

**RETENÇÃO DE METAIS PESADOS EM
TECIDOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES *IN VITRO***

LUCÉLIA CABRAL

2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Cabral, Lucélia

Retenção de metais pesados em tecidos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro* / Lucélia Cabral. -- Lavras : UFLA, 2008.

33 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: José Oswaldo Siqueira.

Bibliografia.

1. Fungos do solo. 2. Cultura monoxênica. 3. Bioissorção. 4. Poluição do solo.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

LUCÉLIA CABRAL

**RETENÇÃO DE METAIS PESADOS EM TECIDOS DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. PhD. José Oswaldo Siqueira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

LUCÉLIA CABRAL

**RETENÇÃO DE METAIS PESADOS EM TECIDOS DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência do
Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto UFLA

Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares UFLA

Profa. Dra .Fátima Maria de Souza Moreira UFLA

Prof. PhD. José Oswaldo Siqueira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A minha família,

OFEREÇO

Aos meus pais, Pedra e Laurides, pelo apoio incondicional.
As minhas irmãs, Lucia e Luciana e suas famílias, pelo carinho.
Aos meus amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada amanhecer.

Aos meus pais, pela força e exemplo de vida e pela confiança depositada em mim.

As minhas queridas irmãs Lucia e Luciana, pelo apoio e motivação.

Aos meus sobrinhos, João Marcos, Juliana, Ana Lucia e Gabriel, por alegrarem mais a vida e pelo carinho.

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Solos, pela oportunidade da realização do mestrado.

À Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Osmar Klauberg Filho e Júlio César Pires, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), pela iniciação na atividade científica.

Ao professor José Oswaldo Siqueira, pela orientação e conhecimentos transmitidos para o meu crescimento profissional.

Ao professor Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto e ao Dr. Cláudio Roberto Fonseca Soares, pela orientação, amizade, apoio e incentivo à realização deste trabalho,

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo, pelos ensinamentos teóricos e práticos transmitidos ao longo de todo o curso.

Aos colegas Laboratório de Microbiologia do Solo, pela convivência e, em especial, aos laboratoristas Manoel e Marlene, pela amizade e apoio na realização das análises.

Aos colegas Laboratório de Cultura, pela receptividade e amizade, e ao laboratorista Evaldo, pela amizade e auxílio nas atividades realizadas.

Aos demais funcionários do Departamento de Ciência do Solo.

Aos amigos e demais colegas do Departamento de Ciência do Solo, pela amizade e companheirismo.

Ao casal de amigos Ana Luiza e Deynhe, do Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas do Departamento de Biologia, pela grande amizade e ótima convivência.

Aos grandes amigos de Santa Catarina que, mesmo de longe, sempre enviaram seu apoio, pois amigos de verdade não se separam, apenas seguem caminhos diferentes.

Aos demais colegas e amigos dos Departamentos: Fitotecnia, Fitopatologia, Biologia e Microbiologia Agrícola, pelo companheirismo e amizade.

A todos os amigos que fiz em Lavras,

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, bem como para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Metais pesados.....	3
2.2.Capacidade de retenção de metais pesados pelos FMAs.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5. CONCLUSÕES.....	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

