação parte aérea/raiz (C) de <i>Trifolium pratense</i> cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia.....	94
--	----

Capítulo IV

Figura 1. Dinâmica de crescimento (aumento do diâmetro) das colônias de <i>Suillus</i> sp. cultivado em meio MNM, suplementado com cobre e fósforo.....	107
Figura 2. Efeito do cobre e sua interação com o fosfato na produção de matéria seca, diâmetro da colônia (30 d), velocidade de crescimento da colônia (cm d^{-1}) e no pH do meio MNM de cultura dos fungos ectomicorrízicos (<i>Pisolithus microcarpus</i> , <i>Chondrogaster angustisporus</i> e <i>Suillus</i> sp.).....	107
Figura 3. Aspecto geral da colônia de <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC – Pt 116) crescida em meio Melin-Norkrans Modificado (MNM) (Marx, 1969) com formação de halo translúcido aos 20 dias de cultivo, nos tratamentos com níveis 1967 μM Cu e 1,9 mM P.....	109
Figura 4. Efeito do cobre e sua interação com os fungos ectomicorrízicos (<i>Pisolithus microcarpus</i> , <i>Chondrogaster angustisporus</i> e <i>Suillus</i> sp.) no diâmetro da colônia (30 d) e no pH do meio MNM de cultura.....	110
Figura 5. Efeito dos fungos ectomicorrízicos (<i>Pisolithus microcarpus</i> , <i>Chondrogaster angustisporus</i> e <i>Suillus</i> sp.) e sua interação com a área do meio da cultura no pH do meio MNM.....	112

Figura 6. Relação entre a velocidade de crescimento das colônias e a produção de matéria seca micelial de <i>Suillus</i> sp. e <i>Pisolithus microcarpus</i> cultivados em meio sólido MNM com níveis crescentes de Cu (31 a 492 μ M) e de fosfato (0,1 a 1,9 mM).....	113
Figura 7. Efeito do fosfato na atividade das fosfatases ácida (A) e alcalina (B) na fração intracelular e extracelular da cultura de <i>Suillus</i> sp., aos 40 dias de cultivo.....	116

LISTA DE TABELAS

Capítulo II	Pág.
Tabela 1. Características químicas dos substratos solo (0-20 cm) das áreas rejeito, margem e cultivo de eucaliptos, das minas de Camaquã, Município de Caçapava do Sul, RS.....	57
Tabela 2. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares, número mais provável (NMP) de propágulos infectivos, número de esporos e conteúdo de glomalina facilmente extraível produzida no solo (0-20 cm), em áreas das minas de cobre de Camaquã, Caçapava do Sul, RS.....	62
Capítulo III	
Tabela 1. Efeito do fósforo na matéria seca, altura e comprimento da raiz de plantas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>), 40 dias após inoculação com <i>Glomus etunicatum</i> (UFPE 06).....	79
Tabela 2. Efeito dos níveis de cobre no rendimento da matéria seca, na altura, no comprimento da raiz e na densidade específica em raízes de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>), 40 dias após a inoculação com <i>Glomus etunicatum</i> (UFPE 06).....	81
Tabela 3. Efeito do fósforo no acúmulo de P e K na parte aérea de <i>Trifolium pratense</i> cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia.....	86

Tabela 4. Efeito da inoculação com <i>Glomus etunicatum</i> na produção de matéria seca da parte aérea, no acúmulo de Fe e Cu na raiz e na relação da parte aérea/raiz na quantidade de Cu de <i>Trifolium pratense</i> , cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia.....	87
---	----

Tabela 5. Efeito do fósforo e da inoculação com <i>Glomus etunicatum</i> na produção de matéria seca das raízes e na relação parte aérea/raiz, no acúmulo de P (raiz e na relação parte aérea/raiz), K (relação parte aérea/raiz) e Cu (parte aérea) de plantas de <i>Trifolium pratense</i> cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia.....	89
--	----

Capítulo IV

Tabela 1. Taxa de crescimento da colônia e produção de matéria seca micelial de fungos ectomicorrízicos (FEM) cultivados (30 dias) em meio Melin-Norkrans Modificado (MNM).....	106
---	-----

Tabela 2. Efeito do fosfato no crescimento micelial de <i>Suillus</i> sp. e pH do meio MNM, aos 40 dias de cultivo.....	114
---	-----

Tabela 3. Efeito do cobre na produção de massa micelial, no pH do meio MNM de cultura e na atividade das fosfatases ácida e alcalina de <i>Suillus</i> sp. aos 40 dias de cultivo.....	114
--	-----

RESUMO GERAL – Foram avaliados os efeitos do cobre sobre fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e ectomicorrízicos (FEM) e sobre a simbiose entre FMA e plantas de trevo. Diversidade de espécies, densidade de esporos, número mais provável (NMP) de propágulos e produção de glomalina por FMA foram estimados em área de mineração de cobre (rejeito, margem e reflorestada com eucaliptos) em Camaquã, RS. A simbiose trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) com o FMA *Glomus etunicatum* Becker & Gerd. foi observada em areia recebendo solução nutritiva. Os FEM *Pisolithus microcarpus* UFSC–Pt116, *Chondrogaster angustisporus* UFSC–Ch163 e *Suillus* sp. UFSC–Su168 foram cultivados em meio acrescido de Cu (31 a 7869 μ M) e dois níveis de P (0,1 e 1,9 mM). A atividade de fosfatases produzidas por *Suillus* sp. em meio com adição de Cu e de P foi igualmente estimada. Este fungo foi mais tolerante que os demais FEM em meio com concentração 123 μ M Cu. A adição de P diminuiu significativamente a toxicidade do Cu sobre os FEM. O crescimento micelial, em meio líquido, foi fortemente inibido pelo fósforo (1,9 mM) e pelo Cu (123 μ M). No entanto, houve aumento de 50% na atividade de fosfatases produzidas por *Suillus* sp. Para este fungo, as concentrações de Cu inibitórias de 50% do crescimento (CI_{50}) foram 40 e 160 μ M Cu, respectivamente em meios sólido e líquido. Doze táxons de FMA foram identificados nas áreas estudadas. *Glomus* foi o gênero mais comum e *Paraglomus brasilianum* (Spain & Miranda) Morton & Redecker a única espécie encontrada nas três áreas. Menor diversidade de FMA ocorreu na área de interface entre a bacia de rejeito e a reflorestada. Maior número de esporos, NMP de propágulos e produção de glomalina foram registrados na área reflorestada. Efeito deletério do Cu foi observado nas plantas de trevo mantidas em substrato com 1967 μ M de Cu. A micorrização, traduzida pela colonização radicular, foi inibida em substrato com 123 μ M Cu; porém, neste mesmo nível, a adição de fosfato diminuiu a toxicidade do metal. No tratamento inoculado com *G. etunicatum* e com 1,9 mM P a toxicidade do Cu sobre o crescimento e acúmulo de nutrientes (P, K, Cu e Fe) nas plantas de trevo também diminuiu. Os resultados indicam que a inoculação com FMA e a adição de fosfato podem aumentar a tolerância do hospedeiro a níveis elevados de Cu no substrato. Nesse contexto, a aplicação conjunta de fungos micorrízicos e P podem constituir uma prática favorável no reflorestamento de áreas de mineração.

Palavras-chave: ectomicorriza, metais pesados, micorriza arbuscular, mineração, toxicidade.

ABSTRACT –The effects of copper on arbuscular mycorrhizal (AMF) and ectomycorrhizal fungi (EMF) and on the symbiosis between AMF and plants of *Trifolium pratense* L were evaluated. Species diversity, most probable number (MPN) of propagules and production of glomalin by AMF were estimated in a copper mining area (a- waste product area; b- interface between the waste product area and a cultivated area; c- cultivated with *Eucalyptus*) in Camaquã, State of Rio Grande do Sul. The symbiosis of *Trifolium pratense* L with the AMF *Glomus etunicatum* Becker & Gerd. was observed in sand irrigated with nutrient solution. The EMF *Pisolithus microcarpus* UFSC–Pt116, *Chondrogaster angustisporus* UFSC–Ch163 and *Suillus* sp. UFSC–Su168 were cultivated in Melin Norkrans modified medium (MNM) with Cu (31 to 7869 μ M) and two levels of P (0,1 and 1,9 mM). The phosphatase activity of *Suillus* sp. in medium with Cu and P was also estimated. This fungus was more tolerant than the other EMF in medium with concentration 123 μ M Cu. The supplement of P decreased significantly the toxicity of Cu over the EMF. Mycelial growth in liquid medium was strongly inhibited by phosphorus (1.9 mM) and Cu (123 μ M). However, there was an increase of 50% on the activity of phosphatases produced by *Suillus* sp. For this fungus, concentrations of 40 and 160 μ M of Cu inhibit 50% of growth (CI₅₀), respectively in solid and liquid media. Twelve taxa of AMF were identified in the studied areas. *Glomus* was the most common genus and *Paraglomus brasilianum* (Spain & Miranda) Morton & Redecker the only species found in the three areas. Lower diversity of AMF occurred in the interface between the two other areas (waste product and cultivated). Higher number of spores, MPN of propagules and production of glomalin were registered in the area with *Eucalyptus*. Deleterious effect of copper was observed in plants maintained in substrate with 1967 μ M de Cu. The mycorrhization, evaluated by root colonization, was inhibited in substrate with 123 μ M Cu; however, in this same level, the addition of phosphate decreased the toxicity of the metal. In the treatment with *G. etunicatum* and 1,9 mM P, the toxicity of Cu on growth and nutrient accumulation (P, K, Cu e Fe) of *Trifolium* plants also decreased. Inoculation with AMF and supplementation of phosphate can increase the host tolerance to high levels of Cu in the substrate. Thus, application of both, mycorrhizal fungi and phosphate may constitute a useful practice on reforestation of mining areas.

Key words: arbuscular mycorrhiza, ectomycorrhiza, heavy metals, mining, toxicity.

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação dos solos por metais pesados, causada por processos naturais ou por atividade humana, constitui um dos mais sérios problemas ambientais (Galli *et al.*, 1994). Em áreas de mineração, o impacto causado pela extração de minério pode resultar em conseqüências danosas para uma área de influência muito além da lavra (Dias & Griffith, 1998) pois, além da retirada da vegetação natural, há intensa movimentação de solo, o que gera em alguns casos considerável quantidade de rejeito, contribuindo para o distúrbio da área (Dias *et al.*, 1995).

As Minas de Camaquã, localizadas no município de Caçapava do Sul, RS, constituíam a principal jazida de cobre conhecida no sul do Brasil, tendo sido exploradas até a década de 1980 (Teixeira & Gonzalez, 1988). Hoje, o ambiente encontra-se erodido e com considerável quantidade de rejeito, o que prejudica a estrutura e a atividade biológica do solo.

Entre os metais pesados que podem estar presentes no ambiente em condição de toxicidade, o cobre é um dos mais potencialmente tóxicos (Camargo *et al.*, 2001) para a maioria dos organismos, e constitui fator limitante no crescimento de plantas (Turnau *et al.*, 2001). Porém, íons de fosfato podem interferir na solubilidade dos elementos metálicos, formando precipitados pouco solúveis e diminuindo a concentração de íons em solução (Camargo *et al.*, 2001) e a disponibilidade do metal para as plantas (Shetty *et al.*, 1995).

Dependendo da severidade do impacto ambiental causado pelo metal, o distúrbio pode prejudicar também a microbiota do solo, que participa do fluxo de energia e da ciclagem dos elementos do solo, podendo alterar fortemente a sua disponibilidade dentro de um ecossistema (Hungria & Urquiaga, 1992). Dentre os microrganismos, os fungos micorrízicos destacam-se por interagir com as espécies vegetais, formando uma associação simbiótica mutualista que, propiciando maior absorção de nutrientes e proteção das raízes, contribui para o desenvolvimento das plantas (Perotto & Bonfante, 1997; Pfleger *et al.*, 1994). Além disso,

estes fungos conferem às plantas maior tolerância aos metais pesados, indicando a possibilidade da sua utilização em processos de fitorremediação de solos poluídos através do acúmulo destes elementos (Khan, 2001; Leyval *et al.*, 1997; Scheloske *et al.*, 2001).

Embora a capacidade dos fungos micorrízicos em reduzir a toxicidade dos íons de metais para a planta hospedeira seja comprovada, pouco se sabe sobre as interações envolvidas nos diferentes mecanismos de sobrevivência e tolerância destes organismos. O conhecimento desses fatores e o estudo da relação fungo-planta-ambiente são de fundamental importância para programas de micorrização controlada em reflorestamentos, visando o aumento da produtividade (Garbaye, 1984; Alves *et al.*, 2001). Este aumento pode ser viabilizado pela utilização de fungos micorrízicos eficientes previamente selecionados na formação de mudas florestais.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: (I) determinar a ocorrência e atividade de FMA em área impactada por mineração de cobre em Caçapava do Sul, RS; (II) avaliar o efeito de FMA sobre o crescimento e o acúmulo de nutrientes em plantas de trevo (*Trifolium pratense* L) em condições de excesso de cobre e diferentes níveis de fósforo e; (III) verificar os efeitos do cobre e da adição de fósforo no crescimento micelial e nas atividades das fosfatases ácida e alcalina de fungos ectomicorrízicos.

Capítulo 1

Revisão de literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1. Áreas degradadas

Áreas degradadas são tipicamente caracterizadas por solos pobres, erodidos, com instabilidade hidrológica, produtividade reduzida, pouca diversidade biológica e transformações físicas e químicas. A caracterização de uma área degradada está associada à qualidade do solo, que ao sofrer alterações entra em processo de degradação (Dias & Griffith, 1998). De acordo com o Manual de Recuperação de Áreas Degradadas pela Mineração (Ibama, 1990) “a degradação de uma área ocorre quando a vegetação nativa e a fauna forem destruídas, removidas ou expulsas; a camada fértil do solo for perdida, removida ou enterrada; e a qualidade e regime de vazão do sistema hídrico for alterado. A degradação ambiental ocorre quando há perda de adaptação às características físicas, químicas e biológicas e é inviabilizado o desenvolvimento sócio-econômico”.

A degradação do solo traz como conseqüências a perda da biodiversidade, da fertilidade e a interferência nos recursos hídricos (Balensiefer, 1997). O processo de recuperação de áreas degradadas requer conhecimentos referentes a: tipo de degradação, características físicas e químicas do solo, composição florística original e comunidade microbiológica do solo. Como o crescimento de plantas nessas áreas é bastante lento devido às condições edáficas e existe competição por água e nutrientes, são necessários pelo menos cinco a seis anos para que o ambiente seja recuperado (Sharma *et al.*, 1997).

2. Áreas degradadas por metais pesados

Um dos pontos mais críticos da degradação de áreas é a remoção dos horizontes superficiais do solo, por causa dos problemas que causa na estrutura e na atividade biológica do solo (Dias *et al.*, 1995). No Brasil, os principais fatores de degradação do solo são o desmatamento e as atividades agrícolas. No entanto, o impacto causado por atividades de

mineração pode resultar em consequências danosas para uma área de influência que extrapola a de lavra (Dias & Griffith, 1998) pois, além da retirada da vegetação natural há intensa movimentação de solo, o que gera, em alguns casos, considerável quantidade de rejeito que contribui para o distúrbio da área (Dias *et al.*, 1995).

Mais de 75% dos elementos químicos são conhecidos como metais e alguns participam como nutrientes essenciais ao metabolismo dos organismos vivos; porém, quando em excesso, podem causar toxicidade aos mesmos (Nogueira, 1996). O termo metais pesados é utilizado para identificar um grande grupo de elementos com densidade maior que 6 g cm^{-3} . A toxidez de um metal no solo depende de fatores físico-químicos e biológicos, que regulam e disponibilizam a concentração deste elemento em solução (Siqueira *et al.*, 1999a).

Entre os elementos que podem estar presentes no ambiente em condição de toxicidade, os mais potencialmente tóxicos às plantas são o cobre, o níquel e o cobalto (Camargo *et al.*, 2001). O cobre é considerado elemento essencial, mas pode ser tóxico à maioria das células vivas quando em concentrações elevadas no solo ($> 0,8 \text{ mg dm}^{-3}$) (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994; Abreu *et al.*, 2001). O teor total de cobre na crosta terrestre é estimado, em média, em 70 mg kg^{-1} , porém, varia de acordo com o material de origem: nas rochas ígneas, de 10 a 100 mg kg^{-1} , respectivamente para granito e basalto e nas rochas sedimentares oscila entre 3, 4 e 45 mg kg^{-1} para arenito, calcário e folhelho, respectivamente (Barber, 1995). O cobre ocorre no solo quase que exclusivamente na forma divalente e a concentração na solução geralmente é governada pela adsorção às partículas do solo (Abreu *et al.*, 2001).

O cobre interage com outros nutrientes tais como potássio, zinco, nitrogênio e fósforo, o que altera a sua disponibilidade. Dentre essas interações, a com fósforo é uma das mais importantes (Abreu *et al.*, 2001). Íons de fosfato podem interferir na solubilidade dos elementos metálicos, formando precipitados pouco solúveis e diminuindo a concentração de íons em solução (Camargo *et al.*, 2001). O cobre está mais fortemente ligado à matéria

orgânica do que outros cátions micronutrientes (Zn^{2+} , Mn^{2+}) (Mengel & Kirkby, 1987) e de acordo com Lindsay (1972), o nível de cobre na solução do solo é reduzido com o aumento do pH devido à forte adsorção deste elemento. Este metal é fortemente ligado aos espaços livres nas raízes, razão pela qual maiores quantidades de cobre são encontradas nas raízes, quando comparado a outros tecidos das plantas (Mengel & Kirkby, 1987). De acordo com Malavolta (1997), o cobre tende a acumular-se nas raízes e, devido a este fato, a toxidez manifesta-se primeiramente nas raízes, que escurecem e perdem elementos previamente absorvidos, indicando o possível comprometimento da permeabilidade das membranas. Durante estágios iniciais do desenvolvimento da planta, a toxicidade do cobre afeta o crescimento e causa redução na ramificação, engrossamento e coloração anormal das raízes de diversas plantas (Gupta, 2001). A clorose em folhas mais jovens é também outro tipo de sintoma provocado pela interferência deste metal, quando em excesso, na síntese de clorofila (Römheld, 2001).

Elevadas concentrações de metais pesados no solo são fitotóxicas (Vivas et al, 2005), podendo ocasionar o desaparecimento completo da vegetação e dificultar a instalação de novas plantas. Além disso, ausência da cobertura vegetal facilita o processo de erosão e conseqüentemente a dispersão de partículas contaminadas por metais pesados (Vangronsveld *et al.*, 1996), prejudicando também a microbiota do solo. Esta última, participa do fluxo de energia e na ciclagem dos elementos do solo, podendo alterar fortemente a sua disponibilidade dentro de um ecossistema (Hungria & Urquiaga, 1992).

A reabilitação de áreas degradadas por mineração pode ser difícil e lenta e envolve o desenvolvimento de tecnologias apropriadas. Entre estas, a fitorremediação utiliza plantas adaptadas a solos com excesso de metais para filtrar ou absorver esses elementos (Chandhmy *et al.*, 1998). Segundo Khan (2001), esta tecnologia vem ganhando popularidade no processo de descontaminação, devido à ação menos destrutiva para a biota do solo, mas tem como fator limitante a pequena quantidade de plantas adaptadas para crescer em solos contaminados e

pobres em nutrientes. Contudo, a utilização de organismos simbiontes pode auxiliar o processo de fitorremediação como no caso dos fungos micorrízicos.

3. Micorrizas

A microbiota do solo atua na decomposição da matéria orgânica e liberação de nutrientes, na formação e estabilização de agregados e na ciclagem de nutrientes. Dentre os microrganismos, os simbiontes destacam-se por interagir diretamente com as plantas, participando dos processos de absorção de nutrientes, relações hídricas, crescimento e reprodução (Pfleger *et al.*, 1994; Gaiad, 1996).

A maioria das espécies de plantas terrestres forma associações simbióticas com certos fungos do solo, conhecidas como micorrizas. Nesta associação biotrófica mutualística (Perotto & Bonfante, 1997), a planta hospedeira recebe nutrientes minerais trazidos pelo micélio fúngico, enquanto este recebe carboidratos produzidos pela planta (Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

As micorrizas podem ser divididas em três grupos, de acordo com as características morfológicas e anatômicas (Silveira, 1992; Legaz *et al.*, 1995): as ectomicorrizas; as endomicorrizas, que se subdividem em Ericóides, Orquidóides e Arbusculares; e as ectendomicorrizas subdivididas em Monotropóide e Arbutóide. As micorrizas arbusculares (MA) e as ectomicorrizas (ECM) são as mais estudadas por estarem associadas à maioria das plantas vasculares e/ou de maior interesse econômico, diferentemente das ectendomicorrizas, que são de ocorrência limitada (Peterson & Farquhar, 1994).

3.1. Micorriza arbuscular

A associação micorrízica do tipo arbuscular, caracterizada pela formação de arbúsculos no córtex da raiz hospedeira, é provavelmente a simbiose mais difundida e

predominante nos ecossistemas terrestres (Allen, 1996). Estima-se que ocorra em mais de 95% das famílias de plantas (Legaz *et al.*, 1995), desde briófitas e pteridófitas a gimnospermas e angiospermas (Smith & Read, 1997).

Com base sobretudo em características moleculares e por constituírem um grupo monofilético, Schüßler *et al.* (2001) consideraram que os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam um “filo” por eles denominado Glomeromycota, ficando portanto separado dos Zygomycota, onde até então eram incluídos (Morton & Redecker, 2001). O novo filo está constituído por quatro ordens: Archaesporales, Paraglomerales, Diversisporales e Glomerales (Schüßler *et al.*, 2001).

Os propágulos micorrízicos incluem esporos, fragmentos de raízes (contendo hifas e vesículas) e hifas do solo (Abbott *et al.*, 1992; Bellgard, 1992). As hifas têm papel fundamental na formação, funcionamento e perpetuação das micorrizas em ecossistemas naturais e impactados. Na ausência de raízes ativas, os esporos servem como propágulos duradouros, responsáveis pela colonização de novas raízes, constituindo aspecto importante da ecologia de FMA no solo (Jasper *et al.*, 1993).

A colonização micorrízica se dá a partir do contato da hifa, que pode ser originada de uma rede de hifas, ou de outros tipos de propágulos, com a raiz (Abbott *et al.*, 1992). Após adesão, é formado um apressório que penetra na epiderme da raiz, ramifica-se e estende-se inter e intracelularmente constituindo o micélio que forma arbúsculos - estruturas efêmeras responsáveis pela troca de nutrientes com o hospedeiro e, dependendo do gênero, forma também vesículas - estruturas de parede fina que podem variar de forma e possivelmente acumulam as reservas do fungo (Smith & Read, 1997; Parniske, 2000).

Em áreas impactadas, o restabelecimento natural da micorriza envolve a sobrevivência de resíduos de propágulos fúngicos, a dispersão destes de uma área adjacente não impactada ou de áreas próximas que contenham resíduos fúngicos, e microlocais disponíveis que

permitam a sobrevivência de plantas e fungos (Allen *et al.*, 1992; Snyder & Allen, 2004). Por outro lado, a inoculação com FMA nativos ou introduzidos em área impactada pode facilitar a formação da micorriza, em menor período de tempo. Entretanto, a aplicação de inóculo não garante a formação de uma micorriza funcional (Snyder & Allen, 2004). Estudos envolvendo tipo de inóculo, hospedeiro e grau de impactação do solo se fazem necessários para melhor utilização das micorrizas.

Os FMA não apresentam especificidade de hospedeiro. Em princípio, qualquer espécie de planta pode ser colonizada por qualquer espécie de FMA, mas o potencial de infectividade e de efetividade difere com a combinação fungo-planta. Embora um FMA possa colonizar muitas plantas, o fungo “preferirá” o hospedeiro que exiba o máximo de resposta simbiótica (Bagyaraj, 1991). Segundo Siqueira (1991), existe um alto grau de compatibilidade funcional que resulta no estabelecimento da simbiose entre fungo e planta, controlado pelo genoma dos dois organismos e modulado pelo ambiente. Declerck *et al.* (1995) concordam que, apesar da falta de especificidade absoluta da simbiose micorrízica, a eficiência está sob controle genético, sendo influenciada pela planta e espécie fúngica, assim como pelas condições ambientais.

Este tipo de associação pode aumentar a área de superfície de absorção das raízes; melhorar a absorção de íons de baixa mobilidade no solo, particularmente o P e os micronutrientes (Zhu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005); contribuir para a ciclagem de nutrientes (Azcón-Aguilar & Barea, 1997); aumentar a tolerância da planta a estresses bióticos, como a presença de patógenos de raízes (Abdala & Abdel-Fattah, 2000), e abióticos, como seca e salinidade (Kaya *et al.*, 2003); melhorar a qualidade do solo (Caravaca *et al.*, 2005); e aumentar a diversidade vegetal (Klauber-Filho *et al.*, 2002). A habilidade da planta em absorver nutrientes com baixa mobilidade no solo está correlacionada positivamente com a

área de superfície das raízes (Azcón-Aguilar & Barea, 1997), que aumenta com a associação micorrízica e supre a planta hospedeira com fósforo e outros nutrientes (Stougaard, 2001).