CABRAL, Lucélia. **Retenção de metais pesados em tecidos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro***. 2008. 33p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A contaminação do solo por metais pode interferir no funcionamento normal das plantas e da biota do solo. A revegetação de áreas contaminadas é um processo difícil e, por isso, uma atenção especial vem sendo dada aos microrganismos do solo, que podem favorecer a fitorremediação nestes ambientes, destacando-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Tem sido sugerido que a imobilização dos metais no micélio constitui o provável mecanismo de proteção das micorrizas às plantas, mas os mecanismos envolvidos ainda não são bem conhecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de retenção de metais pesados em tecidos de FMAs crescidos *in vitro*. Tecido micelial de *Glomus clarum* e *Glomus FDS1* foi obtido por meio do cultivo de raízes transformadas por *Agrobacterium rizogenes*, enquanto *Gigaspora gigantea* foi obtido por meio da inoculação deste em plântulas de batata-doce *in vitro*. Para a realização dos ensaios de retenção, foram utilizadas soluções contendo Cu, Zn, Cd e Pb, na concentração de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, aplicados isoladamente ou em mistura, sendo os FMAs expostos por um período de 1, 3, 5, 15, 30, 45 e 120 minutos. Foi observado que a retenção de metais pesados em tecidos de FMAs é um processo rápido, sendo mais intensa nos 20 minutos iniciais de exposição. A velocidade de retenção de Cu para *G. clarum* foi elevada, atingindo valores da ordem de 595,7 $\mu\text{g de Cu g}^{-1}$ tecido fúngico/minuto, enquanto, para Zn, esta foi de 138 $\mu\text{g de Zn g}^{-1}$ tecido fúngico/minuto para *G. gigantea*. Independentemente dos isolados fúngicos testados, a velocidade de retenção decresce na seguinte ordem: Cu>Zn>>Cd>Pb. Dentre os isolados de FMAs testados, *G. clarum* apresentou maior capacidade máxima de retenção para Cu, Cd e Pb, atingindo valores da ordem de 3.259, 69 e 39 $\mu\text{g g}^{-1}$ tecido fúngico, respectivamente, enquanto para Zn foi *G. gigantea*, com capacidade máxima de retenção de 729 $\mu\text{g de Zn g}^{-1}$ tecido fúngico. Quando os metais foram aplicados simultaneamente em solução, verificou-se que a capacidade de retenção atingiu valores de menor magnitude, tendo, para *G. clarum* e *G. gigantea*, a retenção de Cu sido de 295 e 212 $\mu\text{g de Cu g}^{-1}$ tecido fúngico, enquanto que, para Zn, foi de 113 e 210 $\mu\text{g de Zn g}^{-1}$ tecido fúngico, respectivamente. Os resultados evidenciam a elevada capacidade de retenção de Cu e Zn pelos tecidos fúngicos de *G. clarum* e *G. gigantea*, sendo estes isolados promissores para futuros estudos em programas de fitorremediação.

* Orientador: José Oswaldo Siqueira – Universidade Federal de Lavras

Co-orientador: Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares – Universidade Federal de Lavras.

ABSTRACT

CABRAL, Lucélia. **Heavy metal retention in arbuscular mycorrhizal fungi *in vitro***. 2008. 33p. Dissertation (Master Program in Soil Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Soil contamination by metals can interfere with normal plant functioning as well as with soil biota. Revegetation of contaminated areas is usually a difficult task. As a result, a special interest has been directed towards the study of soil microorganisms that might favor phytoremediation in such contaminated soils, e.g., arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Metal immobilization in the mycelium has been suggested as the most probable protecting mechanism of mycorrhizae to plants, even though details on such protection mechanism are yet not well known. The purpose of this work was to evaluate the metal retention capacity of AMF tissues grown *in vitro*. *Glomus clarum* and *Glomus FDS1* fungal tissues were obtained via roots culture transformed by *Agrobacterium rizogenes* while *Gigaspora gigantea* was collected after its *in vitro* inoculation in sweet potato plantlets. Retention tests were performed with 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ solutions of Cu, Zn, Cd, and Pb applied either as a mono or multielementary system during different AMF exposure periods: 1, 3, 5, 15, 30, 45 and 120 minutes. Results revealed that metal retention by AMF fungal tissue is a fast process, with most of the retention occurring within the first 20 minutes of exposure. The retention rate of Cu for *G. clarum* was high, reaching 595.7 μg of Cu g^{-1} fungal tissue/minute. Zinc was retained at a rate of 138 μg of Zn g^{-1} fungal tissue/minute by *G. gigantea*. Regardless of the tested fungal isolates, the retention rate decreased in the following order: Cu>Zn>>Cd>Pb. *G. clarum* presented the highest retention capacity of Cu (3,259 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cd (69 $\mu\text{g g}^{-1}$), and Pb (39 $\mu\text{g g}^{-1}$) among all tested AMF. For Zn the maximum retention capacity was observed in *G. gigantea* (729 μg of Zn g^{-1} fungal tissue). Metal retention decreased in multielementary systems when compared with monoelementary ones, reaching 295 μg of Cu g^{-1} fungal tissue and 113 μg of Zn g^{-1} fungal tissue for *G. clarum* and 212 μg of Cu g^{-1} fungal tissue and 210 μg of Zn g^{-1} fungal tissue for *G. gigantea*. The high retention capacity of Cu and Zn by fungal tissues of *G. clarum* and *G. gigantea* suggests a promising use of those isolates in phytoremediation programs.

* Advisor: José Oswaldo Siqueira – Universidade Federal de Lavras

Co-advisor: Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares – Universidade Federal de Lavras.

1 INTRODUÇÃO

Devido à contaminação do solo por metais pesados e das suas conseqüentes interferências nas diversas formas de vida e no funcionamento dos ecossistemas, torna-se difícil a revegetação de áreas contaminadas. Por isso, há um grande interesse no papel dos microrganismos do solo na amenização da toxidez destes metais no ambiente. Microrganismos que se associam às plantas são de interesse especial na fitorremediação, em que se destacam os fungos que formam simbioses radiculares denominadas micorrizas arbusculares (MAs).

A introdução de fungos que formam este tipo de simbiose na tolerância das plantas a elementos tóxicos exerce efeito positivo, atuando como agentes de proteção das plantas (Soares & Siqueira, 2008) e também podem aumentar a extração dos metais pesados do solo, contribuindo para a reabilitação destas. Este processo é de grande interesse, visto que a maioria das plantas forma micorriza arbuscular, mesmo em condições de elevada contaminação por metais, em que podem ter ocorrência abundante (Klauber-Filho et al., 2005).

Embora haja suficiente evidência da contribuição das MAs para o crescimento das plantas em solos contaminados, os mecanismos envolvidos são ainda assuntos de pesquisa. Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar os efeitos dos FMAs na proteção das plantas, tais como: efeito de diluição dos metais nos tecidos vegetais em decorrência do favorecimento da maior produção de massa (Christie et al., 2004); exclusão da absorção por meio da precipitação ou quelação dos metais na rizosfera (Kaldorf et al., 1999) e redução da absorção pela planta devido à retenção e imobilização dos metais nas estruturas fúngicas (Zhu et al., 2001). Sabe-se que os efeitos das MAs no crescimento de plantas na presença de metais tóxicos são muito dependentes da espécie fúngica, mas a razão para o comportamento diferenciado ainda não foi elucidado. Contudo, a

capacidade diferenciada dos fungos de reter metais pode explicar sua ação protetora à planta.

A capacidade de retenção de metais pesados pelos FMAs pode ser diferenciada em função das características morfo-anatômicas do tecido fúngico. Espécies de FMAs pertencentes à família Gigasporaceae apresentam hifas mais espessas, com diâmetro acima de 20 μm , parede celular das hifas multilaminadas com 4-7 μm de espessura, sendo o diâmetro da última ramificação de 10-20 μm . Enquanto isso, os FMAs pertencentes à família Glomeraceae possuem tecido micelial mais fino, com diâmetro variando de 0,8-4,5 μm e parede celular da hifa com espessura $\leq 1,2$ μm (Beck et al., 2007). Essas características podem interferir no processo de retenção, assim como a quitina e os diferentes componentes da parede celular dos fungos (Zhou, 1999 e Kappor & Virarghavan, 1995)

A maioria dos estudos sobre a influência dos FMAs na retenção dos metais pesados é realizada em condições que utilizam solo e planta. Por esta razão, não é possível determinar o efeito real de proteção dos FMAs, pois estes componentes do sistema também interferem nessa retenção. Por isso, a avaliação da retenção de metais pesados em tecidos fúngicos limpos e separados da planta pode trazer grande contribuição no entendimento dos mecanismos envolvidos na proteção das plantas ao excesso de metais pesados.

No presente trabalho, avaliou-se a capacidade de retenção de metais pesados em tecidos de diferentes fungos micorrízicos arbusculares obtidos por cultura monoxênica, devido a dificuldades para estudar, em separado, o efeito da planta e do fungo, pois estes são biotróficos obrigatórios.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados

Os metais pesados são componentes naturais dos solos e rochas, onde normalmente ocorrem em baixas concentrações, não representando, nestas condições, risco ambiental. Porém, devido ao aumento de atividades de mineração e do intenso processo de industrialização e urbanização ocorrido nas últimas décadas em diversos países, a concentração de metais pesados no solo vem aumentando. Por isso, são necessários maiores estudos nessa área, visando à reabilitação de solos contaminados por estes elementos (Dudka et al., 1996). Além disso, outros fatores contribuem para a contaminação do solo por metais pesados, tais como: a crescente exploração mineral, o volume de resíduos gerados nos centros urbanos das grandes cidades, a ocorrência de acidentes ambientais que envolvem derramamento de produtos químicos e a aplicação de pesticidas, fertilizantes e lodos de esgoto em doses elevadas (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