Dentre os benefícios promovidos pela associação micorrízica arbuscular, a produção de glomalina, uma glicoproteína hidrofóbica, produzida pelas hifas externas dos FMA e que pode ser encontrada também na parede dos esporos (Wright *et al.*, 1996) está envolvida nos processos de agregação do solo, sendo considerada um bioindicador da abundância de produção de micélio extracelular no solo (Steinberg & Rillig, 2003; Treseder *et al.*, 2004). Existem diferentes frações de glomalina, todas relacionadas com a estabilidade dos agregados do solo. A glomalina facilmente extraível (GFE) representa depósitos recentes protegidos da degradação, enquanto a glomalina total (GT) pode representar a menor porção da matéria orgânica extremamente persistente no solo. Essa relação indica que a GFE pode ser usada como uma medida simples para avaliar relações entre a estabilidade de agregados e práticas agronômicas (Wright e Upadhyaya, 1998; Rillig *et al.*, 2001).

3.2. Ectomicorriza

Ao contrário das micorrizas arbusculares, as ectomicorrizas apresentam especificidade com relação ao hospedeiro, alterações na morfologia das raízes e penetração das hifas apenas nos espaços intercelulares do córtex radicular, formando uma extensa rede de hifas conhecida como rede de Hartig. Por fora da raiz forma-se um manto de hifas que protege as raízes e promove o intercâmbio entre a planta e o solo. Os fungos que formam esse tipo de associação pertencem aos filos Basidiomycota, Ascomycota e Zigomycota (Legaz *et al.*, 1995). Estima-se que existam mais de 6.000 espécies fúngicas que formam ectomicorrizas, a maioria pertencente a Basidiomycota (Smith & Read, 1997). No Brasil, os Basidiomycota micorrízicos colonizam com frequência espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*, sendo as espécies dos

gêneros *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon*, *Amanita*, *Lactarius*, *Russula*, *Thelephora* e *Ramaria* as mais comuns (Moreira & Siqueira, 2002).

As ectomicorrizas ocorrem em um grupo restrito de plantas (cerca de 5%), na maioria espécies arbóreas de Betulaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, Fagaceae, Jugladiaceae, Leguminosae, Myrtaceae, Pinaceae, Salicaceae e Tiliaceae (Garbaye, 1990). Porém, as coníferas e os eucaliptos são as plantas hospedeiras mais susceptíveis a esse tipo de micorrização, sendo também consideradas importantes economicamente, principalmente para o setor florestal, onde cerca de 90% das árvores das florestas das regiões de clima temperado dependem da associação para atingirem desenvolvimento adequado nos viveiros e sobreviverem em local definitivo (Bellei & Carvalho, 1992). Estudos de seleção que permitam identificar os fungos simbiontes compatíveis para determinada espécie vegetal e condições locais são necessários no intuito de melhorar a sobrevivência, a tolerância aos estresses e, por consequência, a produtividade das plantações.

Assim como as arbusculares, as ectomicorrizas favorecem o aumento da absorção, da translocação e da utilização de nutrientes e água, resultantes da maior exploração do solo, através das hifas que se estendem a distâncias de mais de 25 cm das raízes. Além disso, protegem a planta contra patógenos de raízes e propiciam maior tolerância a estresses abióticos (Smith & Read, 1997; Moreira & Siqueira, 2002).

Cerca de 95% do P total em solos de florestas é encontrado na forma orgânica, contribuindo em grande parte na nutrição fosfática das plantas, principalmente em áreas com baixo conteúdo de P inorgânico disponível na solução do solo. Para ser utilizado pelas plantas, entretanto, o P orgânico precisa ser transformado na forma inorgânica por fosfatases, que podem ser de origem vegetal ou microbiana (Firsching & Claassen, 1996). Os fungos ectomicorrízicos (FEM) são capazes de produzir uma variedade de ácidos orgânicos, que atuam sobre formas insolúveis de fosfatos inorgânicos e fosfatases que participam da

mineralização de P orgânico (Tam & Griffiths, 1993). As atividades enzimáticas das raízes ectomicorrízicas e a capacidade dos FEM em degradar P orgânico (Smith & Read, 1997) têm papel importante na mobilização e transferência de nutrientes do solo, via FEM, para a planta hospedeira (Pritsch *et al.*, 2004).

Os fungos micorrízicos (FMA e FEM) têm sido inoculados na produção de diversos tipos de mudas, devido à sua capacidade em aumentar a área de absorção de nutrientes, promovendo maior desenvolvimento das plantas. Algumas espécies de plantas, como o eucalipto, têm a capacidade de formar mais de um tipo de micorriza. Estudos recentes têm sido realizados com o propósito de conhecer os FMA presentes em áreas com *Eucalyptus* (Gomes & Trufem, 1998; Oliveira *et al.*, 1997) e a susceptibilidade das raízes em aceitar o estabelecimento da associação (Araújo *et al.*, 2004). Santos *et al.* (2001) observaram que raízes de eucalipto apresentavam inicialmente colonização do tipo arbuscular, seguida de colonização ectomicorrízica. Estas interações podem ser benéficas no estágio inicial de desenvolvimento da planta, promovendo aumento do crescimento e o estabelecimento das mesmas nos estágios subseqüentes.

Níveis elevados de nutrientes, especialmente de P e de N, podem inibir a formação de micorrizas, resultando em mudas que apresentam limitações quando transplantadas para o campo (Mikola, 1989). As mudas de espécies florestais comercialmente produzidas no Brasil ainda utilizam altos teores de fertilizantes químicos, em detrimento da adoção de novas técnicas biotecnológicas, como a micorrização controlada (Costa *et al.*, 2002), que podem contribuir para a redução do uso desses insumos. De la Cruz *et al.* (1990) conseguiram reduzir a quantidade de fertilizantes inorgânicos, a campo, em até 85%, quando inocularam plantas de eucalipto com *Pisolithus tinctorius* e *Scleroderma cepa*.

O conhecimento dos fatores envolvidos e o estudo da relação fungo-planta-ambiente são de fundamental importância para programas de micorrização controlada em

reflorestamentos, visando o aumento da produtividade (Garbaye, 1984; Alves *et al.*, 2001), que pode ser viabilizada pela utilização de fungos micorrízicos eficientes, previamente selecionados na formação de mudas florestais.

4. Micorrizas e metais pesados

A contaminação dos solos por metais pesados, causada por processos naturais ou por atividade humana, constitui um dos mais sérios problemas ambientais (Galli *et al.*, 1994). Em elevadas concentrações, os metais são tóxicos para a maioria dos organismos (Giller *et al.*, 1998; Vivas *et al.*, 2005) e constituem fator limitante no crescimento de plantas (Turnau *et al.*, 2001). Assim, podem ocasionar o desaparecimento completo da vegetação e dificultar a instalação de novas plantas (Vangronsveld *et al.*, 1996) e fungos (Grazziotti *et al.*, 2001), reduzindo inclusive os propágulos micorrízicos (Cuenca *et al.*, 1997; Enkhtuya *et al.*, 2000). A diminuição da população de FMA gera problemas para o estabelecimento e sobrevivência das plantas (Pfleger *et al.*, 1994), limitando o sucesso da recuperação da vegetação nativa (van der Heijden *et al.*, 1998) e facilitando o processo de erosão.

Os FMA são de ocorrência generalizada em ecossistemas terrestres, incluindo solos contaminados por metais pesados (Smith & Read, 1997) e são considerados essenciais para a sobrevivência e crescimento das plantas (Khan 2005). De acordo com Vivas *et al.* (2005), os microrganismos podem ser cruciais na sobrevivência das plantas, em solos contaminados, e a tolerância aos metais, mostrada pelas plantas micorrizadas, é baseada em uma série de mecanismos e efeitos simbióticos, bem como na capacidade de ligação do micélio fúngico à rizosfera ou às raízes.

De acordo com González-Chávez *et al.* (2004), os FMA parecem ser eficientes em adsorver diferentes metais pesados encontrados em solos poluídos, especialmente Cu, Pb e Cd, não apenas pelas raízes colonizadas, mas também pelas hifas e através da deposição de

glomalina no solo, que por seqüestrar e acumular metais em uma forma não tóxica, pode ajudar a aumentar a saúde das plantas e a qualidade do solo em áreas poluídas. Isto reforça o uso de FMA no estabelecimento de plantas em áreas degradadas e na manutenção da estrutura do solo, reduzindo os riscos de erosão e desertificação, enfatizando a importância da simbiose micorrízica como um determinante da sustentabilidade de um ecossistema (Caravaca *et al.*, 2005).

Dentre os possíveis mecanismos pelos quais os FMA aumentam a resistência das plantas aos metais pesados, está a capacidade destes fungos em imobilizar os metais através da precipitação intracelular de cátions com fosfato ou pela adsorção de íons dos metais na parede das hifas (Bi *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2005). A aplicação de FMA para auxiliar na disponibilidade de metais do solo para as plantas requer, entre outros, conhecimentos sobre os processos fisiológicos e da simbiose, sobre a disponibilidade química (a intensidade da exposição tóxica) e a capacidade do solo em suprir o metal (Peijenenburg *et al.*, 2000; Malcová *et al.*, 2003).

Considerando que os FMA podem diminuir os efeitos adversos da fitotoxidez induzida pelo excesso de metais pesados no solo, estende-se a sua importância ecológica e biotecnológica na reabilitação de áreas poluídas por tais elementos (Rao & Tarafdar, 1998; Siqueira *et al.*, 1999a, b).

Os FEM têm papel fundamental no aumento da absorção de nutrientes de muitas espécies vegetais (Hartley *et al.*, 1997b), incluindo importantes espécies arbóreas utilizadas em programas de reflorestamento que dependem da simbiose ectomicorrízica para crescer e sobreviver (Rossi *et al.*, 2002), especialmente em solos contaminados por atividade de mineração (Ramam *et al.*, 2002). A potencialidade das ectomicorrizas expostas ao excesso de metais pesados é determinada a partir de mecanismos como: excreção de substâncias quelantes, reduzindo a exposição aos metais; imobilização extracelular pela mucilagem e

alterações no pH; modificação no sistema de absorção na plasmalema e detoxificação intracelular. Estes mecanismos apresentam respostas variadas em função do tipo, concentração, localização do metal, e dos fungos e plantas envolvidos (Moreira & Siqueira, 2002).

A capacidade dos FEM em reduzir a toxicidade dos íons de metais para a planta hospedeira (Kong *et al.*, 2000; Hartley *et al.*, 1997b) está associada à diminuição nas concentrações do metal na parte aérea da planta (Wilkins, 1991; Van Tichelen *et al.*, 1999), devido ao aumento na absorção destes nutrientes pelas raízes e o seu acúmulo no micélio extraradical, conferindo ao hospedeiro maior tolerância a estes elementos (Aggangan *et al.*, 1998; Graziotti *et al.*, 2001).

Os FEM podem variar quanto à capacidade de tolerância ambiental, sendo necessário avaliar o impacto dos metais sobre estes organismos (Graziotti *et al.*, 2001). Pesquisas têm sido conduzidas para determinar a sensibilidade dos FEM a uma variedade de metais potencialmente tóxicos, na busca do entendimento dos diversos mecanismos pelos quais estes fungos podem tolerar os metais pesados (Hartley *et al.*, 1997a; Wilkins, 1991). Entretanto, ainda há pouca informação sobre a resposta fisiológica e bioquímica dos FEM aos metais tóxicos (Fan-Xiang, 1995; Pritsch *et al.*, 2004). Em experimento que avaliou a toxicidade do Cr, Raman *et al.* (2002) verificaram que *Laccaria laccata* produziu maior quantidade de matéria seca micelial do que *Suillus bovinus*. Fan-Xiang (1995) avaliou a influência de várias concentrações de Cu (0 a 400 μ M) sobre o crescimento micelial de *Amanita muscaria* em meio líquido MNM e constatou que o fungo foi altamente inibido no tratamento com o maior nível de cobre. Estes dados revelam que a eficiência dos FEM depende dos isolados testados, dos metais pesados e das condições experimentais de crescimento (Van Tichelen *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 1994).

5. Toxicidade de metais pesados em leguminosas micorrizadas

A escolha adequada de espécies utilizadas em processos de revegetação é muito importante, dada à necessidade de rápida adaptação aos fatores limitantes de crescimento da planta, encontrados nos solos degradados (Pralon & Martins, 2001). Devido à grande diversidade de espécies com características de crescimento em condições edafoclimáticas nem sempre favoráveis, e com capacidade de enriquecer o solo, as leguminosas tornam-se ideais para a recuperação de áreas degradadas (Dias *et al.*, 1995; Souza & Silva, 1996; Pralon & Martins, 2001).

O trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) é uma leguminosa forrageira de ciclo bianual ou perene de curta duração, com crescimento ereto que alcança 80 cm de altura. A raiz é pivotante e profunda, podendo atingir até 2 metros; solos mais profundos, argilo-arenosos, com alto teor de matéria orgânica, são os mais indicados. O pH ideal fica na faixa de 6 a 7 e o clima temperado-frio é o requerido pela cultura, bastante utilizada na produção de feno e para o pastejo direto, com até quatro toneladas por hectare. Trata-se de uma espécie de extrema importância para o Estado do Rio Grande do Sul, devido à alta produtividade e elevado valor nutritivo (Moraes, 1995; Ball *et al.*, 1996). No entanto, assim como as demais espécies de inverno, o trevo não possui bom desempenho em condições subtropicais, podendo ficar comprometido em função dos verões secos e quentes (Flores *et al.*, 2004).

O P tem destaque no estudo do desenvolvimento de leguminosas devido ao importante papel que desempenha (Marschner, 1994). Bailey & Laidlaw (1998) obtiveram, em casa de vegetação, incremento de produção de matéria seca de trevo branco (*Trifolium repens* L.) com a aplicação de P (120 mg planta⁻¹), que se refletiu na ramificação, no número de folhas e na área foliar. Ao avaliar o efeito da adubação fosfatada em três leguminosas (*Trifolium resupinatum* L., *Trifolium subterraneum* L. e *Lotus subbiflorus* Lag.), Krolow *et al.* (2004)

verificaram que as plantas responderam positivamente ao aumento da adubação fosfatada, e que a dose de P que proporcionou a máxima produção de matéria seca nas leguminosas foi cerca de duas vezes a dose recomendada.

O principal efeito da micorriza arbuscular em ecossistemas naturais é o de suprir a planta hospedeira com nutrientes que estão relativamente imóveis no solo, particularmente o P e elementos traços (Smith & Read, 1997). Porém, em elevadas concentrações de metais pesados, estes fungos, através das hifas, podem ligar-se a metais nas raízes ou na rizosfera (Vivas *et al.*, 2005), reduzindo a sua translocação para a parte aérea (Enkhtuya *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2003). Estudos têm mostrado efeito positivo dos FMA em leguminosas, quanto ao aumento de matéria seca e acúmulo de P e redução da toxicidade causada pela absorção ou translocação de metais. Chen *et al.* (2003) constataram que o crescimento de *T. pratense* cultivado em níveis crescentes de Zn (0-300 mg kg⁻¹) foi significativamente influenciado pela inoculação com *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe e que as plantas apresentaram duas vezes mais P que os controles (plantas não micorrizadas). Chen *et al.* (2005) observaram que a micorrização aumentou significativamente a concentração de P na parte aérea e a biomassa de *T. repens*, sob elevadas concentrações de Pb, sugerindo alta eficiência da aquisição de P pela micorriza. De acordo com Zhu *et al.* (2001), diferentes mecanismos podem estar envolvidos nas interações entre colonização micorrízica e acúmulo de metais pesados, incluindo diluição destes elementos tóxicos no tecido, devido às interações com P, bem como o seqüestro de metais tóxicos e o desenvolvimento de tolerância na planta, induzidos pelo fungo.

Em área de caatinga afetada por atividade mineradora, em Jaguarari, Bahia, Silva *et al.* (2001) detectaram baixo potencial de infectividade dos FMA presentes, recomendando que fosse iniciada a revegetação da área utilizando inóculo de FMA ecologicamente adequado. Lins *et al.* (2006) avaliaram a influência de FMA na produção de mudas de *Leucaena*

leucocephala (Lam.) de Wit., em solos com diferentes graus de impacto causados por atividade mineradora e verificaram que a inoculação proporcionou às mudas maior tolerância ao excesso de metais pesados (tratamentos com 50% de rejeito contaminado) especialmente por cobre, e que o aumento da proporção de solo contaminado exerceu efeito negativo sobre o crescimento das mudas.

Embora seja conhecida a capacidade dos fungos micorrízicos (FMA e FEM) em reduzir a toxicidade dos íons de metais para a planta hospedeira, ainda é necessário esclarecer as interações envolvidas nos diferentes mecanismos de sobrevivência e tolerância destes organismos.

6. Referências Bibliográficas

Abbott, L K.; Robson, A. D.; Jasper, D. A.; Gazzey, C. 1992. What is the role of VA mycorrhizal hyphae in soil? Pp. 37-41. In: Read, D. J.; Lewis, D. H.; Fitter, A. H.; Alexander, I. J. (Eds.). **Mycorrhizas in Ecosystems**. 2 ed. Cambridge: University Press.

Abdala, M.E. & Abdel-Fattah, G.M. 2000. Influence of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the development of peanut pod rot disease in Egypt. **Mycorrhiza** 10:29-35.

Abreu, C.A.; Ferreira, M.E.; Borkert, J.C. 2001. Disponibilidade e avaliação de elementos catiônicos: zinco e cobre. Pp: 125-150. In: Ferreira, M.E.; Cruz, M.C.P.; van Raij, B.; Abreu, C.A. (Eds.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTATOS.

Aggangan, N.S.; Dell, B.; Malajczuk, N. 1998. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Geoderma** 84:15-27.

Allen, M.F.; Crisafulli, C.; Friesse C.F.; Jeakins, S.L. 1992. Re-formation of mycorrhizal symbioses on Mount St. Helens, 1980-1990: interactions of rodents and mycorrhizal fungi.. **Mycological Research** 96: 447-453.

Allen, M. F. 1996. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into 21st . **Mycological Research** 100: 769-782.

Alves, J.R.; Souza, O.; Podlech, P.A.S.; Giachini, A.J.; Oliveira, V.L. 2001. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36(2):307-313.

Araújo, C.V.M.; Alves. L. J.; Santos, O.M.; Alves, J.M. 2004. Micorriza arbuscular em plantações de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no litoral norte da Bahia, Brasil. **Acta Botânica Brasília** 18(3):513-520.

Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae** 68:1-24.

Bagyaraj, D. J. 1991. Use of VA mycorrhizal fungi in practical agriculture. Pp. 81-92. In: 4^a Reunião Brasileira sobre Micorrizas **Programas e Resumos**. Mendes: EMBRAPA, CNPDS/UFRJ.

Bailey, J.S. & Laidlaw, A.S. 1998. Growth and development of white clover (*Trifolium repens* L.) as influenced by P and K nutrition. **Annals of Botany** **81**: 783-786.

Ball, D.M.; Hoveland, C.S.; Lacefield, G.D. 1996. **Southern forages**. 2 ed. Geórgia: Potash and phosphate Institute. 264 p.

Balensiefer, M. 1997. Estado da Arte em Recuperação e Manejo de Áreas frágeis e/ou Degradadas. Pp. 15-18. In: **Recuperação de Áreas Degradadas III** Curso de Atualização. Curitiba/Fupecf.

Barber, S. 1995. **Soil nutrient. Bioavailability: a mechanistic approach**. 2 ed. 384 p.

Barea, J.M.; Pozo, M.J.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** **417**:1761-1778.

Bellei, M. M. & Carvalho, E. M. S. Ectomicorrizas. Pp. 297-318. In: Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. (Eds). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1992.

Bellgard, S. E. 1992. The propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi capable of initiating infection after topsoil disturbance. **Mycorrhiza** **1**:147-152.

Bi, Y.L.; Li, X.L.; Christie, P. 2003. Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. **Chemosphere** **50**:931-937.

Camargo, O.A.; Alleoni, L.R.F.; Casagrande, J.C. 2001. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. Pp: 89-177. In: Ferreira, M.E.; Cruz, M.C.P.; van Raij, B.; Abreu, C.A. (Eds.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTATOS.

Caravaca, F.; Alguacil, M.M.; Barea, J.M.; Roloán, A. 2005. Survival of inoculum and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry** **37**:227-233.

Cervantes, C. & Gutierrez Corona, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **Fems Microbiology Review** **14**(2): 121-137.

Chandhmy, T. M.; Hayes, W. J.; Khan, A. G.; Khoo, C. S. 1998. Phytoremediation – focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soils. **Australian Journal of Toxicology** **4**: 37-51.

Chen, X.; Wu, C.; Tang, J.; Hu, S. 2005. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host under a sand culture experiment. **Chemosphere** **60**:665-671.

Chen, B.D.; Li, X.L.; Tao, H.Q.; Christie, P.; Wong, M.H. 2003. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. **Chemosphere** **50**:839-846.

Costa, M.D. *et al.* 2002. Ectomicorizas: A face oculta das florestas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento** **29**:38-46.

Cuenca, G.; Andrade, Z.; Escalante, G. 1997. Diversity of glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry** **30**:711-719

Declerck, S.; Plenchette, C.; Strully, D.G. 1995. Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivar. **Plant Soil** **1**:183-187.

De La Cruz, R.E.; Lorilla, E.D.; Aggagtan, N.S. 1990. Ectomycorrhizal tablets for *Eucalyptus* species. Pp.71 In: Werner, P.; Muller, P., (eds.). **Fast growing trees and nitrogen fixing trees**. Stuttgart, Gustav Fisher Verlag.

Dias, L. E.; Franco, A. A.; Campello, E.; Faria, S. M.; Silva, E. M. 1995. Leguminosas forestales: aspectos relacionados con su nutrición y uso en la recuperación de suelos degradados. **Bosque** **16**: 121-127.

Dias, L. E. & Griffith, J.J. 1998. Conceituação e caracterização de áreas degradadas. Pp. 1-7. In: Dias, L. E. & Mello J. W. V. (Eds.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, Departamento de Solos; Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas.

Enkhtuya, B.; Rydlová, J.; Vosátka, M. 2000. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soil from degraded ecosystems and man-made habitats. **Applied Soil Ecology** **14**:201-211.

Fan-Xiang, K. 1995. Influence of copper, manganese and pH on the growth and several enzyme activities in mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Chemosphere** **30** (1): 199-207.

Firsching, B.M. & Claassen, N. 1996. Root phosphatase activity and soil organic phosphorus utilization by Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. **Soil Biology and Biochemistry** **28**: 1417-1424.

Flores, R.A.; Scheffer-Basso, S.M.; Dall'Agnol, M. 2004. Caracterização morfofisiológica de genótipos de trevo-branco (*Trifolium repens* L.). **Agrociência** **3** (1):21-28.

Gaiad, S. 1996. Micorrizas: uma ferramenta na recuperação de áreas degradadas. Pp. 1-7. In: **Recuperação de áreas degradadas**. III Curso de Atualização. Curitiba/Fupecf.

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

Garbaye, J. 1984. Competitivité des champignons ectomycorrhiziens: premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorrhization contrôlée du hêtre et du chêne rouvre dans le nord-est de la France. **Revue Forestière Française** **6**:33-43

Garbaye, J. 1990. Utilisation des mycorhizes em sylviculture. Pp.197-250. In: Strullu, D.G. (ed.). **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**. Paris: Lavoisier.

Giller, K.E.; Witter, E.; Mcgrath, S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. **Soil Biology and Biochemistry** 10:1389-1414.

Gomes, S.P. & Trufem, S.F.B. 1998. Fungos micorrízicos arbusculares (Glomales, Zygomycota) na ilha dos Eucaliptos, Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. **Acta Botanica Brasilica** 12(3) (Suplemento): 393-401,

González-Chávez, M.C.; Carrilho-González, R.; Wright, R.S.; Nicholls, K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution** 130:317-323.

Grazziotti, P.H.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.; Carvalho, D. 2001. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 25:839-848.

Gupta, U.C. 2001. Micronutrientes e elementos tóxicos em plantas e animais. Pp: 13-31. In: Ferreira, M.E.; Cruz, M.C.P.; van Raij, B.; Abreu, C.A. (Eds.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTATOS.

Hartley, J.; Cairney, J.W.G.; Meharg, A.A. 1997a. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? **Plant Soil** 189:303-319.

Hartley, J.; Cairney, J.W.G.; Sanders, F.E.; Meharg, A. A. 1997b. Toxic interactions of metal ions (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} and Sb^{3-}) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist** **137**:551-562.

Hungria, M. & Urquiaga, S. 1992. Transformações microbianas de outros elementos (Potássio, micronutrientes e metais pesados). Pp. 329-340. In: Cardoso, E. I. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

Ibama. 1990. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração**. Brasília, Ibama, 96 p.

Jasper, D. A; Abbott, L. K.; Robson, A. D. 1993. The survival of infective hyphae in dry soil: an interaction with sporulation. **New Phytologist** **124**:473-479.

Kaya, C.; Higgs, D.; Kirnak, H.; Tas, L. 2003. Mycorrhizal-colonization improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullun lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions. **Plant Soil** **253**:287-292.

Khan, A.G. 2001. Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhiza in plants growing on tannery effluent-polluted-soil. **Environment International** **26**: 417-423.

Khan, A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** **18**: 355-364.

Klauber-Filho, O.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S. 2002. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** **26**:125-134.

Kong, F.X.; Liu, Y.; Hu, W.; Shen, P.P.; Zhou, C.L.; Wang, L.S. 2000. Biochemical responses of the mycorrhizae in *Pinus massoniana* to combined effects of Al, Ca and low pH. **Chemosphere** **40**:311-318.

Krolow, R.H.; Mistura, C.; Coelho, R.W. Siewerdt, L.; Zonta, E.P. 2004. Efeito do fósforo e do potássio sobre o desenvolvimento e a nodulação de três leguminosas anuais de estação fria. **Revista Brasileira. Zootecnia** **33** (6):2224-2230.