O impacto do excesso dos metais pesados nos ecossistemas tem sido bastante discutido, mundialmente, dada à possibilidade da contaminação da cadeia alimentar animal e humana (Nogueira, 1996). No solo, a disponibilidade desses elementos às plantas, microrganismos e ambiente depende, principalmente, da presença destes na solução do solo, a qual é governada pela composição e pela reação do solo (Alleoni et al., 2005).

O excesso de metais pesados no solo pode interferir no funcionamento normal das plantas e da biota do solo (Burkhardt et al., 1993) e inibir uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos que afeta a produtividade e a sustentabilidade dos ecossistemas, além de induzir a danos, às vezes, irreversíveis do status biológico, químico e físico do solo (Haselwandter et al., 1994). Em áreas contaminadas, são comuns danos, tais como: perda da cobertura

vegetal, alteração na estrutura do solo, aumento da erosão, perda de nutrientes e de matéria orgânica (Ribeiro-Filho et al., 1999), também a diminuição da densidade de propágulos e da atividade da microbiota, fatores esses que agem como causa ou efeito da degradação do solo (Jeffries & Barea, 1994; Vangrosveld, 1996; Dias Júnior et al., 1998). Além disso, os metais pesados podem ser liberados para a solução do solo e lixiviados para o subsolo, atingindo o lençol freático e trazer sérias conseqüências ao homem, às plantas e aos animais.

Com essas evidências, têm se tornado necessários estudos sobre a relação microbiota-metals, para avaliar os impactos desses elementos sobre a comunidade microbiana do solo, visando à manutenção de processos essenciais ao ecossistema e à remediação de áreas contaminadas. Alguns estudos avaliaram o potencial dos microrganismos, tais como algas, bactérias e fungos, para a retenção de metais pesados no ambiente (Volesky & Holan 1995). Dentre os fungos do solo, encontram-se os fungos micorrízicos arbusculares (Leyval, et al., 1997).

2.2 Capacidade de retenção de metais pesados pelos FMAs

Os fungos micorrízicos arbusculares são fungos do filo Glomeromycota. Atualmente, são identificadas cerca de 168 espécies, conforme International culture collection of vesicular and arbuscular mycorrhizal fungi. species description (INVAM). Esses fungos formam associação simbiótica mutualística com raízes de, aproximadamente, 80% das espécies vegetais, simbiose denominada micorriza arbuscular. Esta simbiose foi adquirida ao longo do processo evolucionário para que esses fungos pudessem coexistir com outros seres vivos. Na associação micorrízica, o hospedeiro do fungo recebe carboidratos e outros fatores essenciais ao seu desenvolvimento e esporulação,

enquanto a planta recebe em troca, principalmente, nutrientes inorgânicos (Moreira & Siqueira, 2006).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de crescimento dos FMAs em altas concentrações de elementos tóxicos presentes no solo (Gildon & Tinker, 1983; Leyval et al., 1997; Weissenhorn et al., 1993). A inoculação desses fungos traz benefícios para o crescimento das plantas em solos contaminados com metais pesados, como verificado para o milho (Weissenhorn et al., 1995; Siqueira et al., 1999), as plantas herbáceas (Gildon & Tinker, 1983; Hetrick et al., 1994; Klauberg-Filho, 1999; Carneiro et al., 2001) e para espécies arbóreas (Grazziotti, 1999).

Os fungos micorrízicos podem desempenhar importante papel nos mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados, o que se reveste de extremo interesse, visto que a maioria das plantas forma associação micorrízica (Klauberg-Filho et al., 2005). Além disso, o efeito dos metais pesados ocorre principalmente no sistema radicular (Alloway, 1990; Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Soares et al., 2005). Apesar de os mecanismos de proteção dos FMAs não serem claros, duas hipóteses são propostas para o papel das micorrizas em programas de fitorremediação: 1) o aumento na fitoextração de metais pesados por meio da micorrizosfera (Davies et al., 2001, 2002; Díaz et al., 1996; Hovsepian & Greipsson, 2004) e 2) o aumento na tolerância de plantas a metais pesados via processos de retenção do metal no tecido fúngico (Audet & Charest, 2006; Chen et al., 2004; Joner et al., 2000; Weissenhorn et al., 1995).