Legaz, M. E.; Cordoba, C. V.; Xavier-Filho, L.; Grisi, B. M.; Trufem, S. F. B. 1995. **A Esperança Biotecnológica**. João Pessoa: A União. 171 p.

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.

Lindsay, W.L. 1972. Inorganic phase equilibria of micronutrients in soils, Pp. 41-57. In: Mortvedt, J.J.; Giordano, P. M.; Lindsay, W.L. (eds.) **Micronutrients in Agriculture**. Madison, Soil Science Society of America.

Lins, C.E.L.; Cavalcante, U.M.T.; Sampaio, E.V.S.B.; Messias, A.S.; Maia, L.C. 2006. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology** **31**:181-185.

Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. 1997. **Avaliação do estado nutricional das plantas princípios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 2^a ed. 139p.

Malcová, R.; Vosátka, M.; Gryndler, M. 2003. Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. **Applied Soil Ecology** **23**:55-67.

Marschner, H. & Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. In: Robson, A.D.; Abbott, L.K.; Malajczuk (eds.). **Management of in mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. 89-102. Kluwer Academic Publishers.

Mengel, K. & Kirkby, E.A. 1987. **Principles of plant nutrition**. 4^a Ed. Bern, International Potash Institute Bern. 687p.

Mikola, P. 1989. The role of ectomycorrhizae in forest nurseries. **Agriculture Ecosystems and Environment** **28**:343-450.

Moraes, Y.J.B. 1995. **Forrageiras: conceitos, formação e manejo**. Ed. Agropecuária. p. 189.

Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O. 2002. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA. 626p.

Morton, J. B. & Redecker, D. 2001. Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia** **93**(1):181-195.

Nogueira, A. V. 1996. As micorrizas e o excesso de metais. Pp. 135-174. In: Siqueira, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras-DCS/DCF.

Oliveira, V.L.; Schmidt, V.D.B.; Bellei, M.M. 1997. Patterns of arbuscular-and-ecto-mycorrhizal colonization of *Eucalyptus dunnii* in southern Brazil. **Annales des Sciences Forestieres** **54**:473-481.

Parniske, M. 2000. Intracellular accommodations of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? **Current Opinion in Plant Biology** **3**: 320-328.

Peijmamburg, W.; Baerselman, R.; De Groot, A.; Jager, T. Leenders, D.; Posthuma, L.; Van Veen, R. 2000. Quantification of metal bioavailability for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** **39**(4):420-430.

Perotto, S. & Bonfante, P. 1997. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. **Trends in Microbiology** **5**: 496-501.

Peterson, R. L. & Farquhar, M. L. 1994. Mycorrhizas – Integrated development between roots and fungi. **Mycologia** **86**(3): 311-326.

Pfleger, F.L.; Stewart, E.L.; Noyd, R.K. 1994. Role of VAM fungi in mine land revegetation. Pp. 47-82. In: Pfleger, F. L.; Linderman, R. G. (Eds.). **Mycorrhizae and Plant Health**. St. Paul: APS Press.

Pralon, A. Z.; Martins, M. A. 2001. Utilização do resíduo industrial Ferkal na produção de mudas de *Mimosa caesalpinifolia*, em estéril de extração de argila, inoculadas com fungos micorrízicas arbusculares e rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **25**:55-63.

Pritsch, K.; Raidl, S.; Marksteiner, E.; Blaschke, H.; Agerer, R.; Schlöter, M.; Hartmann. 2004. A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. **Journal of Microbiological Methods** **58**: 233-241.

Raman, N.; Srinivasan, V.; Ravi, M. 2002. Effect of Chromium on the Axenic Growth and Phosphatase Activity of Ectomycorrhizal fungi, *Laccaria laccata* and *Suillus bovinus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **68**:569-575.

Rao, A. V.; Tarafdar, J. C. 1998. Significance of micro-organisms in afforestation programmes in arid zone. **Annals of Arid Zone** **37**: 337-346.

Rillig, M.C.; Wright, S.F.; Nichols, K.A.; Schmidt, W.F.; Torn, M.S. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical Forest soils. **Plant Soil** **233** 167-177.

Römheld, V. 2001. Aspectos fisiológicos dos sintomas de deficiência e toxicidade de micronutrientes e elementos tóxicos em plantas superiores. Pp: 71-85 In: Ferreira, M.E.; Cruz, M.C.P.; van Raij, B.; Abreu, C.A. (Eds.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTATOS.

Rossi, M.J.; Souza, J.A.R.; Oliveira, V.L. 2002. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology Biotechnology** **59**:175-181.

Santos, V.L.; Muchovej, R.M.; Borges, A.C.; Neves, J.C.L.; Kasuya, M.C.M. 2001. Vesicular-arbuscular-ectomycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology** **32**: 81-86.

Scheloske, S., Maetz, M., Schüßler, A. 2001. Heavy metal uptake of *Geosiphon pyriforme*. **Nuclear Instrumental Methods Physical Research B** **181**: 659-663.

Schüßler, A.; Schwarzott, D.; Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research** **105**(12): 1413-1421.

Sharma, K. O.; Gough, L. P.; Kumar, S.; Sharma, B. K.; Saxena, S. K. 1997. Recent developments in the reclamation of surface mined lands. **Annals of Arid Zone** **36**(4):311-326.

Shetty, K.G.; Hetrick, B.A.D.; Schwab, A.P. 1995. Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. **Environmental Pollution** **88**:307-314.

Silva, G. A. Maia, L. C.; Silva, F. S. B.; Lima, P. C. F. 2001. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de áreas de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** **24**(2):135-143.

Silveira, A.P.D. 1992. **Micorrizas** Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P.(eds.) . Pp:257-282. In: Microbiologia do Solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

Siqueira, J. O. 1991. Fisiologia e bioquímica de micorrizas vesículo-arbusculares: alguns aspectos da relação fungo-planta e absorção de fósforo. Pp. 105-131. In: 4ª Reunião Brasileira Sobre Micorrizas. **Programas e resumos**. Mendes: EMBRAPA, CNPDS/ UFRRJ

Siqueira, J. O.; Pereira, M. A. M.; Simão, J. B. P.; Moreira, F. M. S. 1999a. Efeito da formononetina (7 hidroxí, 4'metoxi Isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **25**: 561-567.

Siqueira, J. O.; Pouyú, E.,; Moreira, F. M. S. 1999b. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **23**: 569-580.

Smith, S. E. & Read, D. J. 1997. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2 ed. London: Academic Press. 605 p.

Snyder, S.R. & Allen, M.F. 2004. Restoration of Mycorrhizae in Disturbed Arid Ecosystems.

Souza, F.A. & Silva, E.M.R. 1996. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. Pp. 255-290. In: Siqueira, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras-DCS/DCF.

Steinberg, P.O. & Rillig, M.C. 2003. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. **Soil Biology and Biochemistry** **35**:191-194.

Stougaard, J. 2001. Genetics and genomes of root symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology** **4**:328-335.

Tam, P.C.F. & Griffiths, D.A. 1993. Mycorrhizal associations in Hong Kong Fagaceae IV. The mobilization of organic and poorly soluble phosphates by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Micorrhiza** **2**:133-139.

Teixeira, G. & Gonzalez, M. 1988. Minas de Camaquã, Município de Caçapava do Sul, RS. Pp. 33-41. In: Schobbenhaus, R.; Coelho, C.E.S. (coord.). **Principais depósitos minerais do Brasil**. vol. 3.

Treseder, K.K.; Mack, M.C.; Cross, A. 2004. Relationships among fires, fungi and soil dynamics in Alaskan boreal forests. **Ecological Applications** **14**:1826-1838.

Turnau, K.; Przybylowicz, W.J.; Mesjasz-Przybylowicz, J. 2001. Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas – as revealed by micro-PIXE analysis. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research** **181**:649-658.

Van Der Heijden, M.A.G.; Van Der Klironomos, J.N.; Ursic, M.; Moutoglis, P.; Streitwolf-Engel, R.; Boller, T.; Wiemken, A.; Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature** **396**:69-72.

Van Tichelen, K.K.; Vanstraelen, T.; Colpaert, J.V. 1999. Nutrient uptake by intact mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings: a diagnostic tool to detect copper toxicity. **Tree Physiology** **19**:189-196.

Vangronsveld, J.; Colpaert, J.V.; Van Tichelen, K.K. 1996. Reclamation of a bare industrial area contaminated by heavy metals: physicochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental Pollution** **94**: 131-140.

Vivas, A.; Barea, J.M.; Azcón, R. 2005. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. **Environmental Pollution** **134**:257-266.

Wilkins, D.A. 1991. The influence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **35**:245-260.

Wright, S.F.; Franke-Snyder, M.; Morton, J. B.; Upadhyaya, A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. **Plant Soil** **181**:193-203.

Wright, S.F. & Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Soil** **198**:97-107.

Zhu, Y.G.; Christie, P.; Laidlaw, A.S. 2001. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal White clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere** **42**:193-199.

Capítulo 2

*Fungos Micorrízicos Arbusculares em Área de Mineração de Cobre
no Sul do Brasil*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Acta Botanica Brasilica

Fungos Micorrízicos Arbusculares em Área de Mineração de Cobre
no Sul do Brasil

Cláudia Elizabete de Lima Lins⁽¹⁾, Bruno Goto Tomio⁽¹⁾, Katiúcia Gusmão da Silva⁽¹⁾,
Cosme Rafael Martínez Salinas⁽²⁾, Zaida Inês Antonioli⁽³⁾ e Leonor Costa Maia⁽¹⁾

⁽¹⁾UFPE, Departamento de Micologia, 50670-420, Recife, PE claudia_lins@bol.com.br

⁽²⁾UFPB, Departamento de Biologia Molecular, 58.051-900, João Pessoa, PB

⁽³⁾UFSM, Departamento de Solos, 97105-900, Santa Maria, RS

Resumo - A ocorrência e a atividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foram avaliadas em áreas impactadas por mineração de cobre em Caçapava do Sul, RS. Número de esporos e número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA, conteúdo de glomalina no solo e espécies de FMA foram pesquisados nas áreas de rejeito, margem e revegetada (cultivo de eucaliptos), com níveis de Cu de 145, 13 e 8 mg L⁻¹, respectivamente. Em avaliação direta e após cultura armadilha das amostras de solo, usando painço (*Panicum milliaceum* L.) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) como hospedeiros, foram identificadas 12 espécies de FMA, representando os gêneros *Archaeospora* (1), *Glomus* (6), *Gigaspora* (1), *Paraglomus* (2) e *Scutellospora* (2). *Glomus* foi o gênero predominante e *Paraglomus brasilianum* a espécie mais representativa, sendo encontrada em todas as áreas estudadas. A área de cultivo de eucaliptos apresentou maior número de esporos e NMP de propágulos infectivos de FMA (346 esporos e 1000 propágulos infectivos por 100g solo⁻¹, respectivamente) e conteúdo de glomalina no solo (1,56 mg g solo⁻¹) enquanto que a área de margem teve menor número de propágulos infectivos (12 g solo⁻¹). Nesta área, a glomalina e esporos não foram detectados. Portanto, o excesso de cobre reduziu a densidade e a diversidade de FMA e, conseqüentemente, a atividade micorrízica.

Palavras-chave: diversidade, FMA, glomalina, Glomeromycota, metais pesados.

ABSTRACT – Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) occurrence and activity were evaluated in areas affected by copper mining at Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil. Species presence, spore number, most probable number of propagules (MPN) and glomalin content in the soil were determined in three areas: a copper mining waste area, an area cultivated with *Eucalyptus* and an area that is the interface between the two previous ones. Copper contents in the soil of the area were 145, 8 and 13 mg L⁻¹, respectively. Twelve AMF species, belonging to the genera *Glomus* (6), *Paraglomus* (2), *Scutellospora* (2), *Archaeospora* (1) and *Gigaspora* (1) were found in the soils, following direct evaluation and trap cultures, using *Panicum milliaceum* L. and *Arachis hypogea* L. as host plants. *Glomus* was the dominant genus and *Paraglomus brasilianum* the most representative species, found in all three areas. Soil from the eucalyptus area had the highest spore number (346 in 100 g soil⁻¹), MPN (1000 infective propagules in 100 g soil⁻¹) and glomalin content (1.56 mg g soil⁻¹) while that of the interface area had the lowest number of infective propagules (12 g soil⁻¹). In this area, glomalin and spores were not detected. Therefore, excess of copper reduced the density and diversity of AMF and, consequently, mycorrhizal activity.

Key-words: AMF, diversity, glomalin, Glomeromycota, heavy metals.

Introdução

As Minas de Camaquã, localizadas em Caçapava do Sul, RS, constituíam a principal jazida de cobre conhecida no sul do Brasil, tendo sido exploradas até a década de 1980 (Teixeira & Gonzalez 1988). Hoje, o ambiente encontra-se erodido e com considerável quantidade de rejeito, o que prejudica a estrutura e a atividade biológica do solo. Concentrações elevadas de metais pesados no solo são fitotóxicas, podendo ocasionar o desaparecimento completo da vegetação e dificultar a instalação de novas plantas (Vangronsveld *et al.* 1996). Dependendo da severidade do impacto ambiental, o distúrbio do solo pode prejudicar a microbiota, inclusive os propágulos micorrízicos (Cuenca *et al.* 1997; Enkhtuya *et al.* 2000), com algumas espécies sendo mais susceptíveis que outras. A ausência da população de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no solo pode gerar problemas para o estabelecimento e sobrevivência das plantas (Pfleger *et al.* 1994), limitando o sucesso da recuperação da vegetação nativa (van der Heijden *et al.* 1998) e facilitando o processo de erosão. Os FMA podem beneficiar o estabelecimento de plantas pelo aumento da resistência a estresses ambientais, maior aquisição de nutrientes e melhoria da qualidade do solo (Roldan-Fajardo 1994; Azcón-Aguilar & Barea 1997; Leyval *et al.* 1997).

A diversidade, a densidade e o potencial de infectividade dos propágulos de FMA no solo estão indiretamente relacionados com as condições ecológicas de cada ecossistema (Maia & Trufem 1990). Estudos em regiões impactadas pela extração mineral mostraram que os FMA foram reduzidos ou eliminados devido à contaminação ambiental. Em área impactada após extração de bauxita e não revegetada, no Pará, o número de esporos e de espécies de FMA foi reduzido quando comparado a áreas em processo de revegetação (Caproni *et al.* 2003). Em área com mineração de cobre, na Bahia, foi registrado baixo número de propágulos infectivos (Silva *et al.* 2001) e redução na diversidade de espécies de FMA, na maioria dos locais contaminados pelo metal (Silva *et al.* 2005).

A atividade micorrízica numa determinada área pode ser medida, entre outros parâmetros, pela quantidade produzida de glomalina (Knorr *et al.* 2003), uma glicoproteína produzida pelas hifas externas dos FMA e encontrada também na parede dos esporos (Wright *et al.* 1996). A glomalina está envolvida nos processos de agregação do solo (Steinberg & Rillig, 2003) e estudos recentes têm revelado a capacidade desta proteína em seqüestrar e acumular metais de uma forma não tóxica, através das raízes de plantas colonizadas e hifas (González-Chávez *et al.* 2004). Desse modo, contribui para o estabelecimento de plantas e manutenção da estrutura do solo, reduzindo os riscos de erosão em áreas degradadas (Caravaca *et al.* 2005).

Informações sobre a diversidade e atividade de FMA em solos do sul do país são escassas (Purin *et al.* 2006; Souza *et al.* 2002) e não há relatos sobre a ocorrência desses fungos em áreas degradadas por mineração nesta região. O conhecimento prévio da comunidade e atividade de FMA nativos e das espécies adaptadas a condições de estresse pode constituir elemento adicional para garantia do estabelecimento de plantas a serem utilizadas em processos de revegetação. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência e atividade de FMA em área impactada por mineração de cobre em Caçapava do Sul, RS.

Material e métodos

Área de estudo - As Minas de Camaquã situam-se no município de Caçapava do Sul (30° 47' S e 52° 24' W) no Rio Grande do Sul, Brasil. O minério extraído é constituído por sulfetos de cobre (calcopirita, bornita e calcosina) associados à pirita. O clima é temperado, com precipitação pluviométrica anual de 1500 mm e temperatura média de 17 °C. A vegetação na área é mata de galeria nos vales e herbáceas nas encostas e altiplanos (Teixeira & Gonzalez, 1988).

Neste estudo foram consideradas três áreas (Fig. 1): (a) rejeito: compreende a bacia depósito de rejeito das minas; (b) margem: compreende uma faixa de borda de 30 a 50 m de largura, intermediária entre a bacia depósito do rejeito e o cultivo de eucaliptos recém estabelecidos; (c) cultivo de eucaliptos: eucaliptos com 8 anos de estabelecido. Foi traçada uma linha em zig-zag e nela 10 pontos foram determinados ao acaso, sendo retiradas três amostras simples do solo das camadas superficiais (0-20 cm), totalizando dez amostras compostas, obtidas em cada área. Amostras simples do solo foram coletadas, secas ao ar, misturadas e analisadas quanto à fertilidade no Laboratório Central de Análises de Solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (Tab. 1).

Tabela 1. Características químicas dos substratos solo (0-20 cm) das áreas rejeito, margem e cultivo de eucaliptos, das minas de Camaquã, Município de Caçapava do Sul, RS

Áreas	¹ pH	² M.O.	P	K	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺
		% (p/p)	mg L ⁻¹		cmol _c L ⁻¹				mg L ⁻¹		
rejeito	7,8	0,3	69,5	94,0	0,0	4,5	0,6	145,0	4,0	367,0	0,1
margem	5,7	2,0	5,5	74,0	0,0	11,0	5,4	13,2	1,4	108,4	39,0
cultivo eucalipto	4,7	2,2	5,5	58,0	1,5	3,8	1,2	8,3	1,2	174,9	63,0

¹ Proporção substrato-solo:água (1:2,5; v/v); ² Matéria orgânica. Análises realizadas no Laboratório Central de Análises de Solo, Universidade Federal de Santa Maria, RS de acordo com a EMBRAPA (1997).

a)



b)



c)



Figura 1. Aspecto geral das três áreas de estudo nas Minas de Camaquã, Caçapava do Sul:
a) rejeito, b) margem e c) cultivo de eucaliptos.

Isolamento e Identificação de Fungos Micorrízicos Arbusculares – as amostras compostas foram utilizadas para contagem direta (CD) de esporos de FMA, e indireta (CI), a partir do preparo de culturas armadilhas (Sieverding, 1991), empregando painço (*Panicum milliaceum* L.) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) como plantas hospedeiras. As amostras foram acondicionadas em vasos (cinco/área) que foram mantidos em casa de vegetação durante dois ciclos de multiplicação (3 meses/ciclo). Após cada ciclo, esporos de FMA foram extraídos do solo pelo método de peneiramento em via úmida (Gerdemann & Nicolson, 1963), seguido de centrifugações em água e sacarose (Jenkins 1964, modificado pelo uso de sacarose 40% e centrifugação a 1.050 g por 1 min) e contagem em placa canaletada. O número de esporos em cada área foi obtido pela média dos mesmos em cada ponto de coleta. Grupos de esporos similares foram montados em lâminas com PVLG (álcool-polivinílico em lactoglicerol) ou com reagente de Melzer + PVLG (1:1) e observados ao microscópio (400×). Para identificação das espécies foram consultados Schenck & Pérez (1990), a home-page da International Culture Collection for Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM – <http://invam.caf.wvu.edu>) e publicações com descrição de novas espécies.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de propágulos infectivos - Para avaliação do NMP de propágulos de FMA foi utilizada a técnica descrita em Sieverding (1991). Amostras foram retiradas do solo resultante da mistura dos dez pontos de cada área. Parte destas amostras foi utilizada como amostras teste (350g de solo) e parte como diluente na composição dos vasos do bioensaio. Neste caso, o solo, após peneirado, foi desinfestado com Bromex® (brometo de metila 98% + cloropicrina 2%). Foi utilizado o fator quatro como base de diluição 3:1 (diluente:amostra), com cinco repetições para cada nível, totalizando 10 níveis, de 4^0 a 4^{-9} . Para cada área foram preparados 50 vasos, totalizando 150 vasos, considerando: 3 áreas × 10 níveis de diluição e 5 repetições. Cada vaso (250 mL) foi preenchido com 150 g do substrato B (solo esterilizado) + 50 g do substrato A (solo

esterilizado + solo teste) + 50 g do substrato B + 20 g de areia lavada e autoclavada. Cinco sementes de milho (*Zea mays* L.), desinfestadas com NaOCl a 5%, foram colocadas em cada vaso. Após germinação, foi realizado o desbaste mantendo-se duas plantas por vaso. Os vasos permaneceram em telado por seis semanas. A temperatura e a umidade relativa do ar foram medidas diariamente, variando de 23 - 32 °C e de 50 - 81%, respectivamente (termohigrômetro TFA, Alemanha). No final do período, as plantas foram colhidas e as raízes separadas, lavadas, diafanizadas com KOH (10%) e coradas com azul de Tripiano em lactoglicerol (Phillips & Hayman, 1970). Para avaliação do potencial de infectividade de FMA no solo, foram atribuídos os sinais (+) para presença e (-) para ausência de estruturas típicas de FMA, observadas em estereomicroscópio. Para cálculo do NMP de propágulos infectivos foi utilizada a fórmula:

$\log \bar{U} = x \log a - K$, onde: $\bar{U}$ = número de propágulos infectivos; x = total de vasos infectados / número de repetições por diluição; a = fator de diluição; K = constante encontrada na tabela VIII de Fisher & Yates (1970), determinada pelos valores de x e y , onde $y = s - x$, sendo s o número do nível de diluição.

Glomalina - Glomalina Facilmente Extraível (GFE) foi quantificada a partir das amostras de solo das áreas (Wright & Upadhyaya, 1998). Amostras de 0,25 g de agregados (fração 1-2 mm) foram autoclavadas com 2 mL de citrato de sódio (20 mM; pH 7,0) por 30 minutos, centrifugadas (11.200 g por 5 min) e o sobrenadante armazenado em geladeira (-4°C). As frações de glomalina foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro (595 nm), tendo como curva-padrão soro albumina bovina (BSA). Os dados foram expressos em mg de glomalina por g de agregados.

Análise estatística – Para análise, os números de esporos foram transformados em $\log (x + 1)$ e os dados do NMP em $\log (x)$. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade. A similaridade de espécies de FMA entre as áreas foi avaliada pelo Índice de Sørensen (Brower & Zar, 1984).

Resultados e discussão

Foram identificados 12 táxons de FMA (Tab. 2), com maior riqueza ocorrendo nas áreas de cultivo de eucalipto (8 espécies) e de rejeito (7 espécies) do que na área de margem (3 espécies). O índice de similaridade de Sørensen das espécies de FMA encontradas nas áreas foi de 54% entre cultivo de eucalipto e rejeito, 36% entre cultivo de eucalipto e margem e, 20% entre rejeito e margem. Estes resultados mostram o impacto causado pela atividade de deposição do rejeito da mineração de cobre na composição da comunidade de FMA, sobretudo ao comparar as áreas de rejeito e margem. Silva *et al.* (2005) observaram baixo índice de similaridade de espécies de FMA, considerando uma área preservada e outras circundantes, impactadas por mineração de cobre, na Bahia.

Das 12 espécies encontradas, seis pertenciam ao gênero *Glomus*. A predominância deste gênero é observada nos mais variados ecossistemas (Franke-Snyder *et al.* 2001; Ferrol *et al.* 2004; Purin *et al.* 2006). No Brasil, estudos sobre a ocorrência e diversidade de FMA mostram maior ocorrência de espécies de *Glomus* e *Acaulospora*. Em áreas de caatinga, Souza *et al.* (2003) identificaram 24 táxons de FMA, com maior representatividade de Glomaceae e Acaulosporaceae. Silva *et al.* (2005) encontraram 21 espécies de FMA, a maioria pertencente ao gênero *Glomus*, em área de caatinga nativa e com distúrbios ambientais provocados por atividade mineradora de cobre, constatando redução na diversidade de FMA nas áreas mais atingidas pelo depósito de minério. Em área de Minas Gerais, contaminada por metais pesados, principalmente Zn, Klauberg-Filho *et al.* (2002) registraram 21 espécies de FMA, com maior ocorrência de *Glomus* e *Acaulospora*. Em Santa Catarina, 38 espécies de FMA foram identificadas recentemente, em áreas com cultivo

convencional e orgânico de macieiras e, em pastagens, com a maioria das espécies distribuídas nos gêneros *Glomus* (15) e *Acaulospora* (15) (Purin *et al.* 2006). No Rio Grande do Sul, foram identificadas 10 espécies de FMA, sendo cinco de *Glomus*, em viveiros e pomares de citrus (Souza *et al.* 2002).