Para Whitfield et al. (2004), a imobilização dos metais no micélio constitui o provável mecanismo de proteção das micorrizas às plantas, reduzindo a transferência do metal para a parte aérea da planta e, conseqüentemente, a fitotoxidez. Isto pode estar relacionado com a elevada capacidade de retenção de metais pesados nas estruturas dos FMAs (Joner et al., 2000). A capacidade de

retenção de metais pesados pelos FMAs pode ser diferenciada em função das características morfo-anatômicas do tecido fúngico, pois alguns estudos demonstram que existem diferenças entre as espécies de fungos (Beck et al., 2007).

Além dessas características, pode-se destacar, também, a capacidade do micélio extraradicular dos FMAs em reter seletivamente elementos tóxicos ou não tóxicos. Isto pode estar, também, relacionado à adsorção na quitina e os diferentes componentes da parede celular dos fungos, tais como grupos amino, hidroxílicos, carboxílicos, dentre outros, podem representar sítios de ligação para os metais (Zhou, 1999 e Kappor & Virarghavan, 1995), ou em glicoproteínas extracelulares (Wright & Upadhyaya, 1998) ou por meio da precipitação intracelular. Recentemente, González-Chavéz et al. (2004b) demonstraram que uma glicoproteína produzida pelas hifas dos FMAs, denominada glomalina, pode reter potencialmente elementos tóxicos, incluindo os metais pesados. Para Cu, ela pode reter 240 a 1.200 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ glomalina.

O conhecimento dos processos envolvidos na retenção de metais pesados pelos FMAs, seja por meio da diminuição da biodisponibilidade destes elementos nos sistemas biológicos ou pelo seu papel para a tolerância das plantas ao excesso de metais pesados no solo, pode contribuir para a aplicação desses microrganismos em programas de fitorremediação (Klauber-Filho et al., 2005). A maioria dos estudos sobre a influência dos FMAs na retenção dos metais pesados é realizada em condições que utilizam solo e planta e, por isso, o efeito real da retenção de metais nos FMAs pode ser alterado, pois estes componentes do sistema também interferem nessa retenção. Por isso, ao eliminar o efeito dessas variáveis, torna-se necessário o uso de técnicas que permitam o crescimento dos FMAs na ausência da planta hospedeira. Isso pode ser realizado por meio de cultura monoxênica ou axênica, com variações do meio de cultura e

técnica de suplementação em nutrientes e agentes estimulantes de crescimento (Siqueira, 1987).

Para estudos com cultura monoxênica, pode-se utilizar suspensão de células vegetais ou realizar o cultivo de raízes transformadas por *Agrobacterium rizogenes*, os quais permitem o crescimento micelial dos FMAs. Porém, além de reguladores de crescimento, os meios de cultivo devem suprir uma concentração de nutrientes adequada para uma correta expressão do metabolismo das culturas *in vitro* e do fungo, simultaneamente (Paula & Siqueira, 1990). A obtenção de micélio extra-radicular proveniente de cultura monoxênica se torna fundamental, pois se obtém, dessa forma, um material puro e bastante homogêneo. Isso possibilita um melhor acompanhamento do processo de retenção desses elementos tóxicos, pois a resposta a diferentes estímulos mostra-se complexa e de difícil interpretação. Além disso, elimina-se o efeito adsorvente do solo, que dificulta a compreensão dos mecanismos que interagem na retenção dos metais pesados pelas hifas dos FMAs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo constou de um experimento conduzido nos Laboratórios de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo (DCS) e no Laboratório de Cultura de Tecido do Departamento de Agricultura (DGA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde se avaliou a capacidade de retenção dos metais pesados Cu, Zn, Cd e Pb, aplicados isoladamente ou em mistura em tecidos de FMAs. As etapas de condução dos ensaios são ilustradas na Figura 1.