Tabela 2. Espécies de fungos micorrízicos arbusculares, número mais provável (NMP) de propágulos infectivos¹, número de esporos e conteúdo de glomalina facilmente extraível produzida no solo (0-20 cm), em áreas das minas de cobre de Camaquã, Caçapava do Sul, RS

FMA	Rejeito		Margem		Cultivo de eucaliptos	
	CD ²	CI ³	CD	CI	CD	CI
<i>Archaeospora trappei</i> (R.N. Ames & Linderman) J.B. Morton & D. Redecker	X					
<i>Glomus clarum</i> T.H. Nicolson & N.C. Schenck						X
<i>Glomus diaphanum</i> J.B. Morton & C. Walker	X					
<i>Glomus etunicatum</i> W.N. Becker & Gerd.		X			X	
<i>Glomus intraradices</i> Schenck & G.S.Smith				X		X
<i>Glomus mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe						X
<i>Glomus</i> sp.		X				
<i>Gigaspora margarita</i> W.N. Becker & I.R. Hall						X
<i>Paraglomus brasilianum</i> (Spain & J. Miranda) J.B. Morton & D. Redecker	X	X		X	X	X
<i>Paraglomus occultum</i> (C. Walker) J.B. Morton & D. Redecker	X					X
<i>Scutellospora heterogama</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders	X				X	X
<i>Scutellospora fulgida</i> Koske & C. Walker				X		
Total de espécies	7		3		8	
NMP (100 g solo ⁻¹)	190		12		1000	
Esporos (100 g solo ⁻¹)	18 B ⁴		ND		347 A	
Glomalina (mg g solo ⁻¹)	0,10 B		ND		1,56 A	

¹Obtido em bioensaio com milho (*Zea mays* L.) cultivado por 40 dias; ²Identificação a partir de contagem direta (CD) de esporos em amostra de solo; ³Identificação a partir de esporos recuperados após 6 meses de cultura armadilha (CI); ⁴Tratamentos com mesmas letras na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05); ND = abaixo do nível de detecção.

Dentre as espécies de FMA encontradas na área estudada, *Paraglomus brasilianum* foi a mais representativa, sendo observada nas três áreas, tanto na contagem direta (CD) quanto após o período de multiplicação (CI), não ocorrendo porém na CD da área margem da mineradora. Os estudos confirmaram que o uso de culturas armadilha pode propiciar a detecção de maior riqueza de espécies do que a contagem direta do material trazido do campo. No entanto, isso nem sempre acontece. Em ecossistema semiárido no sudeste da Espanha, Ferrol *et al.* (2004) verificaram que o número de esporos de FMA nas amostras coletadas diretamente da área de estudo era relativamente baixo (2–55 esporos 100 g de solo⁻¹) e apenas uma espécie, *Paraglomus occultum* foi identificada. Após três anos de cultura com plantas armadilha, a riqueza de espécies de FMA mantinha-se baixa, com predominância de espécies de *Glomus*. Em diferentes sistemas de cultivo, Franke-Snyder *et al.* (2001) verificaram que das 15 espécies encontradas, 13 eram do gênero *Glomus*. Após três ciclos de cultivo, apenas uma espécie, *Glomus constrictum*, que não havia sido encontrada na contagem direta foi identificada.

Na área rejeito foram encontradas três espécies (*Archaeospora trappeii*, *Glomus diaphanum* e *Glomus* sp.) que não ocorreram nas demais áreas. As duas primeiras também não foram recuperadas após os dois ciclos de cultivos com painço e amendoim. É provável que as espécies micorrízicas encontradas na área rejeito estejam melhor adaptadas às condições do local e prevaleçam no ambiente por possuir afinidade com as características do solo, suportando pH alcalino (7,8) e as elevadas concentrações de P (70 mg L⁻¹) e de Cu, Zn e Fe (145, 4 e 367 mg L⁻¹, respectivamente) disponíveis. De acordo com a análise de solo (Tab. 1), há indícios de aplicação de fontes de P na área rejeito, especificamente, fertilizantes a base de monofosfato de cálcio (magnésio) hidratado. Esta é uma estratégia que promove a precipitação de complexos de hidróxidos de fosfatos de Cu, Fe e Zn insolúveis, no sentido de atenuar a contaminação dos ecossistemas vizinhos com esses metais. Composição química

semelhante ao substrato de rejeito Camaquã, RS, também foram visualizadas em área de rejeito de mineração de cobre, no município de Jaguarari, Bahia, por Lins *et al.* (2006), que apresentou pH alcalino (7,4) e elevadas concentrações de P (70 mg L^{-1}) e de Cu, Zn e Fe (484, 3,6 e 673 mg L^{-1} , respectivamente) disponíveis. Na área margem, adubações adicionais com substratos orgânicos e fontes de cálcio e magnésio podem ter sido empregadas dentro de um programa de acondicionamento de leito para o plantio de eucalipto. Essa estratégia procura acondicionar a composição química do solo dentro do tolerável para o crescimento do eucalipto, influenciando quanti e qualitativamente (biodiversidade) a microbiota do substrato solo e, especificamente a relação fungo-planta.

Maior número de esporos foi encontrado na área de cultivo de eucaliptos, diferindo significativamente das áreas rejeito e margem, onde poucos esporos foram isolados (Tab. 2). A variação encontrada no NMP de propágulos infectivos, assim como no número de esporos nas áreas estudadas, pode estar relacionada com a cobertura vegetal de cada área, às condições do solo, o hospedeiro utilizado no bioensaio e aos diferentes mecanismos de sobrevivência dos FMA. Silva *et al.* (2001) verificaram que em área de mineração de cobre houve baixa densidade de esporos e reduzido NMP de propágulos micorrízicos, especialmente nas áreas com excesso de metais pesados. Em área contaminada com Zn, Klauberg-Filho *et al.* (2002) referiram maiores densidades de esporos nos locais com menor contaminação, atribuindo o fato ao melhor crescimento vegetativo do hospedeiro e ao maior nível de colonização micorrízica. Em área da caatinga foi encontrada relação inversa entre o número de esporos e o de NMP de propágulos de FMA (Souza *et al.* 2003), o que não ocorreu no presente trabalho. Em áreas desertificadas do semiárido no sudeste da Espanha, onde a vegetação herbácea predominava, Azcón-Aguilar *et al.* (2003) constataram maior número de propágulos de FMA em solos cultivados do que em não cultivados.

Reduções na diversidade de FMA podem ser justificadas pela perda da diversidade em termos de hospedeiros e pela baixa estabilidade do ecossistema, ocasionada normalmente por estresses, como poluição do solo por metais pesados (Klauber-Filho *et al.* 2002). Espécies vegetais podem influenciar o padrão de multiplicação de FMA na rizosfera e afetar significativamente a diversidade desses fungos (Johnson *et al.* 2003). Na área de rejeito havia algumas gramíneas dispersas, enquanto na margem não havia plantas e, de acordo com o estudo morfológico realizado, os poucos esporos de FMA encontrados aparentemente eram inviáveis e, por esta razão, não foram contabilizados. A área de cultivo de eucaliptos era constituída basicamente por bosques de eucalipto com idade média de 8 anos, em substituição à vegetação nativa, provavelmente como uma barreira ao escoamento superficial do rejeito. Apesar de não apresentarem especificidade, os FMA possuem certa preferência quanto ao hospedeiro (Declerck *et al.* 1995), o que pode ter contribuído para o número reduzido de espécies de FMA e para o número elevado de esporos inviáveis (velhos e oxidados) encontrados na área de cultivo de eucaliptos. Além disso, o eucalipto forma associação do tipo arbuscular apenas no início do seu desenvolvimento, especificamente na fase de muda, sendo posteriormente substituída pela ectomicorrízica (Brundrett *et al.* 1996). Neste caso, é provável que, por não encontrarem hospedeiros disponíveis, os esporos de FMA na área de cultivo de eucaliptos estivessem em estado de latência, sendo possível recuperá-los e identificá-los posteriormente no cultivo em cultura armadilha ou por contagem indireta.

Maior produção de glomalina ocorreu na área de cultivo de eucaliptos, em comparação com as demais áreas, onde pouca ou nenhuma proteína foi detectada (Tab. 2). Wright *et al.* (1999) observaram que a produção de glomalina foi menor em área com distúrbio do que em área cultivada, sugerindo que a concentração de glomalina pode ser uma medida específica da qualidade do solo quando comparada com áreas impactadas. Considerando que na área de cultivo de eucaliptos havia mais esporos, estes podem ter contribuído para detecção de

maiores valores de glomalina nesta área. Além de ser produzida pelas hifas externas dos FMA, esta glicoproteína pode ser encontrada também na parede dos esporos (Wright *et al.* 1996). A glomalina pode ser utilizada para estimar a produção de FMA no solo, servindo como bioindicador, pois além de específica desses fungos (Lovelock *et al.* 2004), pode ter sua produção afetada por fatores ambientais (Rillig & Steinberg, 2002), variando entre espécies e isolados (Wright *et al.* 1996).

O conhecimento das espécies de FMA adaptadas à condição de estresse na área impactada pela atividade mineradora, indica a possibilidade da sua utilização no estabelecimento de plantas, em processos de revegetação. Os resultados mostraram que o excesso de metais pesados no solo, especificamente o cobre, influencia a densidade e a diversidade de FMA, e conseqüentemente a atividade micorrízica.

Referências bibliográficas

- Azcón-Aguilar, C.; Palenzuela, J.; Roldán, A.; Bautista, S.; Vallejo, R.; Barea, J.M. 2003. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology* 22:29-37.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68:1-24.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Brower, J.E. & Zar, J.H. 1984. Community similarity. Pp.161-164. In: Brower, J.E. & Zar, J.H. (eds) *Field & Laboratory for General Ecology* Win C. Brown Publishers, Dubuque,.

Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra: Australian Centre for Agricultural Research. 374p.

Caproni, A.L.; Franco, A.A.; Berbara, R.L.L.; Trufem, S.B.; Granha, J.R.D.O.; Monteiro, A.B. 2003. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 12:1409-1418.

Caravaca, F.; Alguacil, M.M.; Barea, J.M.; Roloán, A. 2005. Survival of inoculum and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 37:227-233.

Cuenca, G.; Andrade, Z.; Escalante, G. 1997. Diversity of glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30:711-719

Declerck, S.; Plenchette, C.; Strully, D.G. 1995. Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivar. *Plant and Soil* 176 (1):183-187.

Embrapa. Ministério da Agricultura. 1997. Manual de Métodos de Análises de Solo. 2. ed. Rio de Janeiro.

Enkhtuya, B.; Rydlová, J.; Vosátka, M. 2000. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. *Applied Soil Ecology* 14:201-211.

Ferrol, N.; Calvente, R.; Cano, C.; Barea, J.M.; Azcón-Aguilar, C. 2004. Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification threatened semiarid Mediterranean ecosystem. *Applied Soil Ecology* 25:123-133.

Fisher, R. A. & Yates, F. 1970. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. 6 ed. Hafner Publication Company, Davien.

Franke-Snyder, M.; Douds JR, D.D.; Galvez, L.; Phillips, J.G.; Wagoner, P.; Drinkwater, L.; Morton, J.B. 2001. Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. *Applied Soil Ecology* 16:35-48.

Gerdemann, J.W. & Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244.

González-Chávez, M.C.; Carrilho-González, R.; Wright, R.S.; Nicholls, K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130:317-323.

Invam, International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi. Disponível: site <http://invam.caf.wvu.edu> (2006).

Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report* 48:692.

Johnson, D., Vandenkoornhuyse, P.J., Leake, J.R., Gilbert, L., Booth, R.E., Grime, J.P., Young, J.P.W., Read, D.J. 2003. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist* 161:503–515.

Klauber-Filho, O.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S. 2002. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 26:125-134.

Knorr, M.A.; Boerner, R.E.J.; Rillig, M.C. 2003. Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. *Mycorrhiza* 13:205-210.

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.

Lins, C.E.L.; Cavalcante, U.M.T.; Sampaio, E.V.S.B.; Messias, A.S.; Maia, L.C. 2006. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. In copper contaminated soil. *Applied Soil Ecology* 31:181-185.

Lovelock, C.E.; Wright, S.F.; Nichols, K.A. 2004. Using glomalin as an indication for arbuscular mycorrhizal hyphae growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1009-1012.

Maia, L.C. & Trufem, S.F.B. 1990. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 13:89-95.

Pfleger, F.L.; Stewart, E.L.; Noyd, R.K. 1994. Role of vsm fungi in mine land revegetation. Pp. 47-82. In: Pfleger, F. L.; Linderman, R. G. (Eds.). *Mycorrhizae and Plant Health* St. Paul: APS Press.

Phillips, J. M. & Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.

Purin, S.; Klauber-Filho, O.; Stürmer, S.L. 2006. Mycorrhizae activity and diversity in conventional and organic apple orchards from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry* (*In press*).

Rillig, M.C. & Steinberg, P.D. 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry* 34:1371-1374.

Roldan-Fajardo, B.E. 1994. Effect of indigenous arbuscular mycorrhizal endophytes on the development of six wild plants colonizing a semi-arid area in south-east Spain. *New Phytologist* 127:115-121.

Schenck, N.C. & Pérez, Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi 3^a ed. Synergistic Publ., Gainesville, Florida.

Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn, Germany. 371 p.

Silva, G.A.; Maia, L.C.; Silva, F.S.B.; Lima, P.C.F. 2001. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24 (2):135-143.

Silva, G.A.; Trufem, S.F.B.; Saggin Júnior, O.J.; Maia, L.C. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining área in Brazil. *Mycorrhiza* 15:47-53.

Souza, P.V.D.; Schmitz, J.A.K.; Freitas, R.S.; Carniel, E.; Carrenho, R. 2002. Identificação e quantificação de fungos micorrízicos arbusculares autóctones em municípios produtores de citros no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37:553-558.

Souza, R.G.; Maia, L.C.; Sales, M.F.; Trufem, S.F.B. 2003. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 26 (1):49-60.

Steinberg, P.O. & Rillig, M.C. 2003. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biology and Biochemistry* 35:191-194.

Teixeira, G. & Gonzalez, M. 1988. Minas de Camaquã, Municipio de Caçapava do Sul, RS. Pp. 33-41. In: Schobbenhaus, R.; Coelho, C.E.S. (coord.). Principais depósitos minerais do Brasil. vol. 3.

Van der Heijden, M.A.G.; Van der Klironomos, J.N.; Ursic, M.; Moutoglis, P.; Streitwolf-Engel, R.; Boller, T.; Wiemken, A.; Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72.

Vangronsveld, J.; Colpaert, J.V.; Van Tichelen, K.K. 1996. Reclamation of a bare industrial area contaminated by heavy metals: physicochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. *Environment Pollution* 94: 131-140.

Wright, S.F.; Franke-Snyder, M.; Morton, J. B.; Upadhyaya, A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil* 181:193-203.

Wright, S.F.; Starr, J.L.; Paltineanu, J.C. 1999. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Science Society of America Journal* 63:1825-1829.

Wright, S.F. & Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198:97-107.

Capítulo 3

*Efeito do Cobre no Crescimento e na Micorrização de **Trifolium pratense** L.*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Chemosphere

Efeito do Cobre no Crescimento e na Micorrização de *Trifolium pratense* L.

Cláudia Elizabete de Lima Lins⁽¹⁾, Cosme Rafael Martínez Salinas⁽²⁾,

Zaida Inês Antonioli⁽³⁾ e Leonor Costa Maia⁽¹⁾

⁽¹⁾UFPE, Departamento de Micologia, 50670-420, Recife, PE claudia_lins@bol.com.br

⁽²⁾UFPB, Departamento de Biologia Molecular, 58.051-900, João Pessoa, PB

⁽³⁾UFSM, Departamento de Solos, 97105-900, Santa Maria, RS

Resumo

Dois experimentos foram desenvolvidos para avaliar o efeito da inoculação com *Glomus etunicatum* sobre o crescimento e acúmulo de nutrientes em plantas de *Trifolium pratense* L. (trevo vermelho) cultivadas em condições de excesso de cobre. No 1º experimento foi testado o nível de cobre tolerável pela planta, em fatorial, com 8 níveis de cobre (31, 123, 246, 492, 984, 1967, 3935 e 7869 μM) x 2 níveis de fósforo (0,1 e 1,9 mM). Aos 40 dias da inoculação, efeitos negativos do aumento do nível de cobre foram observados sobre a produção de matéria seca da parte aérea e da raiz, altura das plantas e comprimento das raízes. A colonização das raízes mostrou-se sensível ao aumento do nível de cobre e, nas concentrações $\geq 1967 \mu\text{M}$ não houve estabelecimento da simbiose. A adição de P, no tratamento com 31 μM Cu, diminuiu a colonização em aproximadamente 65%, e nos tratamentos com 123 e 246 μM Cu estimulou a colonização, em relação ao observado nos tratamentos com 0,1 mM P. A produção de esporos foi inibida a partir de 123 μM Cu, nos dois níveis de fósforo. No 2º experimento, em fatorial, com 2 tratamentos de inoculação com FMA (com e sem) x 4 níveis de cobre (31, 123, 246, 492 μM) x 2 níveis de fósforo (0,1 e 1,9 mM), as plantas de trevo foram avaliadas aos 90 dias quanto à produção de matéria seca e elementos acumulados na parte aérea e na raiz. O aumento de fosfato na solução proporcionou acúmulo de P (de 186 para 1339 μg) e de K (de 3,30 para 4,72 mg) na parte aérea das plantas. *G. etunicatum* estimulou significativamente a produção de MSPA e o acúmulo de Fe na raiz (600%). O aumento da concentração de fosfato na solução reduziu significativamente o acúmulo de Cu na parte aérea das plantas cultivadas nos níveis acima de 236 μM Cu. Os resultados sugerem que o uso concomitante de *Glomus etunicatum* e fósforo pode constituir alternativa em processos de recuperação de áreas impactadas por excesso de cobre.

Palavras-chave: associação micorrízica, bioacúmulo, fósforo, *Glomus etunicatum*, trevo

Introdução

Quando presentes em elevadas concentrações no solo, os metais pesados são tóxicos às plantas e à maioria dos microorganismos (Vivas et al., 2005), incluindo os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que se estabelecem na interface das raízes das plantas hospedeiras e do solo (Malcová et al., 2003). Os FMA ocorrem de maneira generalizada em ecossistemas terrestres, incluindo solos contaminados por metais pesados. Estes fungos formam associação simbiótica com a maioria das espécies vegetais (Smith & Read, 1997) e são considerados essenciais para a sobrevivência e crescimento das plantas em solos impactados (Khan 2005). Em troca do carbono fornecido pelas plantas, os FMA suprem a planta hospedeira com nutrientes minerais que são relativamente imóveis no solo, particularmente o P e os micronutrientes (Zhu et al., 2001; Chen et al., 2005), aumentam a resistência à seca (Kaya et al., 2003), diminuem as infecções por patógenos (Abdala & Abdel-Fattah, 2000) e reduzem a absorção ou translocação de vários metais para a parte aérea das plantas, quando estes se encontram em quantidades excessivas no ambiente (Enkhtuya et al., 2000; Bi et al., 2003). De acordo com Vivas et al. (2005), os microorganismos podem ser cruciais na sobrevivência das plantas em solos contaminados. A tolerância aos metais, mostrada pelas plantas micorrizadas, é baseada em uma série de mecanismos e efeitos simbióticos, bem como na capacidade do micélio fúngico se ligar na rizosfera ou nas raízes.

Dentre os possíveis mecanismos pelos quais os FMA aumentam a resistência das plantas aos metais pesados, está a capacidade em imobilizar os metais através da precipitação intracelular de cátions com fosfato ou pela adsorção de íons de metais na parede das hifas (Bi et al., 2003; Barea et al., 2005). O efeito dos FMA na disponibilidade de metais no solo para as plantas envolve conhecimentos sobre os processos fisiológicos, simbiose, a disponibilidade química (intensidade da exposição tóxica) e a capacidade do solo em suprir o metal (Peijenenburg et al., 2000; Malcová et al., 2003).

Estudos têm mostrado efeito positivo dos FMA nas plantas quanto à absorção ou translocação de metais. Chen et al. (2003) verificaram, em plantas de *Trifolium pratense* L. micorrizadas, a redução do Zn translocado para a parte aérea e a retenção de quantidades substanciais deste metal nas raízes. Huang et al. (2002) encontraram, em plantas de milho (*Zea mays* L.) micorrizadas, reduções de 10, 18 e 29 %, respectivamente, no acúmulo de Pb, Cu e Zn, quando comparadas com plantas não micorrizadas. Nesse contexto, a simbiose planta × FMA mostra-se como alternativa importante para aumentar a eficiência nos processos de revegetação em ambientes adversos (Vivas et al., 2003), tais como em áreas de mineração. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do FMA sobre o crescimento e o acúmulo de nutrientes em plantas de trevo (*T. pratense*) cultivadas em condições de excesso de cobre e diferentes níveis de fósforo.

Material e métodos

Sementes de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) superficialmente desinfestadas (5% hipoclorito de sódio, v/v) e escarificadas (água a 70 °C) foram tratadas com inoculante turfoso contendo *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (estirpes 023-1 e 022-3), cedido pela Bioagro[®] (Santa Maria, RS) e semeadas (20 sementes) em areia lavada esterilizada (225 g. tubete⁻¹). Em seguida, inóculo com 200 esporos. tubete⁻¹ de *Glomus etunicatum* Becker & Gerd. - UFPE 06 (proveniente do Laboratório de Micorrizas da UFPE) foi adicionado. Após 15 dias da germinação, procedeu-se ao desbaste, deixando 10 plantas tubete⁻¹. Durante o cultivo as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland & Arnon (modificada por Jarstfer & Sylvia, 1992), acrescida de Cu (CuSO₄) e de P (K₂HPO₄-KH₂PO₄), com pH final de 6,8. O substrato foi mantido a 70% (p/p) da capacidade máxima de retenção de solução nutritiva durante o cultivo. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em fatorial 8×2 (8 níveis de Cu: 31, 123, 246, 492, 984, 1967, 3935 e 7869 µM e 2 níveis de P:

0,1 e 1,9 mM), com 3 repetições, sob condições de casa de vegetação, com temperatura de 23 a 32 °C e umidade relativa do ar de 50 a 81%, mínimas e máximas, respectivamente, no Campus da UFPE (8° 25' S e 34° 57' W).

Após 40 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas quanto à altura, produção de matéria seca (75 °C, por 36 h) da parte aérea (g MSPA) e da raiz (g MSR), comprimento total de raízes, colonização micorrízica (% segmentos de raiz colonizados) e produção de esporos (n° esporos 50 g areia⁻¹). Aspectos relacionados com a nodulação também foram verificados. As medidas da colonização do fungo nas raízes foram por contagem direta, após coloração (Phillips & Hayman, 1970), seguindo o método de interseção dos quadrantes (Giovannetti & Mosse, 1980). A produção de esporos de FMA foi estimada após extração por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963) e centrifugação em água e solução de sacarose (Jenkins, 1964). Outras variáveis derivadas como relação da matéria seca da parte aérea com a raiz (g MSPA g MSR⁻¹), densidade específica da raiz (g MSR cm de raiz⁻¹) e produção de esporos na base de matéria seca de raiz (n° esporo g MSR⁻¹) também foram estudadas.

Um segundo experimento fatorial (2×4×2) foi realizado em delineamento casualizado com 5 repetições, sob condições de casa de vegetação, com temperatura de 13 a 23 °C e umidade relativa do ar de 75 a 87%, mínimas e máximas no Campus da UFSM (29° 43' S e 53° 42' W). Os tratamentos avaliados foram: 1) inoculação (não inoculado e inoculado com 114 esporos de *G. etunicatum* - UFPE 06; 2) níveis de Cu (31, 110, 236, 472 µM); 3) níveis de P (0,1 e 1,9 mM). Sementes de trevo desinfestadas foram escarificadas e inoculadas com rizóbio e FMA. As plantas foram cultivadas conforme mencionado anteriormente e, após 90 dias da inoculação, foram avaliadas quanto à produção de matéria seca e elementos acumulados na parte aérea e na raiz. As análises para micro (Cu e Fe) e macronutrientes (P e K) no tecido vegetal foram realizadas conforme informado em Tedesco et al. (1995). Outras

variáveis derivadas, como a relação MSPA/MSR e as relações parte aérea:raiz (PA/R) dos elementos acumulados também foram estudadas.

Foi realizada análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados de número de esporos e de colonização das raízes foram transformados, respectivamente, em $\log(x+1)$ e $\arcsen(x \cdot 100^{-1})^{0,5}$.

Resultados e discussão

No primeiro experimento, foram detectados efeitos do aumento do nível de fosfato de 0,1 para 1,9 mM na solução, sobre a produção de matéria seca e o comprimento da parte aérea e da raiz das plantas (Tab. 1). Os maiores efeitos positivos foram observados na MSPA (43%) e na altura das plantas (35%). Menores aumentos foram obtidos na MSR (17%) e no comprimento da raiz (10%). A adubação fosfatada em leguminosas tem sido estudada devido sobretudo ao importante papel do P no desenvolvimento destas plantas (Marschner, 1995). Bailey & Laidlaw (1998) obtiveram, em casa de vegetação, incremento de produção de matéria seca de trevo branco (*Trifolium repens* L.) com a aplicação de P (120 mg vaso⁻¹), que favoreceu a ramificação, o número de folhas e a área foliar. Em três leguminosas (*Trifolium resupinatum* L., *Trifolium subterraneum* L. e *Lotus subbiflorus* Lag.), Krolow et al. (2004) verificaram que as plantas responderam positivamente ao aumento da adubação fosfatada, e que a dose de 2,15 mg dm⁻³ P, cerca de duas vezes a recomendada, proporcionou a máxima produção de MS nas três espécies testadas.

Tabela 1. Efeito do fósforo na matéria seca, altura e comprimento da raiz de plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), 40 dias após inoculação com *Glomus etunicatum* (UFPE 06)

mM P	Matéria Seca		Altura	Comprimento da Raiz
	Parte Aérea	Raiz		
	(g)		(cm)	
0,1	*0,135 B	0,428 B	5,63 B	48,78 B
1,9	0,193 A	0,499 A	7,65 A	53,50 A

* Médias (n = 24) com a mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de F (P < 0.05).

Elevadas concentrações de cobre no solo ($> 0,8 \text{ mg dm}^{-3}$) são fitotóxicas (Abreu et al., 2001) e podem causar dano a plantas e microrganismos (Camargo et al., 2001). Efeitos negativos produzidos pelo aumento do nível de Cu foram observados sobre MSPA, MSR, altura e comprimento da raiz, no presente trabalho (Tab. 2). Os efeitos deletérios do Cu foram significativos para níveis $\geq 1967 \text{ } \mu\text{M}$ quando comparados ao controle ($31 \text{ } \mu\text{M}$). A MSPA e a MSR tiveram reduções $\geq 32\%$. A altura das plantas mostrou-se menos sensível ao efeito deletério do Cu, com redução de 8,0 para 6,2 cm no nível de $1967 \text{ } \mu\text{M}$ (22%). O comprimento da raiz mostrou-se mais sensível ao Cu, com redução de 71 para 40 cm, equivalente a 44% (Tab. 2). Trabalhos envolvendo a influência de metais pesados no crescimento de plantas micorrizadas de *T. pratense* revelam diferenças quanto à sensibilidade dessa espécie à toxicidade destes elementos. Bi et al. (2003) observaram que as produções de MS da parte aérea e da raiz foram reduzidas por elevadas concentrações de Zn (400 mg kg^{-1}). Por outro lado, em estudos realizados por Chen et al. (2003), a produção de MS de trevo vermelho não foi influenciada pela adição de Zn ($0\text{-}400 \text{ mg. kg}^{-1}$), mas houve tendência para redução em concentrações de Zn maiores que 600 mg. kg^{-1} .

A densidade de raízes teve comportamento diferenciado (Tab. 2), com aumento significativo de 46% ($0,8$ para $1,23 \text{ g MSR. cm de raiz}^{-1}$) quando o nível de Cu aumentou de

31 para 7869 μM . Este resultado mostra que o trevo vermelho responde ao estresse formando raízes com maior massa por unidade de comprimento, o que coincide com as observações diretas quanto ao aspecto morfológico das raízes, que apresentaram encurtamento e maior diâmetro, nos tratamentos com maiores níveis de Cu (Fig. 1). De acordo com Malavolta et al. (1997), o cobre tende a acumular-se nas raízes e, devido a este fato, a toxidez se manifesta primeiramente nas raízes que escurecem e perdem elementos previamente absorvidos, indicando o possível comprometimento da permeabilidade das membranas. Durante estádios iniciais do desenvolvimento da planta, a toxicidade do cobre afeta o crescimento e causa redução na ramificação, engrossamento e coloração anormal das raízes (Gupta, 2001). A clorose em folhas mais jovens é outro sintoma provocado pela interferência deste metal, quando em excesso, que influencia negativamente a síntese de clorofila (Römheld, 2001). Clorose acentuada foi observada nas folhas de trevo conforme o aumento da concentração de Cu. Esse efeito foi diminuído nas plantas que receberam 1,9 mM de fósforo (Fig. 1).

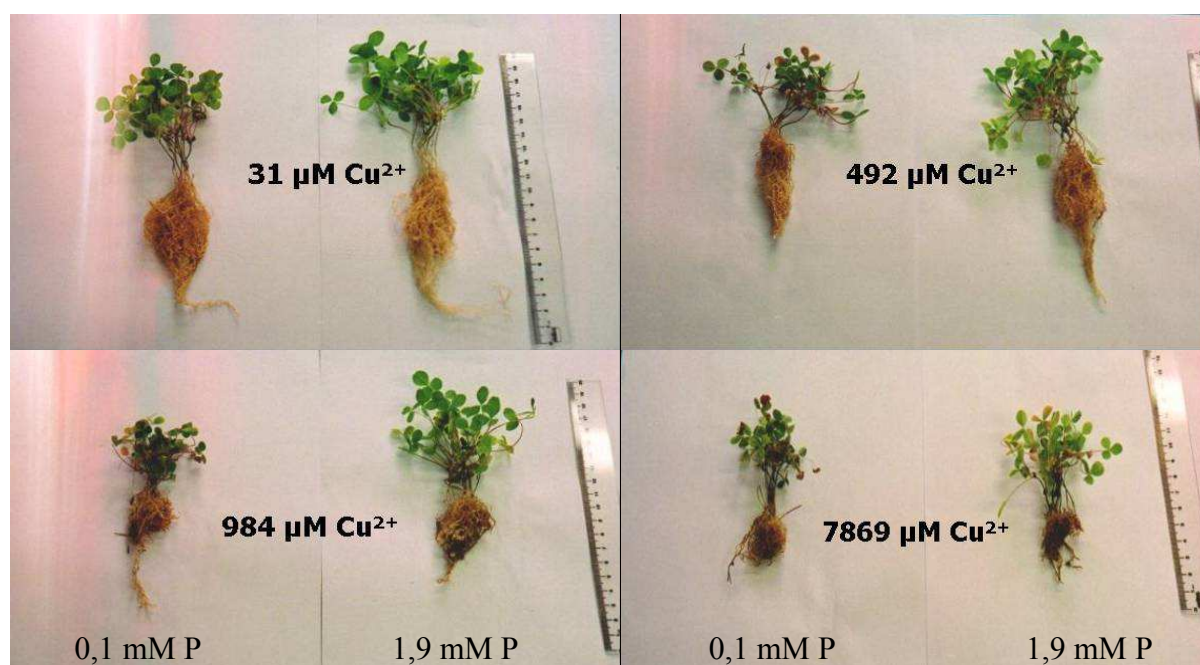


Figura 1. Aspecto geral de plantas de *Trifolium pratense* cultivadas em níveis crescentes de cobre e de fósforo, 40 dias após inoculação com *Glomus etunicatum* (UFPE 06).

Tabela 2. Efeito dos níveis de cobre no rendimento da matéria seca, na altura, no comprimento da raiz e na densidade específica em raízes de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), 40 dias após a inoculação com *Glomus etunicatum* (UFPE 06)

Tratamentos	Matéria Seca Parte Aérea	Matéria Seca Raiz	Altura	Comprimento da Raiz	Densidade Específica da Raiz
$\mu\text{M Cu}$	(g)		(cm)		(g)
31	*0,213 A	0,591 A	8,08 A	71,0 A	0,84 B
123	0,184 AB	0,567 A	7,50 AB	63,6 A	0,90 AB
246	0,196 A	0,575 A	7,67 AB	65,3 A	0,89 AB
492	0,180 AB	0,537 A	7,67 AB	62,2 A	0,87 AB
984	0,187 AB	0,507 AB	6,75 ABC	58,8 A	0,88 AB
1967	0,143 BC	0,404 B	6,17 BC	40,2 B	1,01 AB
3935	0,121 CD	0,341 B	5,25 CD	32,8 B	1,07 AB
7869	0,087 D	0,187 C	4,00 D	15,2 C	1,23 A
CV (%)	14,6	14,2	15,1	15,2	20,7

*Médias (n = 6) com a mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Íons de fosfato podem interferir na solubilidade dos elementos metálicos, formando precipitados pouco solúveis e diminuindo a concentração de íons em solução (Camargo et al., 2001). A relação MSPA/MSR e a colonização micorrízica das raízes de trevo vermelho responderam diferentemente ao aumento dos níveis de Cu, sob influência da concentração do P (Fig. 2). Em níveis de 0,1 mM P, o aumento de Cu de 31 para 3935 μM não alterou a relação MSPA/MSR ($\approx 0,33 \text{ g MSPA. g MSR}^{-1}$); entretanto, houve aumento significativo (> 80%) na concentração de 7869 $\mu\text{M Cu}$ (Fig. 2A). Nos tratamentos com 1,9 mM P, a relação MSPA/MSR praticamente não variou nos diferentes níveis de Cu. O aumento da concentração de P (0,1 para 1,9 mM) resultou numa relação MSPA/MSR significativamente superior nas concentrações de Cu de 246 a 984 μM . Contudo, no tratamento com 7864 $\mu\text{M Cu}$ a relação MSPA/MSR foi diminuída pelo aumento de P (1,9 mM). Não se detectou qualquer tipo de estrutura micorrízica nas plantas não inoculadas. Quanto à inoculação com rizóbio, nenhum

nódulo ou estrutura semelhante foi observado nas raízes de trevo neste experimento. De modo geral, a colonização das raízes por *G. etunicatum* (Fig. 2B) mostrou-se sensível ao aumento do nível de Cu e nas concentrações $\geq 1967 \mu\text{M}$ não houve estabelecimento da simbiose. Diferenças quanto ao percentual de raízes colonizadas por FMA podem mostrar variações quanto às espécies de planta e fungo testados e resposta ao ambiente. Li & Christie (2001) observaram percentual médio de 30% de colonização micorrízica nas raízes de *T. pratense*, sendo pouco influenciada pelos diferentes níveis de Zn (0-1000 mg kg⁻¹). Contudo Chen et al. (2005) verificaram que a colonização em raízes de *T. repens* não foi influenciada pelo acréscimo de Pb em areia (0-600mg kg⁻¹). Diferenças também podem ser devidas ao retardo ou inibição da colonização pela presença de metais pesados. Em raízes de *T. repens*, cultivado em solo contaminado por efluentes de esgoto (com altos níveis de Zn, Cu, Ni e Cd) só se constatou colonização (15%) após 8 semanas de cultivo (Koomem et al. 1990). Um dos mecanismos envolvidos na imobilização de metais por plantas micorrizadas é a precipitação intracelular do cátion de metal com o fosfato ou adsorção de íons de metal na parede das hifas (Bi et al., 2003; Barea et al., 2005). Apesar da adição de 1,9 mM P no tratamento com 31 μM Cu ter diminuído a colonização em aproximadamente 65%, nos tratamentos com 123 e 246 μM Cu, a adição de P estimulou a colonização, 7 e 35 vezes mais, respectivamente, em relação ao observado nos tratamentos com 0,1 mM P. Este resultado sugere que em baixas concentrações de Cu o P inibe a micorrização, entretanto, em concentrações de Cu inibitórias, a associação é favorecida pelo fosfato, possivelmente pela imobilização química do Cu. Bi et al. (2003) relataram que a adição de P no substrato reduziu a colonização das raízes de *T. pratense*, exceto em altas concentrações de Zn (400 mg. kg⁻¹) e que os maiores índices de colonização (35-38%) ocorreram no tratamento sem adição de P. Entretanto, Shetty et al. (1995) verificaram efeito da simbiose micorrízica em *Andropogon gerardii* Vilm. na

tolerância ao Zn ($0-1000 \text{ mg kg}^{-1}$) sob diferentes níveis de P ($0-200 \text{ mg kg}^{-1}$) e também constataram que, na ausência de P, os FMA estimularam o crescimento das plantas.

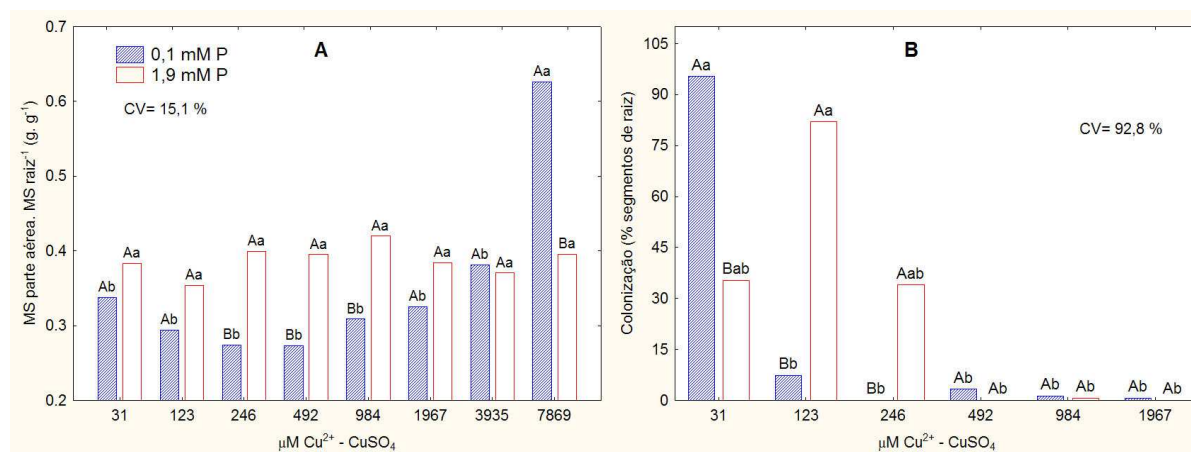


Figura 2. Efeito do cobre e fósforo na matéria seca da parte aérea e raiz (A) e na colonização micorrízica (B) de plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) cultivadas e recebendo solução nutritiva por 40 dias após a inoculação com *Glomus etunicatum*. Médias ($n = 33$) com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras minúsculas comparam dentro de cada nível de fósforo. Letras maiúsculas comparam dentro de cada nível de cobre.

A produção de esporos foi inibida com redução de aproximadamente 200 para 50 esporos 50 g areia^{-1} (Fig. 3A) entre as concentrações de 31 a $492 \mu\text{M Cu}$, nas duas concentrações de P avaliadas. Essa redução foi mais acentuada nos tratamentos com 246 e $492 \mu\text{M Cu}$ que receberam 1,9 mM P. Inibição também foi observada, de modo significativo, nas concentrações de $\text{Cu} \geq 1967 \mu\text{M}$, com 1,9 mM P. Quanto ao número de esporos relacionado com a produção de matéria seca da raiz (Fig. 3B) foram observadas respostas semelhantes àsquelas encontradas para o número de esporos. Contudo, significativo estímulo (300 para $1500 \text{ esporos. g MSR}^{-1}$) na esporulação foi observado nos tratamentos com níveis de $\text{Cu} \geq 1967 \mu\text{M}$ e 0,1 mM de P. Tal como a colonização, a produção de esporos de FMA também é afetada por diferentes metais e concentrações e varia de acordo com a espécie fúngica, a planta hospedeira e as condições do solo (Liao et al., 2003). Lins et al. (2006) verificaram que a atividade deste mesmo isolado de *G. etunicatum* foi negativamente afetada

pela adição crescente de rejeito (70 e 484 mg dm⁻³ de P e Cu, respectivamente) de mineração de cobre no substrato cultivado com uma leguminosa arbórea (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.), com redução do número de esporos de 3,17 para 0,02 g⁻¹ de areia nos tratamentos de 0 a 100% de rejeito. Liao et al. (2003) observaram diferenças quanto à sensibilidade ao excesso de Cu, de FMA associados a plantas de milho (*Z. mays*): o número de esporos de *Glomus manihotis* Howeler, Sieverd. & Schenck não variou com o aumento da concentração de Cu, enquanto *Glomus caledonium* (Nicol. & Gerd.) Trappe & Gerd. foi sensível no tratamento com elevada concentração do metal (3 mg L⁻¹).

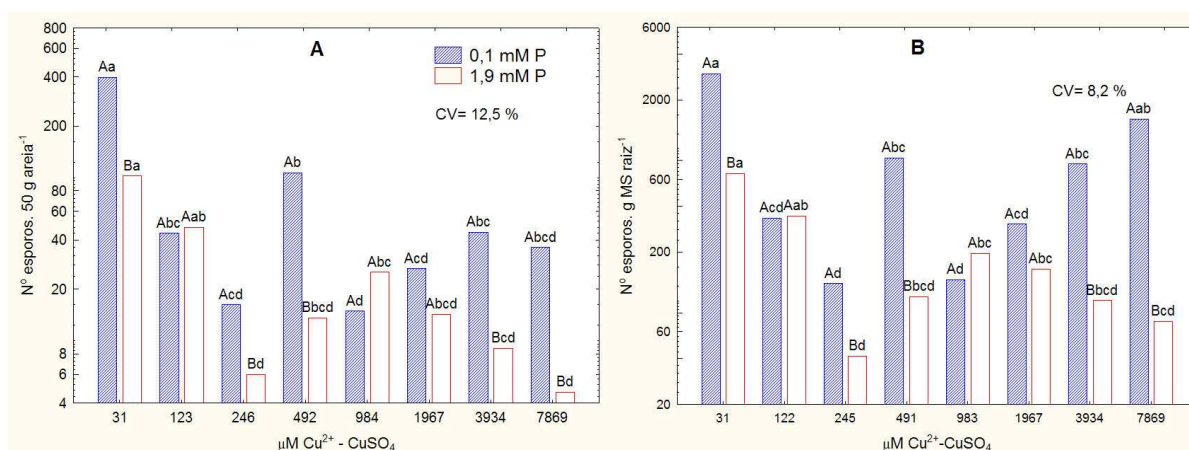


Figura 3. Efeito do cobre e fósforo na produção de esporos (A) e na relação nº de esporos g matéria seca raiz (B) de plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), cultivadas e recebendo solução nutritiva por 40 dias após a inoculação com *Glomus etunicatum*. Médias (n = 33) com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P < 0.05). Letras minúsculas comparam níveis de cobre dentro de cada nível de fósforo e maiúsculas comparam níveis de fósforo dentro do mesmo nível de cobre.

No segundo experimento, o aumento da concentração de Cu e do nível de P na solução nutritiva assim como a inoculação com *G. etunicatum*, influenciou algumas variáveis estudadas. O aumento de 31 µM para 472 µM Cu aumentou significativamente a relação MSPA/MSR (Fig. 4). Tratamentos com concentrações intermediárias de Cu (110 e 236 µM) não diferiram significativamente dos tratamentos anteriormente mencionados. O aumento do fósforo na solução de 0,1 para 1,9 mM proporcionou acúmulo de P (de 186 para 1339 µg) e de

K (de 3,30 para 4,72 mg) na parte aérea das plantas (Tab. 3). Esses resultados diferem dos encontrados por Bailey & Laidlaw (1998), que observaram redução na concentração de K na matéria seca de *T. repens* com o aumento da aplicação de P. Respostas positivas ao aumento da adubação fosfatada em espécies de trevo têm demonstrado a importância do P para estas plantas (Krolow et al., 2004), principalmente no estágio inicial de desenvolvimento. Por outro lado, plantas de trevo micorrizadas diferem quanto à produção de matéria seca e acúmulo de nutrientes quando comparadas às não inoculadas, mesmo em elevadas concentrações de metais (Zhu et al., 2001; Chen et al., 2003).

G. etunicatum estimulou significativamente a produção de MSPA, o acúmulo de Fe na raiz (600%) e aumentou a relação PA/R do Cu acumulado (22%) na planta (Tab. 4). Contudo, houve redução significativa (de 89,6 para 65,8 μg) no acúmulo do Cu nas raízes do trevo vermelho inoculado. Ressalta-se que o acúmulo de Cu na parte aérea das plantas não mostrou efeito da inoculação, e que os resultados obtidos para o acúmulo na raiz (diminuição) e na relação PA/R (aumento) desse elemento é um forte indício de que, com a inoculação com *G. etunicatum* a translocação de Cu para a parte aérea das plantas de trevo foi muito reduzida, podendo ser um mecanismo de defesa da planta estimulado pela micorrização. Chen et al. (2003) constataram que o crescimento de *T. pratense* cultivado em níveis crescentes de Zn (0-300mg kg⁻¹) foi significativamente influenciado pela colonização micorrízica. Baseados na análise da relação PA/R do Zn acumulado, esses autores concluíram que as plantas micorrizadas acumularam Zn nas raízes, enquanto nas do tratamento controle, o Zn foi translocado para a parte aérea. Em *A. gerardii*, a inoculação micorrízica não afetou a concentração de Zn na parte aérea das plantas, mas aumentou significativamente a nutrição de P e resultou em uma alta relação P/Zn na parte aérea, em todos os níveis testados (Shetty et al., 1995).

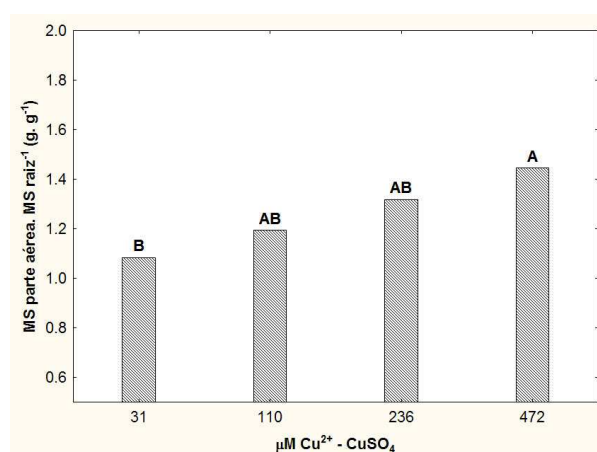


Figura 4. Efeito do cobre na relação das matérias secas da parte aérea e das raízes de *Trifolium pratense* cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia. Médias (n = 20) seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 3. Efeito do fósforo no acúmulo de P e K na parte aérea de *Trifolium pratense* cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia.

TRATAMENTOS	P	K
	Acúmulo na parte aérea	
mM P	μg	mg
0,1	*186 B	3,30 B
1,9	1339 A	4,72 A
CV (%)	12,1	13,5

*Médias (40 repetições) seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tabela 4. Efeito da inoculação com *Glomus etunicatum* na produção de matéria seca da parte aérea, no acúmulo de Fe e Cu na raiz e na relação da parte aérea/raiz na quantidade de Cu de *Trifolium pratense*, cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia

TRATAMENTOS	Matéria seca da parte aérea	Fe	Cu	
Inoculação		Acúmulo na raiz	Acúmulo na raiz	Relação parte aérea/raiz
	g tubete ⁻¹	μg tubete ⁻¹		μg μg ⁻¹
Inoculado	*0,2027 A	582 A	65,8 B	0,44 A
Não inoculado	0,2017 B	82 B	89,6 A	0,36 B
CV (%)	0,80	75	26,0	36,0

*Médias (n = 40) seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Efeitos de interação entre os níveis de P e a inoculação com *G. etunicatum* foram detectados para MSR, relação MSPA/MSR, acúmulo do P nas raízes e de Cu na parte aérea das plantas, e nas relações PA/R do P e K acumulado nas plantas (Tab. 5). As comparações dentro do nível de 0,1 mM P mostraram diminuição significativa apenas para o Cu acumulado na parte aérea das plantas (de 37 para 32 μg) quando inoculadas com *G. etunicatum*. Nos tratamentos com 1,9 mM P, a inoculação reduziu o acúmulo de P nas raízes e aumentou a relação PA/R do P, mostrando que nessa condição, a inoculação não promoveu acúmulo de P na parte aérea das plantas. Entretanto, a eficiência de produção de MSR (relação MSR com o μg P acumulado na raiz⁻¹) foi 70% maior nos tratamentos inoculados. Ainda nos tratamentos com 1,9 mM P, a inoculação aumentou a relação PA/R do K acumulado. Por outro lado, as comparações dentro dos tratamentos inoculados mostraram que o aumento do nível de P de 0,1 para 1,9 mM estimulou significativamente a produção de MSR, o acúmulo do P nas raízes e aumentou a relação PA/R do P e do K acumulado nas plantas. Para os tratamentos não inoculados, o aumento da concentração de P promoveu o acúmulo nas raízes e aumento da

relação PA/R de P acumulado nas plantas. O acúmulo de Cu na parte aérea das plantas não inoculadas foi diminuído pelo aumento dos níveis de P. Diferentes mecanismos podem estar envolvidos nas interações entre colonização micorrízica e acúmulo de metais pesados, incluindo diluição destes elementos tóxicos no tecido, devido às interações com P, bem como ao seqüestro de metais tóxicos e o desenvolvimento de tolerância na planta pela presença do fungo (Zhu et al., 2001). Redução da toxicidade, causada por excesso de alguns metais pesados, aumento da biomassa, e acúmulo de P em plantas micorrizadas têm sido referidos. Plantas de *T. pratense* inoculadas com *Glomus mosseae* Nicolson & Gerd. apresentaram duas vezes mais fósforo acumulado e biomassa que plantas não micorrizadas (Chen et al., 2003). Por outro lado, Chen et al. (2005) observaram que a micorrização aumentou significativamente a concentração de P na parte aérea e a biomassa de *T. repens*, sob elevadas concentrações de Pb. Porém, não registraram diferenças na concentração de P na parte aérea das plantas nos diferentes tratamentos com Pb, sugerindo que a alta eficiência da aquisição de P pela micorriza pode ser um mecanismo de tolerância da planta ao estresse produzido pelo Pb.