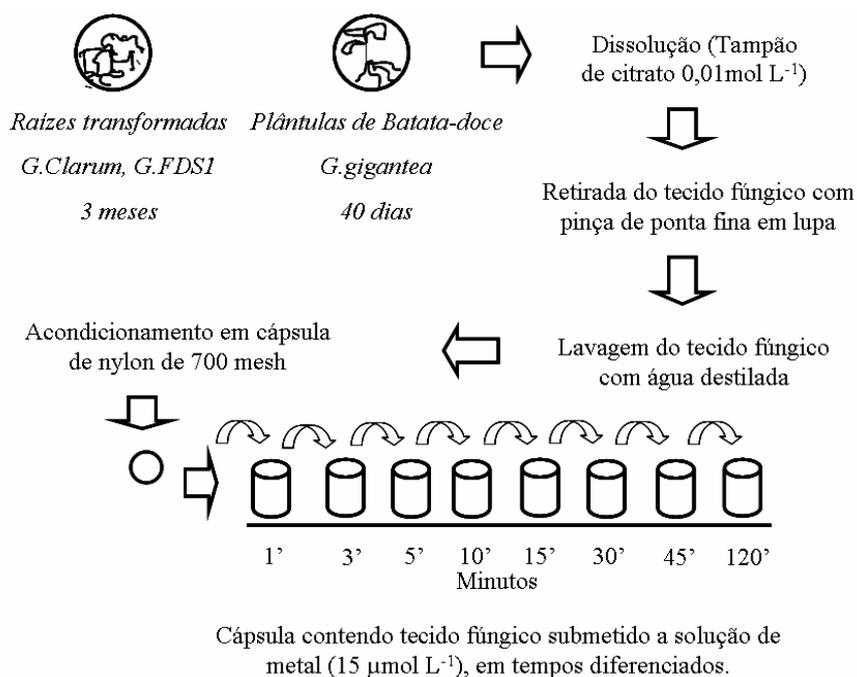


FIGURA 1. Ilustração das etapas de condução dos ensaios de retenção dos metais pesados em tecidos de fungos micorrízicos arbusculares.

Os tecidos fúngicos de *Glomus clarum* e *Glomus FDSI* foram obtidos por meio de cultura monoxênica, utilizando-se o cultivo de raízes transformadas por *Agrobacterium rizogenes* (Mugnier & Mosse, 1987; Declerck et al., 2005), gentilmente cedidas pelo pesquisador Dr. Francisco Adriano de Souza, da Embrapa Agrobiologia, as quais já se encontravam colonizadas por estes fungos. O fungo *Glomus clarum* foi isolado em uma área na Flórida (EUA), enquanto o *Glomus FDSI* foi isolado por pesquisadores da Embrapa, em uma área degradada com solo intensamente erodido em Barra do Piraí (RJ), os quais trabalham na descrição desta espécie. O meio utilizado para repicar as raízes transformadas foi o meio mínimo (MM), segundo metodologia descrita por Becárd & Fortin, (1988), solidificado com 0,3% de Fitigel. As placas com as raízes transformadas foram abertas e cortadas, com bisturi, em pequenos pedaços contendo meio e raiz de, aproximadamente, 1 cm² e transferidos para as placas contendo MM, vedadas com plástico filme e colocadas em BOD com temperatura constante de 25°C, na ausência de luz, onde permaneceram nestas condições por um período de por três meses.

Devido à dificuldade de crescimento micelial do fungo *Gigaspora gigantea* em cultura monoxênica, o qual foi isolado de área com pastagem em Lavras, MG, optou-se por realizar a inoculação deste em plântulas de batata-doce *in vitro*. Para isto, promoveu-se o crescimento de plântulas de batata-doce utilizando-se segmento nodal de 1,0 cm sem folhas, transferido para tubos de ensaio contendo, aproximadamente, 10 mL de meio MS (Murashige & Shoog, 1962), com pH ajustado para 5,7±0,1, em câmara aclimatizada com temperatura 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 1.500 lux. Após 30 dias de crescimento, as plântulas foram utilizadas para a montagem das placas contendo meio MS diluído 10 vezes e solidificado com 0,6% de Fitigel.