Tabela 5. Efeito do fósforo e da inoculação com *Glomus etunicatum* na produção de matéria seca das raízes e na relação parte aérea/raiz, no acúmulo de P (raiz e na relação parte aérea/raiz), K (relação parte aérea/raiz) e Cu (parte aérea) de plantas de *Trifolium pratense* cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia

TRATAMENTOS		MATÉRIA SECA		P		K	Cu
mM P	Inoculação	Raiz	Relação parte aérea/raiz	Acúmulo na raiz	Relação parte aérea/raiz	Relação parte aérea/raiz	Acúmulo na parte aérea
		g tubete ⁻¹	g g ⁻¹	µg	µg µg ⁻¹	mg mg ⁻¹	µg
0,1	Inoculado	*0,148 Ab	1,54 Aa	85 Ab	2,35 Ab	5,32 Ab	31,8 Ba
	Não inoculado	0,166 Aa	1,27 Aa	122 Ab	1,96 Ab	6,00 Aa	37,4 Aa
1,9	Inoculado	0,195 Aa	1,06 Ab	255 Ba	6,79 Aa	13,07 Aa	27,2 Ab
	Não inoculado	0,175 Aa	1,21 Aa	385 Aa	3,89 Ba	8,35 Ba	26,9 Ab
CV (%)		21,7	30,2	12,1	60,3	48,9	21,2

* Médias (n = 20) na coluna, seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam inoculação no mesmo nível de P e letras minúsculas comparam níveis de P no mesmo tratamento de inoculação

Houve efeito de interação entre os níveis de fósforo e de Cu na MSPA, no Fe e no Cu acumulado na parte aérea e, no P, K e Cu acumulado nas raízes das plantas de trevo (Fig. 5). Os resultados mostraram redução significativa na produção de MSPA com o aumento do nível de Cu de 31 para 472 μM , no cultivo com 0,1 mM P. Com exceção do tratamento com 31 μM Cu, a adição de P estimulou a produção de MSPA dos níveis 110 a 472 μM Cu (Fig. 5A). Logo, quando o cobre estava presente em excesso, na solução, o acréscimo de P favoreceu a produção de matéria seca, possivelmente por reduzir o efeito tóxico do Cu para as plantas. O K acumulado nas raízes de trevo não foi alterado significativamente pelos níveis de Cu. Contudo, houve redução significativa do K acumulado nas raízes pelo aumento do nível de P no tratamento com 31 μM de Cu (Fig. 5A). O aumento de Cu na solução não influenciou o acúmulo de P nas raízes, considerando as duas concentrações de P. O acréscimo de P promoveu aumento significativo no acúmulo deste elemento nas raízes ($\approx 180\%$). Trabalhos recentes mostraram que o acúmulo de P não foi afetado quando plantas de trevo foram cultivadas em excesso de Zn (Chen et al., 2003) e Pb (Chen et al., 2005). O Fe acumulado na parte aérea das plantas foi significativamente aumentado pelo acréscimo de Cu no tratamento com 0,1 mM P (Fig. 5B) e, nos tratamentos com 31 e 236 μM Cu, as plantas tiveram aumento significativo do Fe acumulado na parte aérea devido ao incremento do P na solução nutritiva. Em geral, níveis crescentes de Cu induziram maior acúmulo deste nutriente na parte aérea das plantas para os tratamentos com menor nível de P. Bi et al. (2003) observaram que níveis crescentes de Zn promoveram menos acúmulo de Zn na PA e R em baixos níveis de P. O aumento da concentração do fósforo para 1,9 mM na solução nutritiva reduziu significativamente o acúmulo de Cu na parte aérea das plantas cultivadas nos níveis acima de 236 μM Cu (Fig. 5C). Estes dados comprovam o efeito inibidor do P sobre a disponibilidade do Cu para as plantas, quando este metal estava em excesso na solução, o que parece ser

aplicado a outras culturas e metais pesados. Em *A. gerardii*, a adição de P no substrato também reduziu a toxicidade às plantas, mas neste caso ao Zn (Shetty et al., 1995).

O acúmulo de P e Fe na parte aérea e de P e K nas raízes, assim como a relação PA/R do acúmulo de K e Fe nas plantas de trevo foram afetadas diferentemente pelos níveis de Cu, na dependência das plantas estarem ou não inoculadas com *G. etunicatum* (Fig. 6). O P foi 4 vezes mais acumulado na parte aérea ($\approx 800 \mu\text{g}$) que nas raízes ($\approx 200 \mu\text{g}$) das plantas (Fig. 6A). A inoculação com *G. etunicatum* não produziu alterações significativas no P acumulado na parte aérea de plantas de trevo conforme aumentaram os níveis de Cu. Entretanto, nas plantas não inoculadas houve redução significativa do P acumulado nos tratamentos com níveis $\geq 110 \mu\text{M}$ Cu. Neste caso, a inoculação estabilizou o acúmulo de P na parte aérea, o que não ocorreu nas plantas não inoculadas, em elevadas concentrações de Cu. Apenas nos tratamentos com $31 \mu\text{M}$ de Cu, a inoculação reduziu significativamente o P acumulado na parte aérea das plantas. Nas raízes das plantas inoculadas, houve aumento significativo no acúmulo do P pelo aumento do Cu de 110 para $236 \mu\text{M}$, e redução significativa pelo aumento de 236 para $472 \mu\text{M}$. Comportamento semelhante foi observado nos tratamentos não inoculados, mas neste caso, para as menores concentrações de Cu. Nos tratamentos com 110 e $472 \mu\text{M}$ Cu, a inoculação com *G. etunicatum* reduziu significativamente o P acumulado nas raízes. Quanto ao acúmulo de K nas raízes e sua relação PA/R, não foram detectadas diferenças significativas associadas ao aumento do nível de Cu, nos dois tratamentos de inoculação (Fig. 6B). Contudo, nos níveis $\leq 110 \mu\text{M}$ Cu, a inoculação reduziu significativamente o acúmulo de K nas raízes. Na relação PA/R do K acumulado, ocorreu o inverso: nos tratamentos com $110 \mu\text{M}$ Cu a inoculação com *G. etunicatum* aumentou significativamente essa relação. Isso pode indicar a importância do fungo na absorção e, consequentemente, no transporte do K para a parte aérea das plantas de trevo sob níveis de Cu tóxicos. Em plantas inoculadas, não houve diferença significativa no Fe acumulado na parte

aérea e na relação PA/R quando se aumentou o nível de Cu na solução nutritiva (Fig. 6C). Todavia, nos tratamentos não inoculados houve incrementos significativos quanto ao acúmulo de Fe na parte aérea ($\approx 30\%$) e na relação PA/R ($\approx 200\%$) conforme o nível de Cu aumentava. Para o Fe na parte aérea, a inoculação estimulou significativamente o acúmulo nos tratamentos $\leq 110 \mu\text{M}$ Cu e o reduziu no tratamento com $236 \mu\text{M}$ Cu. De modo geral, a inoculação com *G. etunicatum* reduziu significativamente ($\approx 95\%$) a relação PA/R do acúmulo de Fe e manteve a distribuição de Fe na parte aérea ao longo dos níveis de Cu.

Concluindo, foi demonstrado o efeito de proteção da micorriza arbuscular diante da exposição de plantas de *T. pratense* a níveis tóxicos de cobre, bem como o efeito de proteção à toxicidade do cobre promovido pelo acréscimo de P na solução. Os resultados sugerem que o uso concomitante de *Glomus etunicatum* e P pode constituir alternativa em processos de recuperação de áreas impactadas por excesso de cobre. Pesquisas deverão ser estendidas, incluindo novos hospedeiros e FMA, para elucidar os mecanismos de proteção micorrízica a elementos potencialmente tóxicos no solo.

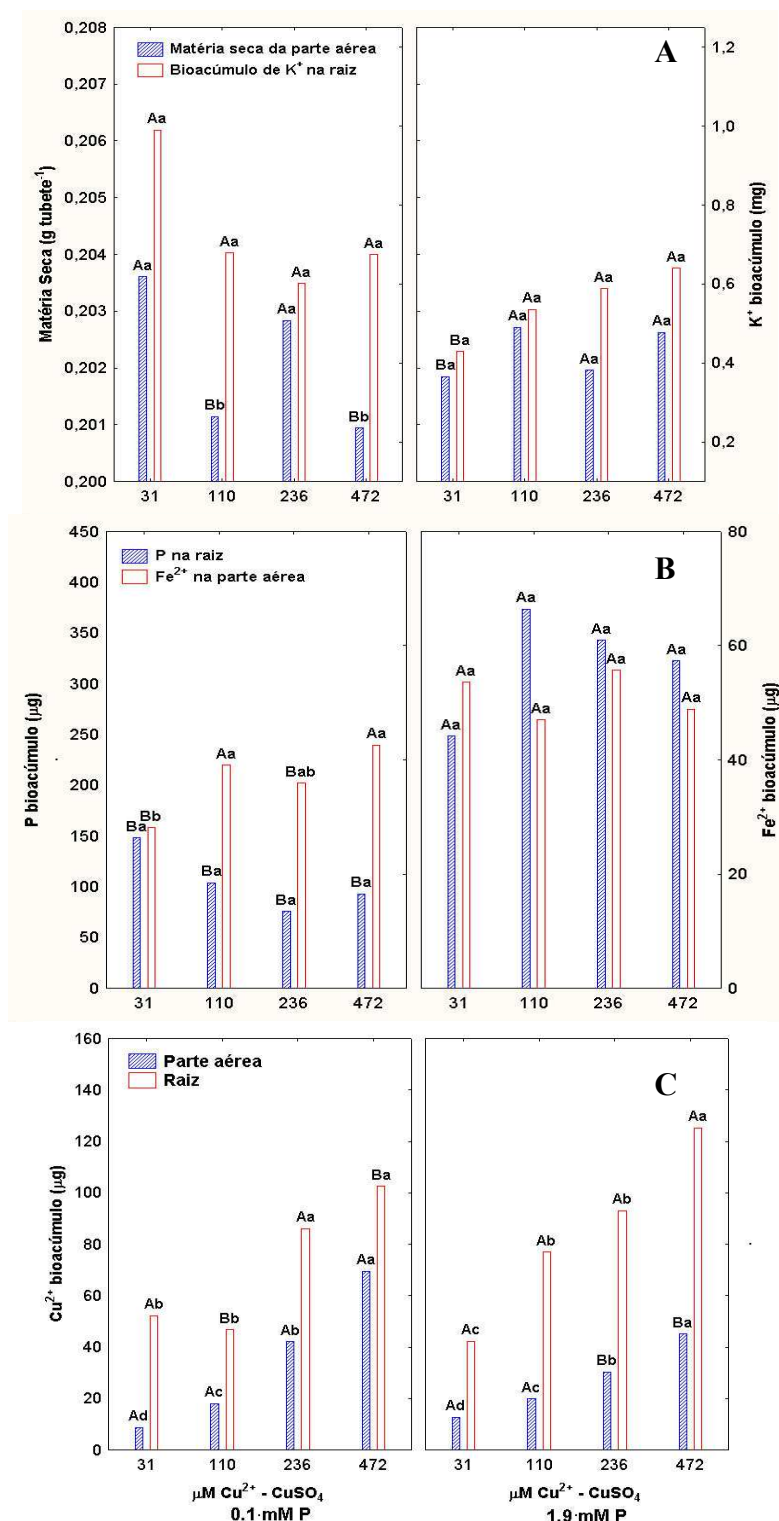


Figura 5. Efeito do cobre e sua interação com o fósforo na produção de matéria seca da parte aérea e acúmulo de K na raiz (A), de P na raiz e Fe na parte aérea (B), e de Cu na parte aérea e raiz (C) em *Trifolium pratense* cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia. Médias (n = 10) seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam níveis de P no mesmo nível de Cu e minúsculas comparam níveis de Cu no mesmo tratamento de P.

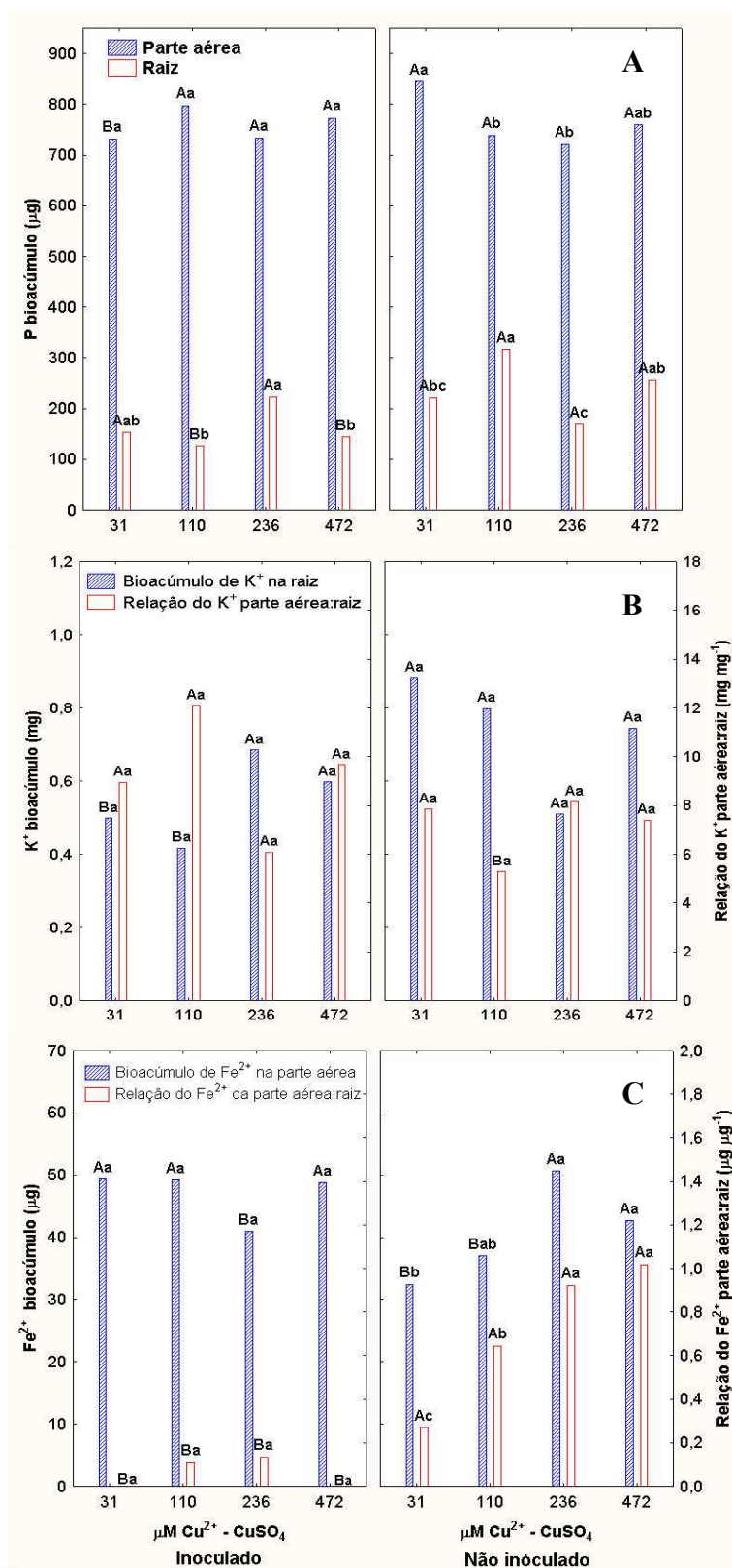


Figura 6. Efeito do cobre e da inoculação com *Glomus etunicatum* no acúmulo de P na parte aérea e raiz (A), de K na raiz e na relação parte aérea/raiz (B) e de Fé na parte aérea e na relação parte aérea/raiz (C) de *Trifolium pratense* cultivado (90d) em solução nutritiva de Hoagland e areia. Médias (n = 10) seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam inoculação no mesmo nível de Cu e minúsculas comparam níveis de Cu no mesmo tratamento de inoculação.

Referências bibliográficas

Abdala, M.E. & Abdel-Fattah, G.M. 2000. Influence of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the development of peanut pod rot disease in Egypt. **Mycorrhiza** 10:29-35.

Abreu, C.A.; Ferreira, M.E.; Borkert, J.C. 2001. Disponibilidade e avaliação de elementos catiônicos: zinco e cobre. Pp: 125-150. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal.

Bailey, J.S. & Laidlaw, A.S. 1998. Growth and development of white clover (*Trifolium repens* L.) as influenced by P and K nutrition. **Annals of Botany** 81:783-786.

Barea, J.M.; Pozo, M.J.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal Experimental Botany** 417:1761-1778.

Bi, Y.L.; Li, X.L.; Christie, P. 2003. Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. **Chemosphere** 50:931-937.

Camargo, O.A.; Alleoni, L.R.F.; Casagrande, J.C. 2001. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. Pp: 89-177. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal.

Chen, B.D.; Li, X.L.; Tao, H.Q.; Christie, P.; Wong, M.H. 2003. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. **Chemosphere** 50:839-846.

Chen, X.; Wu, C.; Tang, J.; Hu, S. 2005. Arbuscular Mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host under a sand culture experiment. **Chemosphere** 60:665-671.

Enkhtuya, B.; Rydlová, J.; Vosátka, M. 2000. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soil from degraded ecosystems and man-made habitats. **Applied Soil Ecology** 14:201-211.

Gerdemann, J.W. & Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society** **46**:235-244.

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

Gupta, U.C. 2001. Micronutrientes e elementos tóxicos em plantas e animais. Pp: 13-31. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal.

Huang, Y., Chen, Y.J., Tao, C., 2002. Uptake and distribution of Cu, Zn, Pb and Cd in maize related to metals speciation change in rhizosphere. **Chinese Journal of Applied Ecology** **13**: 860–862.

Jarstfer, A.G. & Sylvia, D.M. 1992. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Blaine Meeting Jr., F. (ed.). **Soil Microbial Ecology. Application in Agricultural and Environmental Management**. Marcel Dekker, New York,. p. 349-369.

Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report** **48**: 692.

Kaya, C.; Higgs, D.; Kirnak, H.; Tas, L. 2003. Mycorrhizal-colonization improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullun lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions. **Plant Soil** **253**:287-292.

Khan, A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** **18**: 355-364.

Koomem, I.; McGranthy, S.P.; Giller, K.E. 1990. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soil contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. **Soil Biology and Biochemistry** **22** (6):871-873.

Krolow, R.H.; Mistura, C.; Coelho, R.W. Siewerdt, L.; Zonta, E.P. 2004. Efeito do fósforo e do potássio sobre o desenvolvimento e a nodulação de três leguminosas anuais de estação fria. **Revista Brasileira. Zootecnia** **33** (6):2224-2230.

Li, X.L. & Christie, P. 2001. Changes in soil solution Zn and pH and uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn-contaminated soil. **Chemosphere** **42**:201-207.

Liao, J.P.; Lin, X.G.; Cão, Z.H.; Shi, Y.Q.; Wong, M.H. 2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. **Chemosphere** **50**:847-853.

Lins, C.E.L.; Cavalcante, U.M.T.; Sampaio, E.V.S.B.; Messias, A.S.; Maia, L.C. 2006. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. In copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology** **31**:181-185.

Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. 1997. **Avaliação do estado nutricional das plantas princípios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 2^a ed. 139p.

Malcová, R.; Vosátka, M.; Gryndler, M. 2003. Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. **Applied Soil Ecology** **23**:55-67.

Marschner, H. 1995. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press Inc.

Peijmamburg, W.; Baerselman, R.; De Groot, A.; Jager, T. Leenders, D.; Posthuma, L.; Van Veen, R. 2000. Quantification of metal bioavailability for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** **39**(4):420-430.

Phillips, J. M. & Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society** **55**: 158-161.

Römheld, V. 2001. Aspectos fisiológicos dos sintomas de deficiência e toxicidade de micronutrientes e elementos tóxicos em plantas superiores. Pp: 71-85. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal.

Shetty, K.G.; Hetrick, B.A.D.; Schwab, A.P. 1995. Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. **Environmental Pollution** **88**:307-314.

Smith, E.S. & Read, J.D. **Mycorrhizal symbiosis**. 2 ed. New York: Academic Press 605 p., 1997.

Tedesco, M. J.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2º Ed. Departamento de solos, UFRGS. (Boletim Técnico, 5). 174 p. 1995.

Vivas, A.; Vörös, A.; Biró, B.; Barea, J.M.; Ruiz-Lozano, J.M.; Azcón, R. 2003. beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. In improving plant tolerance to Cd contamination. **Applied Soil Ecology** **24**:177-186.

Vivas, A.; Barea, J.M.; Azcón, R. 2005. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. **Environmental Pollution** **134**:257-266.

Zhu, Y.G.; Christie, P.; Laidlaw, A.S. 2001. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal White clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere** **42**:193-199.

Capítulo 4

*Efeito do cobre e da adição de fosfato sobre
Pisolithus microcarpus, **Chondrogaster angustisporus** e **Suillus** sp. (Basidiomycota)*

*Artigo a ser submetido para publicação no periódico **Environmental Pollution***

**Efeito do cobre e da adição de fosfato sobre *Pisolithus microcarpus*,
Chondrogaster angustisporus e *Suillus* sp. (Basidiomycota)**

Cláudia Elizabete de Lima Lins¹, Cosme Rafael Martínez Salinas², Zaida Inês Antonioli³,
Vetúria Lopes de Oliveira⁴, Maria Taciana Cavalcante Vieira Soares⁵,
Ana Lúcia Figueiredo Porto⁵, Leonor Costa Maia¹

⁽¹⁾UFPE, Departamento de Micologia, 50670-420, Recife, PE claudia_lins@bol.com.br

⁽²⁾UFPB, Departamento de Biologia Molecular, 58.051-900, João Pessoa, PB

⁽³⁾UFSM, Departamento de Solos, 97105-900, Santa Maria, RS

⁽⁴⁾UFSC, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Florianópolis, SC

⁽⁵⁾UFRPE, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, PE

Resumo

Foram determinados os efeitos da adição de cobre e fósforo no crescimento micelial e na atividade enzimática de três fungos ectomicorrízicos. Um experimento em meio sólido (Melin-Norkrans modificado - MNM), com dois níveis de P (0,1 e 1,9 mM) e nove níveis de Cu (31, 62, 123, 246, 492, 984, 1967, 3935 e 7869 μ M) foi desenvolvido a 25 ± 1 °C, no escuro, por 30 dias, utilizando *Pisolithus microcarpus* (UFSC – Pt 116), *Chondrogaster angustisporus* (UFSC – Ch 163) e *Suillus* sp. (UFSC – Su 168). Este último apresentou maior velocidade de crescimento das colônias e, aos 30 dias, produziu mais matéria seca do que os demais isolados. Em 0,1 mM P, os tratamentos com níveis ≥ 123 μ M Cu apresentaram redução na matéria seca, no diâmetro e na velocidade de crescimento das colônias. Entretanto, esses efeitos foram atenuados em 1,9 mM P. Num segundo experimento, o isolado Su 168 foi cultivado em meio MNM líquido, com dois níveis de P (0,1 e 1,9 mM) e três níveis de Cu (31, 123 e 246 μ M). Com 1,9 mM P, a produção de biomassa foi inibida em 38% e, com 0,1 mM P, houve acidificação significativa do meio (pH 3,6). O aumento do cobre (31 para 123 μ M) inibiu a produção de biomassa (40%), e a atividade das fosfatases ácida (FAC) e alcalina (FAI) aumentaram em 41% e 61%, respectivamente. A presença de P (1,9 mM) diminuiu a atividade da FAC intracelular (25%) e FAI extracelular (42%), e aumentou a atividade da FAI intracelular (13%). O nível de toxicidade do cobre, medida pela concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) da cultura foi 53 μ M (*P. microcarpus* e *Suillus* sp.) em meio sólido e 160 μ M (*Suillus* sp.) em meio líquido. Os resultados indicam que elevada concentração de cobre tem efeitos deletérios diferenciados sobre parâmetros de crescimento e bioquímicos dos fungos estudados. Por outro lado, a atividade enzimática pode ser um mecanismo de detoxificação dos fungos ao excesso de cobre.

Palavras-chave: atividade enzimática, fosfatase, fungos ectomicorrízicos, toxicidade, metais.

Introdução

A contaminação dos solos por metais pesados, causada por processos naturais ou por atividade humana, constitui um dos mais sérios problemas ambientais (Galli et al., 1994). Em altas concentrações, os metais são tóxicos para a maioria dos organismos (Giller et al., 1998) e constituem fator limitante no crescimento de plantas (Turnau et al., 2001) e fungos (Grazziotti et al., 2001a). O cobre é um elemento essencial, mas pode ser tóxico à maioria das células vivas quando em concentrações elevadas ($> 0,8 \text{ mg dm}^{-3}$) no solo (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994; Van Tichelen et al., 1999).

Os fungos ectomicorrízicos (FEM) têm papel fundamental no aumento da absorção de nutrientes de muitas espécies vegetais (Hartley et al., 1997b) e importantes espécies arbóreas utilizadas em programas de reflorestamento dependem da simbiose ectomicorrízica para crescer e sobreviver (Rossi et al., 2002), especialmente em solos contaminados por atividade de mineração (Ramam et al., 2002). A habilidade dos FEM em reduzir a toxicidade dos íons de metais para a planta hospedeira (Hartley et al., 1997b; Kong et al., 2000) está associada à diminuição nas concentrações do metal na parte aérea da planta (Wilkins, 1991; Van Tichelen et al., 1999), devido ao aumento na absorção destes nutrientes pelas raízes e o seu acúmulo no micélio extraradical, conferindo ao hospedeiro maior tolerância a estes elementos (Aggangan et al., 1998; Graziotti et al., 2001b).

Os FEM podem variar quanto à capacidade de tolerância ambiental, sendo necessário avaliar o impacto dos metais sobre estes organismos (Graziotti et al., 2001b). Pesquisas têm sido conduzidas para determinar a sensibilidade dos FEM a uma variedade de metais potencialmente tóxicos, na busca do entendimento dos diversos mecanismos pelos quais estes fungos podem tolerar os metais pesados (Wilkins, 1991; Hartley et al., 1997a). Entretanto, ainda há pouca informação sobre a resposta fisiológica e bioquímica dos FEM aos metais tóxicos (Fan-Xiang, 1995; Pritsch, 2004).

A atividade enzimática é importante na mobilização e transferência de nutrientes no solo, via fungos ectomicorrízicos, para a planta hospedeira (Pritsch et al., 2004). Por outro lado, a capacidade dos FEM em disponibilizar o P a partir de fontes orgânicas e, portanto, melhorar a nutrição fosfática das plantas hospedeiras é de extrema importância em solos onde a biodisponibilidade do P é limitada. Um importante mecanismo pelo qual o P de fontes orgânicas é disponibilizado para as plantas é representado pela atividade das fosfatases dos fungos micorrízicos (Smith & Read, 1997). Entre essas, a fosfatase ácida está relacionada à mineralização de compostos de fosfatos orgânicos em solos ácidos (Huang & Shindo, 2000). A atividade de uma variedade de enzimas do solo é inibida em altas concentrações de metais pesados, mas em concentrações amenas, o papel de detoxificação destes metais pelas enzimas pode ser induzido (Reddy et al., 2002).

A seleção de isolados de FEM tolerantes a metais pesados poder potencializar inoculações das plantas dependentes em solos impactados por mineração (Aggangan et al., 1998), e o sucesso no estabelecimento de plantas em locais contaminados por metais pesados pode trazer benefícios ecológicos e econômicos (Hartley et al., 1997b). Entretanto, a eficiência da proteção dos FEM depende dos isolados testados, dos metais pesados e das condições experimentais de crescimento (Van Tichelen et al., 1999; Galli et al., 1994). Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos do Cu e da adição de P no crescimento micelial e na atividade enzimática de fungos ectomicorrízicos.

Material e métodos

Experimento 1: Culturas de fungos ectomicorrízicos (*Pisolithus microcarpus* UFSC – Pt 116, *Chondrogaster angustisporus* UFSC – Ch 163 e *Suillus* sp. UFSC – Su 168), fornecidas pelo Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) foram repicadas para a superfície de meio

sólido (15 g ágar L⁻¹; pH 5,8) Melin-Norkrans Modificado (MNM) (Marx, 1969), contido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Em seguida, as placas foram incubadas a 25±1 °C, no escuro, por 21 dias. Após crescimento, discos de inóculo (8 mm de diâmetro) das culturas foram transferidos para a superfície do meio MNM (15 mL) suplementado com Cu e P e as placas incubadas por 30 dias. As concentrações do cobre e de fósforo utilizadas no presente estudo foram estabelecidas em estudos preliminares, usando-se soluções estoque concentradas, respectivamente, de CuSO₄ e de K₂HPO₄-KH₂PO₄, ambas ajustadas para pH 5,8. O experimento foi em fatorial (9x2x3), com delineamento inteiramente casualizado e três repetições. Os tratamentos testados foram: 1) nove níveis de Cu (31, 62, 123, 246, 492, 984, 1967, 3935 e 7869 µM); 2) dois níveis de fósforo (0,1 e 1,9 mM); e 3) três isolados micorrízicos (UFSC – Pt 116, UFSC – Ch 163, UFSC – Su 168). Para avaliar a dinâmica do crescimento das culturas, o diâmetro das colônias foi medido durante o cultivo e a velocidade de crescimento estimada pelo ajuste do modelo linear para essa variável. Trinta dias após a inoculação foram avaliados a produção de massa micelial e o pH no meio de cultivo (meio/água, 1:2, p/p) (pH meter, Model F8L, Horiba, Tokyo).

Experimento 2: Discos de culturas de *Suillus* sp. UFSC – Su 168 foram repicados para Erlenmeyers com meio líquido MNM (50 mL) contendo Cu e P e incubados a 25±1 °C por 30 dias. O experimento foi em fatorial (3x2) com delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições. Os tratamentos testados foram: 1) três níveis de Cu (31, 123 e 246 µM); e 2) dois níveis de P (0,1 e 1,9 mM). Após o período de crescimento, o micélio foi separado em papel de filtro (Watman N° 42) e lavado com tampão acetato de sódio gelado 0,1 M (pH 4,5). O meio de cultivo sem massa micelial (fração extracelular) foi adicionalmente esterilizado por filtração (0,22 µm, Millipore) e armazenado a -80 °C. A umidade do micélio foi reduzida colocando ao ar (28 °C) sobre papel de filtro, por 2 horas, sendo realizadas medidas gravimétricas. Para obter a fração citosólica, o micélio fresco (0,5 g) foi macerado e

homogeneizado após congelamento com nitrogênio líquido. O macerado micelial foi transferido para tubo Eppendorf (1,5 mL) contendo solução salina (0,15 M NaCl), homogeneizado e centrifugado (22.000 g, 15 min a 5 °C). O sobrenadante foi armazenado em tubo Eppendorf e o pellet lavado (2x) por resuspensão e centrifugação em solução salina. Os sobrenadantes das centrifugações foram misturados (fração citoplasmática) e armazenados a -80 °C. As atividades das fosfatases ácidas (FAc; EC 3.1.3.2) e alcalinas (FAI; EC 3.1.3.1) foram avaliadas pela velocidade de liberação do *p*-Nitrofenol nas frações citoplasmática e extracelular, medida pela absorbância em 410 nm (Spectrophotometer, Model Du 640, Beckman, Fullerton). Para avaliação das fosfatases foi utilizado o Kit Doles comercial (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório Ltda).

Análise estatística: Foi realizada análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A concentração de Cu inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) da cultura foi estimada pelo emprego de modelo ajustado por regressão.

Resultados e discussão

A taxa de crescimento da colônia e a produção de matéria seca (30 dias) dos FEM cultivados em meio sólido variaram entre as espécies. A velocidade de crescimento das colônias de *Suillus* sp. ($0,186 \text{ cm dia}^{-1}$) foi significativamente superior às de *Pisolithus microcarpus* ($0,163 \text{ cm dia}^{-1}$) e de *Chondrogaster angustisporus* ($0,159 \text{ cm dia}^{-1}$), que não diferiram entre si. Do mesmo modo, *Suillus* sp. teve produção de matéria seca micelial 100% superior ($0,043 \text{ g placa}^{-1}$) à registrada para *P. microcarpus* ($0,020 \text{ g placa}^{-1}$) (Tab. 1). A produção de matéria seca micelial de *C. angustisporus* não foi determinada devido à perda do material.

Tabela 1. Taxa de crescimento da colônia e produção de matéria seca micelial de fungos ectomicorrízicos (FEM) cultivados (30 dias) em meio Melin-Norkrans Modificado (MNM)

FEM	Crescimento da Colônia cm dias ⁻¹	Produção de Matéria Seca g placa ⁻¹
<i>Pisolithus microcarpus</i>	0,163 B	0,020 B
<i>Suillus</i> sp.	0,186 A	0,043 A
<i>Chondrogaster angustisporus</i>	0,159 B	NT
CV (%)	14, 8	26,1

Médias (40 repetições) com a mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). NT - não determinado.

A produção de matéria seca micelial, o diâmetro (Fig. 1) e a velocidade de crescimento das colônias dos FEM, assim como o pH do meio MNM no final do período de cultivo (30 dias) (Fig. 2), foram afetados pelos níveis de Cu, na dependência da concentração de P no meio. Para níveis de Cu até 62 μM , a concentração de 1,9 mM P influenciou negativamente (queda de 20%) a produção de matéria seca micelial. Esse efeito inibidor do P não foi detectado para as outras variáveis (Fig. 2). Acima de 123 μM Cu, com 0,1 mM P, a matéria seca, o diâmetro das colônias e a velocidade de crescimento foram afetados negativamente pelo cobre. Nessas condições, o pH do meio diminuiu. Contudo, o efeito tóxico do Cu foi atenuado pela elevação da concentração do fosfato para 1,9 mM. De acordo com Hartley et al. (1997b), outros nutrientes podem influenciar o nível de toxidez dos metais pesados em fungos ectomicorrízicos. Neste trabalho, o aumento do P, nas concentrações deletérias de Cu, pode ter reduzido a atividade do cobre no meio de cultura e, por consequência, a sua toxidez.

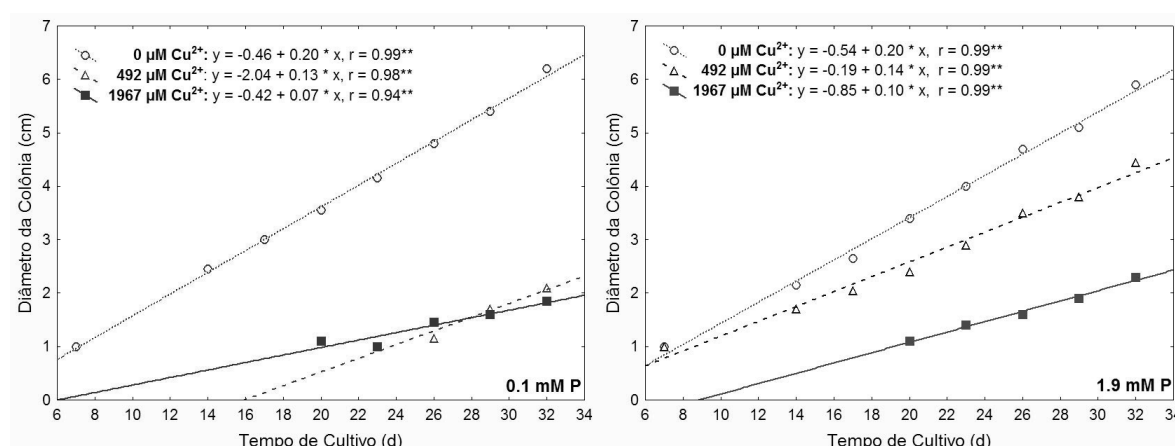


Figura 1. Dinâmica de crescimento (aumento do diâmetro) das colônias de *Suillus* sp. cultivado em meio MNM, suplementado com cobre e fósforo.

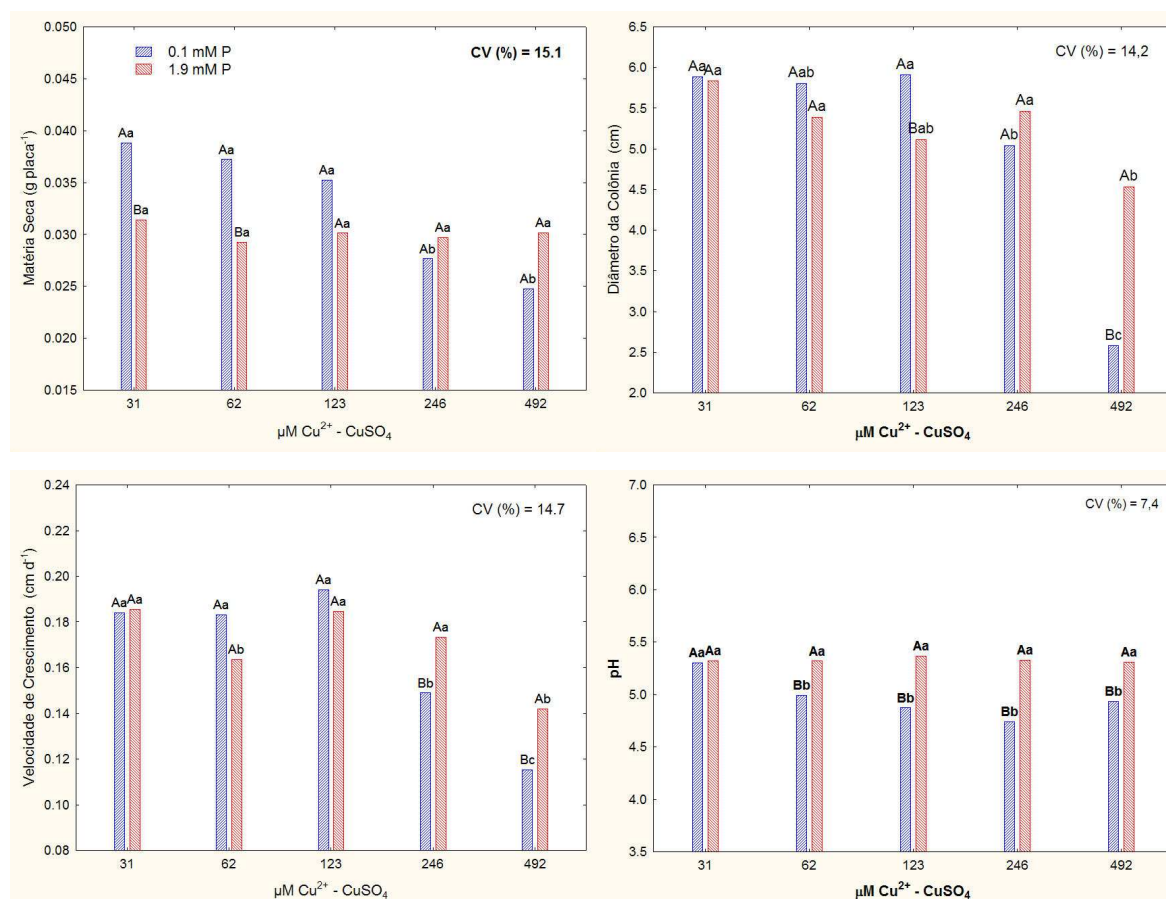


Figura 2. Efeito do cobre e sua interação com o fosfato na produção de matéria seca, diâmetro da colônia (30 d), velocidade de crescimento da colônia (cm d^{-1}) e no pH do meio MNM de cultura dos fungos ectomicorrízicos (*Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus* e *Suillus* sp.). Médias (12 repetições) seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam níveis de P dentro de cada nível de Cu e letras minúsculas níveis de Cu dentro de cada nível de P.

O diâmetro e a velocidade de crescimento das colônias dos FEM foram mais reduzidos no meio com concentrações acima de 123 μM Cu, indicando que estas variáveis, sobretudo o diâmetro das colônias, possuem maior sensibilidade na sinalização da toxicidade do cobre no cultivo em meio sólido. Medidas do crescimento radial e de massa seca apontaram diferenças quanto à sensibilidade inter e intraespecífica de FEM a metais pesados, em estudo realizado por Fomina et al. (2004), no qual dois isolados de *S. bovinus* tiveram o crescimento inibido por fosfatos de Cd, Cu e Pb adicionados ao meio, enquanto estímulo considerável foi observado em dois isolados de *Suillus luteus* pela adição de fosfato de Zn. Os FEM acidificaram o meio quando a concentração do P foi 0,1 mM (Fig. 2). O poder tampão do meio nos tratamentos com concentração 1,9 mM P (fonte $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) pode estar interferindo na detecção dessa tendência dos FEM em acidificar o meio conforme se aumenta o cobre.

Informações na literatura mostram que os fungos podem interagir com metais tóxicos e seus minerais em diferentes processos, dependendo da tolerância e capacidade em influenciar a solubilidade desses metais. Ao avaliar o crescimento e a habilidade das espécies ericóides e ectomicorrízicas em solubilizar compostos de metais tóxicos insolúveis, Fomina et al. (2004) verificaram que algumas culturas produziram zonas de solubilização bastante proeminentes no meio agar. Os autores observaram que o fato dependeu da estirpe fúngica e da natureza do composto insolúvel. A potencialidade solubilizadora de compostos insolúveis de metal dos fungos ericóides em meio sólido foi avaliada por Martino et al. (2003), os quais relataram que a solubilização foi vista pela formação de halo em torno das colônias. Fenômeno similar foi observado no presente trabalho, na cultura de *P. microcarpus* (Fig. 3). Apesar de não ter havido crescimento a partir do disco inóculo nas concentrações de Cu acima de 492 μM , nos dois níveis de P, *P. microcarpus* produziu halo translúcido aos 20 dias de cultivo nos tratamentos com níveis ≥ 1967 μM Cu (inclusive no de 7869 μM). Os halos

mostraram uma largura média de 11 e 7 mm, respectivamente, nos tratamentos com 0,1 e 1,9 mM de P. Isto pode indicar que a solubilização não está necessariamente relacionada à atividade de crescimento do fungo, já que os halos ocorreram em torno dos discos inóculo nas concentrações de Cu inibidoras de crescimento. Outros fatores, como a acidificação do meio, produzida por *P. microcarpus*, e as características intrínsecas do próprio fungo podem ter contribuído para a solubilização dos minerais. Dos 19 isolados de FEM avaliados por Fomina et al. (2004), apenas 10 dissolveram o fosfato de cobre, e um número bem menor (20-30%) solubilizou o fosfato cúprico e o de cádmio, mostrando que os isolados fúngicos apresentam diferença na habilidade para solubilizar minerais.



Figura 3. Aspecto geral da colônia de *Pisolithus microcarpus* (UFSC – Pt 116) crescida em meio Melin-Norkrans Modificado (MNM) (Marx, 1969) com formação de halo translúcido aos 20 dias de cultivo, nos tratamentos com níveis $\geq 1967 \mu\text{M}$ Cu e 1,9 mM P.

Também foram observadas alterações no diâmetro das colônias e no pH do meio (Fig. 4) em função da espécie de FEM cultivada e do nível de cobre. De modo geral, o crescimento das colônias (diâmetro) dos fungos foi mantido no mesmo nível, sendo afetado apenas no tratamento com a maior concentração de Cu. Por outro lado, *P. microcarpus* mostrou-se

menos sensível do que as demais espécies no tratamento com nível de 492 μM Cu. O gênero *Pisolithus* é conhecido pela sua larga distribuição mundial e ampla faixa de hospedeiros e tem sido bastante estudado pois associa-se a espécies arbóreas importantes e altamente dependentes da simbiose para sobreviver em solos pobres (Rossi et al., 2002; Aggangan et al., 1998). Em estudos realizados em Santa Catarina, *P. microcarpus* (UFSC – Pt 116) mostrou capacidade para crescimento em baixo pH, indicando adaptabilidade aos solos ácidos predominantes no país (Rossi et al., 2002). Vários isolados de *Pisolithus* têm revelado tolerância a altas temperaturas do solo, pH ácido, baixos níveis de P, seca e excesso de metais pesados (Aggangan et al., 1998). Graziotti et al. (2001a) verificaram que o crescimento de *P. tinctorius* (Pt-306) foi estimulado com a adição de até 510 μM Cu. Tam (1995) observou resposta positiva de um isolado de *P. tinctorius* em MNM com adição de 1600 μM de Cu.

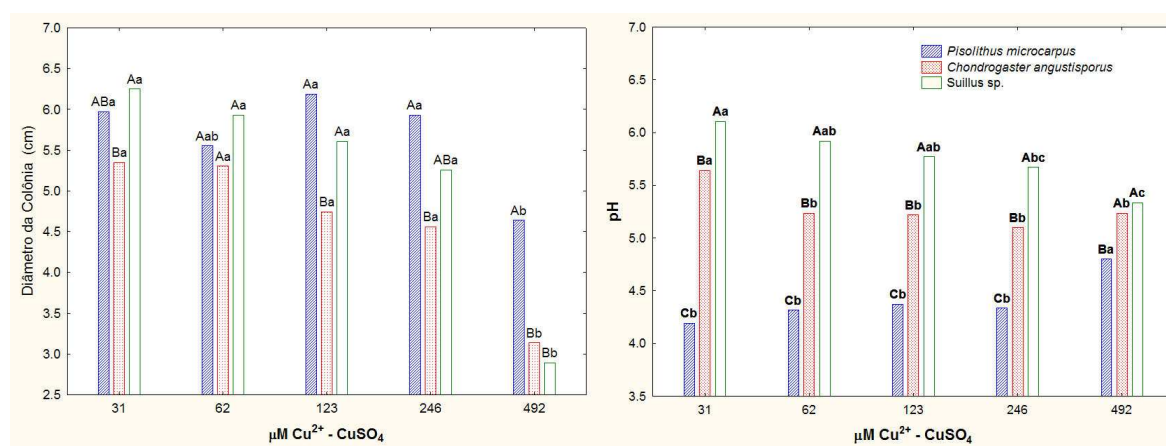


Figura 4. Efeito do cobre e sua interação com os fungos ectomicorrízicos (*Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus* e *Suillus sp.*) no diâmetro da colônia (30 d) e no pH do meio MNM de cultura. Médias (8 repetições) seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam fungos na mesma concentração de Cu e letras minúsculas comparam o mesmo fungo nas diversas concentrações de Cu.

O crescimento de *Pisolithus microcarpus* contribuiu para tornar o pH do meio MNM mais ácido (de 5,8 para 4,3), exceto no tratamento com o maior nível de cobre (Fig. 4). Em contraste, *C. angustisporus* e *Suillus sp.* não alteraram o pH do meio de forma significativa,

quando cultivados com 31 μM Cu. Contudo, nos tratamentos com níveis ≥ 62 μM Cu, ambos apresentaram tendência para acidificar o meio MNM, o que foi mais evidenciado nas culturas de *C. angustisporus*. Nas culturas de *Suillus* sp., o pH decresceu de modo menos acentuado. Essa diferença entre *C. angustisporus* e *Suillus* sp. não foi observada no tratamento com 492 μM Cu. *Pisolithus microcarpus* (UFSC – Pt 116) teve crescimento micelial superficial no meio sólido, enquanto os isolados de *C. angustisporus* e *Suillus* sp. tiveram crescimento micelial subsuperficial. É possível que esse hábito de crescimento dote o isolado *P. microcarpus* UFSC – Pt 116 de vantagens que conferem aparente resistência a níveis elevados de Cu em meio sólido. Isso poderia explicar as medidas do diâmetro das colônias e a capacidade de alterar o pH do meio nos tratamentos com 492 μM Cu.

Foram detectadas diferenças entre as espécies de FEM associadas à área do meio sólido amostrado (área de crescimento e em torno da colônia), considerando o pH do meio (Fig. 5). Em torno da colônia, o pH do meio foi significativamente menor do que o da área de crescimento nos três fungos estudados. A biodisponibilidade e, conseqüentemente, a fungitoxicidade dos metais pesados são afetados pelo pH do meio. Gibson & Mitchel (2005a) observaram que o índice de tolerância (avaliado a partir da matéria seca) de micobiontes ericóides diminuiu significativamente com o aumento do pH (de 2 para 6) no meio líquido Rorinson suplementado com Cu e Zn (250 e 2000 μM , respectivamente). Segundo os autores, todos os isolados testados mostraram baixo ou insignificante índice de tolerância aos metais em pH 6. Neste experimento com MNM, *P. microcarpus* apresentou maior capacidade acidificante (pH $\approx$ 4,4) e de crescimento micelial que os demais fungos testados. Martino et al. (2003) constataram que culturas de fungos micorrízicos ericóides acidificaram o meio líquido Czapeck sob a área de crescimento das colônias e na área do halo (área de solubilização), não havendo porém, correlação significativa entre o grau de acidificação do meio e a habilidade de solubilização dos fosfatos pelos fungos.

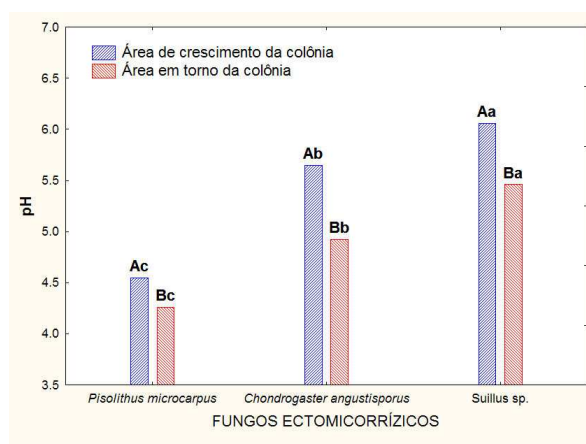


Figura 5. Efeito dos fungos ectomicorrízicos (*Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus* e *Suillus* sp.) e sua interação com a área do meio da cultura no pH do meio MNM. Médias (20 repetições) seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas comparam, respectivamente, dentro e entre as espécies fúngicas.

Correlações lineares positivas ($P \leq 0,01$) foram detectadas entre a produção de matéria seca micelial e a velocidade de crescimento das colônias de *Suillus* sp. ($r = 0,65^{**}$) e *P. microcarpus* ($r = 0,60^{**}$) (Fig. 6). O isolado de *Suillus* sp. apresentou maior aumento de matéria seca das colônias que *P. microcarpus*, o que indica superioridade na produção de biomassa micelial na maioria dos tratamentos avaliados.

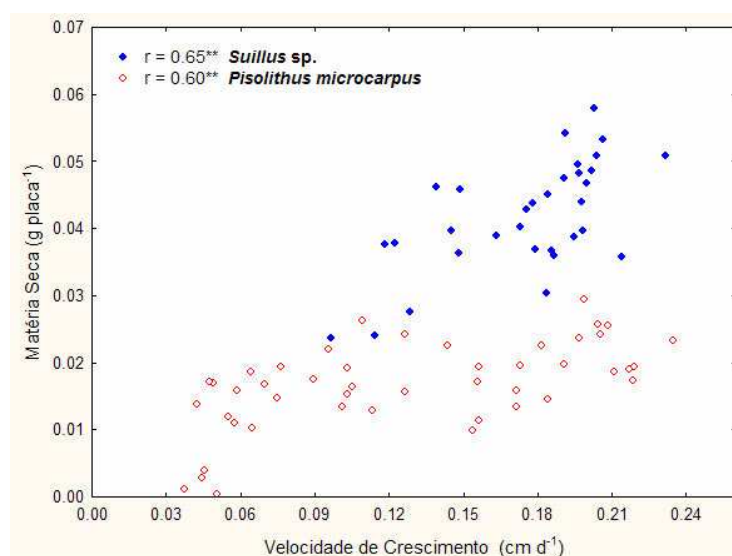


Figura 6. Relação entre a velocidade de crescimento das colônias e a produção de matéria seca micelial de *Suillus sp.* e *Pisolithus microcarpus* cultivados em meio sólido MNM com níveis crescentes de Cu (31 a 492 μ M) e de fosfato (0,1 a 1,9 mM).