Para a inoculação, realizou-se a extração de esporos de vasos de cultivo de *Brachiaria decumbens* da coleção de FMAs do DCS-UFLA, seguindo

metodologia descrita por Gerdemann & Nicolson (1963). Os esporos foram selecionados e desinfetados conforme metodologia adaptada de Colozzi-Filho (1988), sendo inoculados, em média, 20 esporos de *Gigaspora gigantea* por planta. As placas foram vedadas, sendo as raízes cobertas com papel alumínio, de modo a evitar a exposição à luz e facilitar o crescimento micelial, armazenadas em câmara de crescimento aclimatizada, conforme descrito anteriormente, onde permaneceram por um período de 40 dias. Após o período de crescimento dos FMAs estudados, o tecido fúngico foi retirado das placas com auxílio de pinça de ponta fina, em microscópio estereoscópio.

Para a separação do tecido fúngico das raízes e dos meios MS e MM modificados, foi realizada a dissolução, em tampão de citrato de sódio, ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), conforme descrito por Cranenbrouck et al. (2005). Para a realização dos ensaios de retenção, foram retirados, aproximadamente, 0,030 g de tecido fúngico, os quais foram lavados em água destilada e acondicionados em cápsula de náilon de 700 mesh.

Os ensaios de retenção de metais foram conduzidos em copos plásticos, conforme descrito por Gonzalez-Chavez et al. (2004), aos quais adicionaram-se 20 mL de solução contendo $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu, Cd, Zn e Pb, aplicados isoladamente ou em mistura, sendo todos os metais aplicados na forma de sulfato. Estes ensaios foram realizados com 3 repetições, sendo o tecido fúngico exposto aos metais por períodos de 1, 3, 5, 15, 30, 45 e 120 minutos, e a solução renovada ao final de cada período. Para se obter o volume exato de solução utilizada no ensaio, foi realizada uma pesagem com os copos plásticos vazios, após a adição da solução e ao final do ensaio de retenção, procedimentos necessários para detectar variações no volume da solução durante o ensaio. Os ensaios de retenção foram realizados a baixas temperaturas (4°C), em agitador orbital a 120 rpm. Os extratos obtidos foram lidos em espectrofotômetro de absorção atômica, para a quantificação dos metais

Para uma melhor caracterização de parede de hifa e esporos dos fungos *G. clarum*, *G. FDSI* e *G. gigantea*, FMAs foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Departamento de Fitopatologia da UFLA. As amostras de micélio foram fixadas em solução Karnovisk's, lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,05M e com posterior imersão, por um período de 4 horas, em solução de tetróxido de ósmio 1% (OsO₄). Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada e submetidas a soluções de concentração crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma. Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico para completar a secagem e posterior disposição da amostra nos stubs, sendo coberto com ouro para a obtenção das imagens em microscópio eletrônico de varredura (Bossola & Russell, 1998; Alves, 2007). Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de significância das regressões (5%) por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000), sendo os intervalos de confiança calculados pelo programa SAS (SAS INSTITUTE, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de retenção em tecidos fúngicos de Cu, Zn, Cd e Pb, quando avaliados isoladamente, é muito diferenciada dentre os isolados de FMAs e os metais estudados (Figura 2). Independentemente dos isolados fúngicos e metais, observa-se que a taxa de retenção ajustou-se ao modelo linear neperiano. A partir dos coeficientes angulares das regressões, foi possível calcular as velocidades de retenção apresentadas na Figura 3, na qual as respectivas velocidades foram calculadas dividindo-se o coeficiente angular das regressões por um determinado tempo.

Pode-se analisar que a velocidade de retenção é bastante rápida nos primeiros 20 minutos, decrescendo com o tempo de contato entre o material fúngico e os metais (Figura 3). Dentre os metais testados, o Cu apresentou a maior velocidade máxima de retenção, atingindo valores da ordem de 595,7 μg de Cu g^{-1} tecido fúngico/minuto para *G. clarum*, enquanto que *G. FDSI* e *G. gigantea* obtiveram 138,1 e 189,3 μg de Cu g^{-1} tecido fúngico/minuto, respectivamente. Para Zn, observou-se que o fungo *G. gigantea* obteve a maior velocidade máxima entre os isolados estudados (138 μg de Zn g^{-1} tecido fúngico/minuto).