Em meio MNM líquido, o crescimento micelial (30 dias) de *Suillus sp.* foi fortemente inibido (38%) pela maior concentração de P (Tab. 2), enquanto na menor concentração houve acidificação significativa (pH 3,2) do meio. Maior toxicidade do Cu foi observada (Tab. 3) no cultivo em meio líquido do que no experimento com meio sólido (Fig. 2). Houve redução de 40% na produção de matéria fresca micelial quando a concentração de Cu aumentou de 31 (0,97 g 50 mL⁻¹) para 123 μ M (0,58 g 50 mL⁻¹). Fan-Xiang (1995) avaliou a influência de várias concentrações de Cu (0 a 400 μ M) sobre o crescimento micelial de *Amanita muscaria*, em meio líquido MNM, observando que o fungo foi altamente inibido no tratamento com o maior nível de Cu. De acordo com Hartley et al. (1997a), a biomassa fúngica produzida em meio líquido propicia melhor avaliação, independente do indicado no meio sólido. O meio líquido pode não simular o ambiente no solo, mas para os estudos “*in vitro*” de toxicidade parece ser mais indicado que o meio sólido. Ao contrário do observado no cultivo em meio sólido, *Suillus sp.* acidificou o meio líquido a medida que diminuía a concentração do Cu, de 246 (pH 4,7) para 123 μ M (pH 3,6). Essa redução do pH pode estar relacionada à maior massa fresca produzida pelo FEM nos menores níveis de cobre.

Tabela 2. Efeito do fosfato no crescimento micelial de *Suillus* sp. e pH do meio MNM, aos 40 dias de cultivo

Nível de P mM	Massa Micelial g 50 mL ⁻¹	pH
0,1	0,789 a	3,24 b
1,9	0,495 b	4,34 a
CV (%)	38,9	17,0

Médias (12 repetições) com a mesma letra na coluna não diferem pelo teste de F ($P < 0.05$).

Tabela 3. Efeito do cobre na produção de massa micelial, no pH do meio MNM de cultura e na atividade das fosfatases ácida e alcalina de *Suillus* sp. aos 40 dias de cultivo

Tratamento	Massa Micelial g 50 mL ⁻¹	pH	Fosfatase	
			Ácida	Alcalina
μM Cu			μM <i>p</i> -Nitrofenol min ⁻¹	
31	0,971 a	3,30 b	6,57 b	0,72 b
123	0,581 b	3,57 b	9,25 a	1,16 a
246	0,263 b	4,67 a	8,45 ab	0,91 ab
CV (%)	38,9	17,0	29,4	25,4

Médias (8 repetições) com a mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

De modo geral, a fosfatase ácida (FAC) mostrou atividade 8-9 vezes maior em relação a fosfatase alcalina (FAI) (Tab. 3). A FAC é importante na decomposição do fosfato orgânico, contribuindo significativamente para a disponibilização do P para as plantas (Huang & Shindo, 2000; Fan-Xiang, 1995). No presente trabalho, as atividades das fosfatases (FAC e FAI) foram significativamente aumentadas, com a elevação da concentração de Cu, de 31 para 123 μM. Esse aumento foi na ordem de 41% (6,6 para 9,2 μM *p*-Nitrofenol min⁻¹) e 61% (0,7 para 1,2 μM *p*-Nitrofenol min⁻¹), respectivamente, para a FAC e FAI. Entretanto, houve redução não significativa da atividade dessas enzimas quando a concentração de Cu aumentou para 246 μM. Aumento na atividade de algumas enzimas parece estar associado ao aumento das concentrações de vários metais. Raman et al. (2002) verificaram que *L. laccata*

apresentou maior aumento na atividade das FAl e FAc do que *S. bovinus* e que as atividades máximas dessas enzimas foram obtidas, respectivamente, nas concentrações de 600 e 900 μM Cr. Reddy et al. (2002) observaram que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Al induziram aumento da atividade da FAc em *Pisolithus* sp. e *Cantharellus cibarius*, e sugeriram que essa enzima está envolvida na detoxificação de concentração deletéria do metal.

As respostas das atividades das fosfatases, tanto da fração intracelular quanto da extracelular da cultura do *Suillus* sp. diferiram em função do nível de P no meio líquido MNM (Fig. 7). Para FAc, a fração intracelular ($\approx 14 \mu\text{M } p\text{-Nitrofenol min}^{-1}$) resultou numa atividade significativamente maior ($7\times$) que a fração extracelular ($\approx 2 \mu\text{M } p\text{-Nitrofenol min}^{-1}$). O aumento da concentração de P diminuiu significativamente a atividade da FAc intracelular de 16 para 12 $\mu\text{M } p\text{-Nitrofenol min}^{-1}$. Com a FAc extracelular não foi detectada alteração. Na cultura de *Suillus* sp. com 0,1 mM P, a atividade da FAl na fração extracelular ($\approx 1,2 \mu\text{M } p\text{-Nitrofenol}\cdot\text{min}^{-1}$) foi significativamente superior à atividade na fração intracelular ($\approx 0,85 \mu\text{M } p\text{-Nitrofenol}\cdot\text{min}^{-1}$). Na cultura com 1,9 mM P, a atividade da FAl da fração extracelular foi significativamente menor que a registrada na fração intracelular ($\approx 0,7$ e $0,97 \mu\text{M } p\text{-Nitrofenol}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente). Por outro lado, o aumento da concentração de P diminuiu significativamente (42%) a atividade da FAl extracelular.

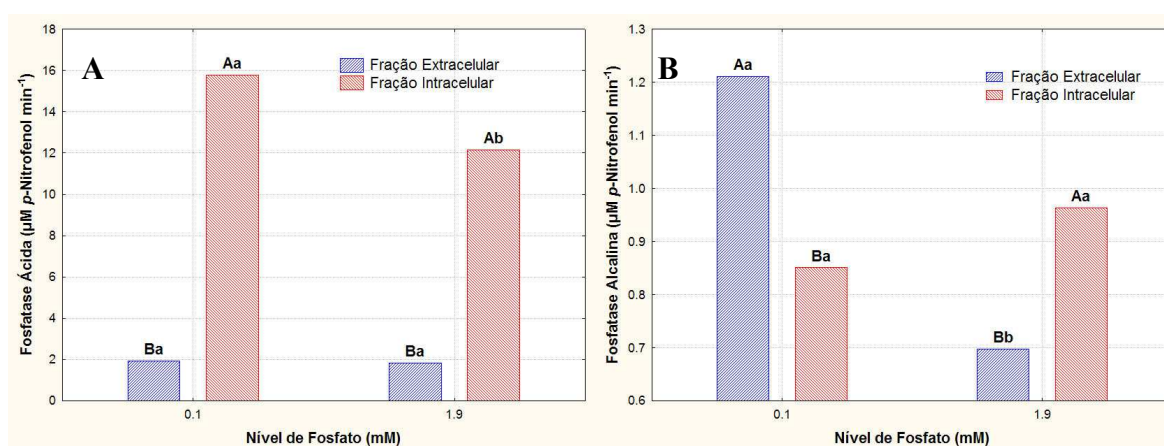


Figura 7. Efeito do fosfato na atividade das fosfatases ácida (A) e alcalina (B) na fração intracelular e extracelular da cultura de *Suillus* sp., aos 40 dias de cultivo. Médias (12 repetições) seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas comparam, respectivamente, dentro e entre os níveis de fosfato.

Estudos sugerem que as fosfatases têm importância na tolerância de fungos ectomicorrízicos e ericóides aos metais pesados. A atividade de fosfomonoesterase (PMEase) extra e intracelular produzida por *Pisolithus arrhizus* aumentou em tratamento com resíduos industriais contendo Pb, Cd, Cu e Zn (Turnau & Dexheimer, 1995). Segundo os autores, esse aumento de atividade pode representar um mecanismo de barreira para íons metais (M^{2+}), no qual os íons HPO_4^{2-} , liberados a partir das fontes orgânicas pela ação da fosfatase, podem complexar com íons M^{2+} e formar compostos insolúveis ($MHPO_4$), detoxificando o ambiente. Gibson & Mitchell (2005b) verificaram que o aumento da concentração de Cu (0 - 5000 µM), em meio líquido Rorinson, teve pouco/nenhum efeito na FAc intracelular produzida por fungos micorrízicos ericóides (*Hymenoscyphus ericae*). Entretanto, no nível de 250 µM Cu, a atividade da PMEase da fração extracelular foi reduzida quando comparada à fração intracelular. Por outro lado, houve aumento da atividade extracelular da fosfodiesterase (PDEase). Gibson & Mitchell (2005b) afirmaram que a capacidade destes endófitos em

sintetizar PDEase em ambiente com concentrações de Cu restritivas pode disponibilizar o P a partir de substratos orgânicos contaminados com este metal.

Os dados da produção de matéria seca micelial ($y = 0,04 - 0,004x$; $r = -0,48^*$) em meio sólido permitem estimar, em geral, uma CI_{50} de 53 μM Cu para *P. microcarpus* e *Suillus* sp. Para *Suillus* sp. ($y = 0,05 - 0,006x$; $r = -0,92^*$) individualmente, a estimativa da CI_{50} resultou em 40 μM Cu. Entretanto, quando *Suillus* sp. foi cultivado em meio líquido, a produção de matéria fresca micelial ($y = 0,96 - 0,003x$; $r = -0,73^*$) revelou uma CI_{50} de 160 μM Cu. Diferente tolerância dos FEM a altas concentrações de Cu tem sido observada. Em meio MNM líquido, a CI_{50} de Cu para um isolado de *P. tinctorius* considerado tolerante foi de 3000 μM (Tam 1995). No mesmo meio, Grazzioti et al. (2001a) observaram CI_{50} de 1180 e 120 μM Cu, respectivamente, para isolados de *P. tinctorius* e de *S. bovinus*. No presente trabalho, as estimativas de CI_{50} indicam que *Suillus* sp. UFSC – Su 168 tolera níveis de Cu quatro vezes menores no meio sólido que no líquido, e neste último, a CI_{50} mostra-se próxima da mencionada por Grazzioti et al. (2001a). A diferença de comportamento observada no cultivo dos FEM em meio líquido e sólido sugere cautela na definição da CI_{50} nas condições “*in vitro*” e sua extrapolação para “*in situ*”. As diferenças, principalmente em termos de difusão e da quantidade de nutrientes existente nos meios MNM sólido (15 mL) e líquido (50 mL), podem justificar os diferentes CI_{50} encontrados.

Foi demonstrada a importância dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos estudados, na avaliação da fungitoxicidade do cobre sobre fungos ectomicorrízicos com potencial para uso em programas de revegetação. Os resultados indicam que elevadas concentrações de cobre (246 μM) exercem efeitos deletérios diferenciados sobre os fungos.

Referências bibliográficas

- Aggangan, N.S.; Dell, B.; Malajczuk, N. 1998. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Geoderma** **84**:15-27.
- Cervantes, C. & Gutierrez Corona, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **Fems Microbiology Review** **14**(2): 121-137.
- Fan-Xiang, K. 1995. Influence of copper, manganese and pH on the growth and several enzyme activities in mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Chemosphere** **30** (1):199-207.
- Fomina, M.; Alexander, I.J.; Hillier, S.; Gadd, G.M. 2004. Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi. **Geomicrobiology Journal** **21** (5):351-366.
- Galli, U.; Schüepp, H.; Brunold, C. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum** **92**:364-368.
- Giller, K.E.; Witter, E.; McGrath, S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. **Soil Biology and Biochemistry** **10**:1389-1414.
- Gibson, B.R. & Mitchell, D.T. 2005a. Influence of pH on copper and zinc sensitivity of ericoid mycobionts *in vitro*. **Mycorrhiza** **15**:231-234.

Gibson, B.R. & Mitchell, D.T. 2005b. Phosphatases of ericoid mycorrhizal fungi: kinetic properties and the effect of copper on activity. **Mycological Research** **109** (4):478-486.

Grazziotti, P.H.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.; Carvalho, D. 2001a. Efeito de ZN, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** **25**:831-837.

Grazziotti, P.H.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.; Carvalho, D. 2001b. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** **25**:839-848.

Hartley, J.; Cairney, J.W.G.; Meharg, A. A. 1997a. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? **Plant and Soil** **189**:303-319.

Hartley, J.; Cairney, J.W.G.; Sanders, F.E.; Meharg, A. A. 1997b. Toxic interactions of metal ions (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} and Sb^{3-}) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist** **137**:551-562.

Huang, Q. & Shindo, H. 2000. Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase. **Soil Biology and Biochemistry** **32**:1885-1892.

Kong, F.X.; Liu, Y.; HU, W.; Shen, P.P.; Zhou, C.L.; Wang, L.S. 2000. Biochemical responses of the mycorrhizae in *Pinus massoniana* to combined effects of Al, Ca and low pH. **Chemosphere** **40**:311-318.

Martino, E.; Perotto S.; Parsons R.; Gadd G.M. 2003. Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites. **Soil Biology & Biochemistry** **35**:133–141.

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

Pritsch, K.; Raidl, S.; Marksteiner, E.; Blaschke, H.; Agerer, R.; Schlöter, M.; Hartmann. 2004. A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. **Journal of Microbiological Methods** **58**: 233-241.

Raman, N.; Srinivasan,V.; Ravi, M. 2002. Effect of chromium on the axenic growth and phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi, *Laccaria laccata* and *Suillus bovinus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **68**:569-575.

Reddy, M.S.; Babita, K.; Gay, G.; Ramamurthy, V. 2002. Influence of aluminum on mineral nutrition of the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus* sp. and *Cantharellus cibarius*. **Water, Air and Soil Pollution** **135**:55-64.

Rossi, M.J.; Souza, J.A.R.; Oliveira. V.L. 2002. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology Biotechnology** **59**:175-181.

Smith, E.S. & Read, J.D. **Mycorrhizal symbiosis**. 2 ed. New York: Academic Press. 605 p., 1997.

Tam, P.C.F. 1995. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza** 5:181-187.

Turnau, K.; Dexheimer, J. 1995. Acid phosphatase activity in *Pisolithus arrhizus* mycelium treated with cadmium dust. **Mycorrhiza** 5: 205-211.

Turnau, K.; Przybylowicz, W.J.; Mesjasz-Przybylowicz, J. 2001. Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas – as revealed by micro-PIXE analysis. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research** 181:649-658.

Van Tichelen, K.K.; Vanstraelen, T.; Colpaert, J.V. 1999. Nutrient uptake by intact mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings: a diagnostic tool to detect copper toxicity. **Tree Physiology** 19:189-196.

Wilkins, D.A. 1991. The influence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 35:245-260.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais utilizadas, conclui-se que:

- Existem pelo menos 12 espécies de fungos micorrízicos arbusculares, que representam os gêneros *Archaeospora* (1), *Glomus* (6), *Gigaspora* (1), *Paraglomus* (2) e *Scutellospora* (2) na área de mineração de cobre no município de Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul.
- *Glomus* é o gênero predominante e *Paraglomus brasilianum* a espécie mais representativa, sendo encontrada nas áreas de rejeito, margem e cultivo de eucaliptos.
- As concentrações de cobre acima de 1967 μM são deletérias ao crescimento e à micorrização de *Trifolium pratense*.
- O trevo vermelho responde à adubação fosfatada, refletida pelo aumento na produção de matéria seca e acúmulo de nutrientes da planta.
- O fósforo inibe a colonização micorrízica, porém sob condições de estresse causado por excesso de cobre no substrato, estimula a micorrização de trevo vermelho.
- O uso concomitante de *Glomus etunicatum* e fósforo pode constituir alternativa em processos de recuperação de áreas impactadas por excesso de cobre.
- *Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus* e *Suillus* sp. diferem quanto à sensibilidade ao excesso de cobre em meio de cultivo MNM.
- Concentrações de cobre acima de 123 μM inibem o crescimento de *Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus* e *Suillus* sp. e maiores que 492 μM Cu tornam-se deletérias.
- Níveis acima de 246 μM Cu inibem o poder acidificante de *Pisolithus microcarpus*.
- Em comparação com os demais fungos testados, *Suillus* sp. é tolerante à toxidez do cobre.

- O fósforo inibe o crescimento de *Pisolithus microcarpus*, *Chondrogaster angustisporus* e *Suillus* sp., entretanto atenua o efeito tóxico do cobre no crescimento destes fungos.
- O meio MNM líquido parece ser mais indicado para o cultivo de *Suillus* sp. do que o meio contendo agar, sobretudo em testes de toxicidade com cobre.
- O aumento da concentração de cobre no meio estimula a atividade das fosfatases ácida e alcalina, sugerindo um mecanismo de detoxificação de *Suillus* sp. ao excesso do cobre.

Os resultados confirmam que elevadas concentrações de cobre são tóxicas a certos fungos micorrízicos, e à associação formada com as plantas hospedeiras. Possíveis interações com fosfato estão envolvidas nos diferentes mecanismos de sobrevivência e tolerância destes organismos, reduzindo a disponibilidade do cobre para as plantas e para os próprios fungos.

Estudos em campo e que utilizem fungos micorrízicos arbusculares e/ou ectomicorrízicos eficientes, associados a plantas selecionadas, são necessários para garantir o estabelecimento de espécies vegetais nativas ou introduzidas que participam no processo de sucessão vegetal em programas de recuperação de áreas degradadas pela atividade mineradora.

Anexos

NORMAS GERAIS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS NA ACTA BOTANICA BRASILICA

1. A Acta Botanica Brasilica (Acta bot. bras.) publica artigos originais em Português, Espanhol e Inglês.

2. Os artigos devem ser concisos, em **quatro vias, com até 25 laudas**, seqüencialmente numeradas, incluindo ilustrações e tabelas (usar fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço entre linhas 1,5; imprimir em papel tamanho A4, margens ajustadas em 1,5 cm). A critério da Comissão Editorial, mediante entendimentos prévios, artigos mais extensos poderão ser aceitos, sendo o excedente custeado pelo(s) autor(es).

3. Palavras em latim no título ou no texto, como por exemplo: in vivo, in vitro, in loco, et al. devem estar em itálico.

4. O título deve ser escrito em caixa alta e baixa, centralizado, e deve ser citado da mesma maneira no Resumo e Abstract da mesma maneira que o título do trabalho. Se no título houver nome específico, este deve vir acompanhado dos nomes dos autores do táxon, assim como do grupo taxonômico do material tratado (ex.: Gesneriaceae, Hepaticae, etc.).

5. O(s) nome(s) do(s) autor(es) deve(m) ser escrito(s) em caixa alta e baixa, todos em seguida, com números sobrescritos que indicarão, em rodapé, a filiação Institucional e/ou fonte financiadora do trabalho (bolsas, auxílios etc.). Créditos de financiamentos devem vir em **Agradecimentos**, assim como vinculações do artigo a programas de pesquisa mais amplos, e não no rodapé. Autores devem fornecer os endereços completos, evitando abreviações, elegendo apenas um deles como Autor para correspondência. Se desejarem, todos os autores poderão fornecer e-mail.

6. A estrutura do trabalho deve, sempre que possível, obedecer à seguinte seqüência: - **RESUMO** e **ABSTRACT** (em caixa alta e negrito) – texto corrido, sem referências bibliográficas, em um único parágrafo e com cerca de 200 palavras. Deve ser precedido pelo título do artigo em Português, entre parênteses. Ao final do resumo, citar até cinco palavras-chave à escolha do autor, em ordem de importância. A mesma regra se aplica ao Abstract em Inglês ou Resumen em Espanhol.

- **Introdução** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter uma visão clara e concisa de: a) conhecimentos atuais no campo específico do assunto tratado; b) problemas científicos que levou(aram) o(s) autor(es) a desenvolver o trabalho; c) objetivos. - **Material e métodos** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter descrições breves, suficientes à repetição do trabalho; técnicas já publicadas devem ser apenas citadas e não descritas.

Indicar o nome da(s) espécie(s) completo, inclusive com o autor. Mapas - podem ser incluídos se forem de extrema relevância e devem apresentar qualidade adequada para impressão. Todo e qualquer comentário de um procedimento utilizado para a análise de dados em **Resultados** deve, obrigatoriamente, estar descrito no item **Material e métodos**.

- **Resultados e discussão** (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): podem conter tabelas e figuras (gráficos, fotografias, desenhos, mapas e pranchas) estritamente necessárias à compreensão do texto. Dependendo da estrutura do trabalho, resultados e discussão poderão ser apresentados em um mesmo item ou em itens separados. As figuras devem ser todas numeradas seqüencialmente, com algarismos arábicos, colocados no lado inferior direito; as escalas, sempre que possível, devem se situar à esquerda da figura. As tabelas devem ser seqüencialmente numeradas, em arábico com numeração independente das figuras. Tanto as figuras como as tabelas devem ser apresentadas em folhas separadas (uma para cada figura e/ou tabela) ao final do texto (originais e 3 cópias). Para garantir a boa qualidade de impressão, as figuras não devem ultrapassar duas vezes a área útil da revista que é de 17,5K23,5 cm.

Tabelas - Nomes das espécies dos táxons devem ser mencionados acompanhados dos respectivos autores. Devem constar na legenda informações da área de estudo ou do grupo taxonômico. Itens da tabela, que estejam abreviados, devem ter suas explicações na legenda. As ilustrações devem respeitar a área útil da revista, devendo ser inseridas em coluna simples ou dupla, sem prejuízo da qualidade gráfica. Devem ser apresentadas em tinta nanquim, sobre papel vegetal ou cartolina ou em versão eletrônica, gravadas em .TIF, com resolução de pelo menos 300 dpi (ideal em 600 dpi). Para pranchas ou fotografias - usar números arábicos, do lado direito das figuras ou fotos. Para gráficos – usar letras maiúsculas do lado direito. As fotografias devem estar em papel brilhante e em branco e preto. **Fotografias coloridas poderão ser aceitas a critério da Comissão Editorial, que deverá ser previamente consultada, e se o(s) autor(es) arcar(em) com os custos de impressão.** As figuras e as tabelas devem ser referidas no texto em caixa alta e baixa, de forma abreviada e sem plural (Fig. e Tab.). Todas as figuras e tabelas apresentadas devem, obrigatoriamente, ter chamada no texto. Legendas de pranchas necessitam conter nomes dos táxons com respectivos autores. Todos os nomes dos gêneros

precisam estar por extenso nas figuras e tabelas. Gráficos - enviar os arquivos em Excel. Se não estiverem em Excel, enviar cópia em papel, com boa qualidade, para reprodução. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, devem ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Usar unidades de medida de modo abreviado (Ex.: 11 cm; 2,4 µm), o número separado da unidade, com exceção de percentagem (Ex.: 90%). Escrever por extenso os números de um a dez (não os maiores), a menos que seja medida. Ex.: quatro árvores; 6,0 mm; 1,0-4,0 mm; 125 exsiccatas. Em trabalhos taxonômicos o material botânico examinado deve ser selecionado de maneira a citarem-se apenas aqueles representativos do táxon em questão e na seguinte ordem: **PAÍS. Estado:** Município, data, fenologia, coletor(es) número do(s) coletor(es) (sigla do Herbário). Ex.: **BRASIL. São Paulo:** Santo André, 3/XI/1997, fl. fr., Milanez 435 (SP). No caso de mais de três coletores, citar o primeiro seguido de et al. Ex.: Silva et al. (atentar para o que deve ser grafado em CAIXA ALTA, Caixa Alta e Baixa, caixa baixa, **negrito**, *itálico*). Chaves de identificação devem ser, preferencialmente, indentadas. Nomes de autores de táxons não devem aparecer. Os táxons da chave, se tratados no texto, devem ser numerados seguindo a ordem alfabética. Ex.:

1. Plantas terrestres
2. Folhas orbiculares, mais de 10 cm diâm.
.....2. **S. orbicularis**
2. Folhas sagitadas, menos de 8 cm compr.
.....4. **S. sagittalis**
1. Plantas aquáticas
3. Flores brancas
.....1. **S. albicans**
3. Flores vermelhas
.....3. **S. purpurea**

O tratamento taxonômico no texto deve reservar o *itálico* e o **negrito** simultâneos apenas para os nomes de táxons válidos. Basiônimo e sinonímia aparecem apenas em *itálico*. Autores de nomes científicos devem ser citados de forma abreviada, de acordo com índice taxonômico do grupo em pauta (Brummit & Powell 1992 para Fanerógamas). Ex.: **1. Sepulveda albicans** L., Sp. pl. 2: 25. 1753. Pertencia albicans Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870. Fig. 1-12. Subdivisões dentro de Material e métodos ou de Resultados e/ou discussão devem ser escritas em caixa alta e baixa, seguida de um traço e o texto segue a mesma linha. Ex.: Área de estudo - localiza-se ...
Resultados e discussão devem estar incluídos em conclusões.

- **Agradecimentos** (em caixa alta e baixa, **negrito**, deslocado para a esquerda): devem ser sucintos; nomes de pessoas e Instituições devem ser por extenso, explicitando o porquê dos agradecimentos.

- **Referências bibliográficas**

- Ao longo do texto: seguir esquema autor, data. Ex.:

Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva et al. (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997). - Ao final do artigo: em caixa alta e baixa, deslocado para a esquerda; seguir ordem alfabética e cronológica de autor(es); **nomes dos periódicos e títulos de livros devem ser grafados por extenso e em negrito**. Exemplos:

Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em Juncaceae. Pp. 5-22. In: **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica**. Aracaju 1992. São Paulo, HUCITEC Ed. v.I.

Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. Amaranthaceae. **Hoehnea** 33(2): 38-45.

Silva, A. & Santos, J. 1997. Rubiaceae. Pp. 27-55. In: F.C. Hoehne (ed.). **Flora Brasílica**. São Paulo, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

Para maiores detalhes consulte os últimos fascículos rescentes da Revista, ou os links da mesma na internet: www.botanica.org.br, ou ainda artigos on line por intermédio de www.scielo.br/abb. Não serão aceitas Referências bibliográficas de monografias de conclusão de curso de graduação, de citações de **simples** resumos simples de Congressos, Simpósios, Workshops e assemelhados. Citações de Dissertações e **Teses devem ser evitadas ao máximo; se necessário, citar no corpo do texto**. Ex.: J. Santos, dados não publicados ou J. Santos, comunicação pessoal