Para a velocidade máxima de retenção de Cd, os isolados *G. clarum* e *G. FDSI* obtiveram os maiores valores (em média, 11,4 μg de Cd g^{-1} tecido fúngico/minuto), enquanto que *G. gigantea* obteve apenas 4,7 μg de Cd g^{-1} tecido fúngico/minuto. A velocidade máxima de retenção de Pb foi a menor entre os metais estudados. O isolado *G. clarum* obteve a maior velocidade máxima de retenção, 7,1 μg de Pb g^{-1} tecido fúngico/minuto, entre os isolados

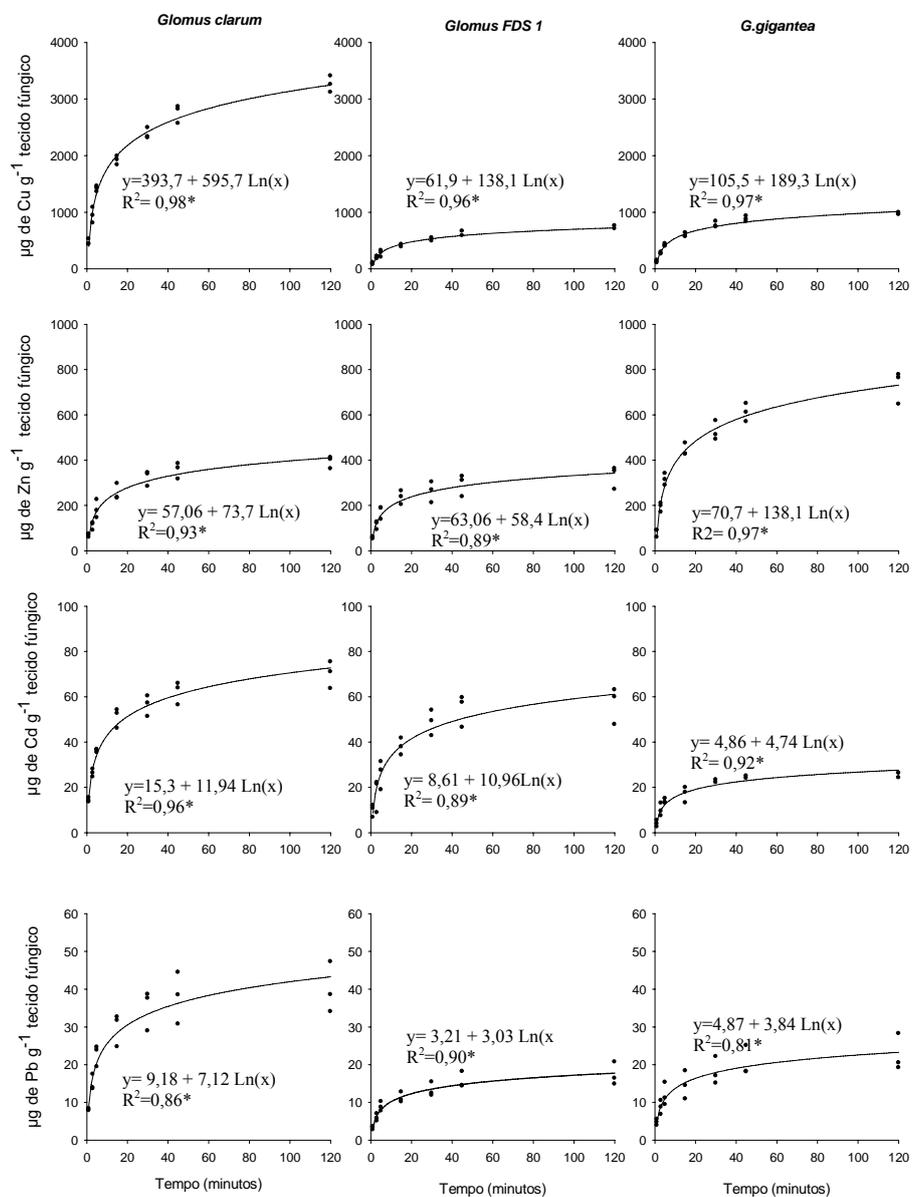


FIGURA 2. Taxa de retenção de Cu, Zn, Cd e Pb, testados isoladamente nos fungos *Glomus clarum*, *Glomus FDS1* e *Gigaspora gigantea* ($\mu\text{g g}^{-1}$ tecido fúngico).

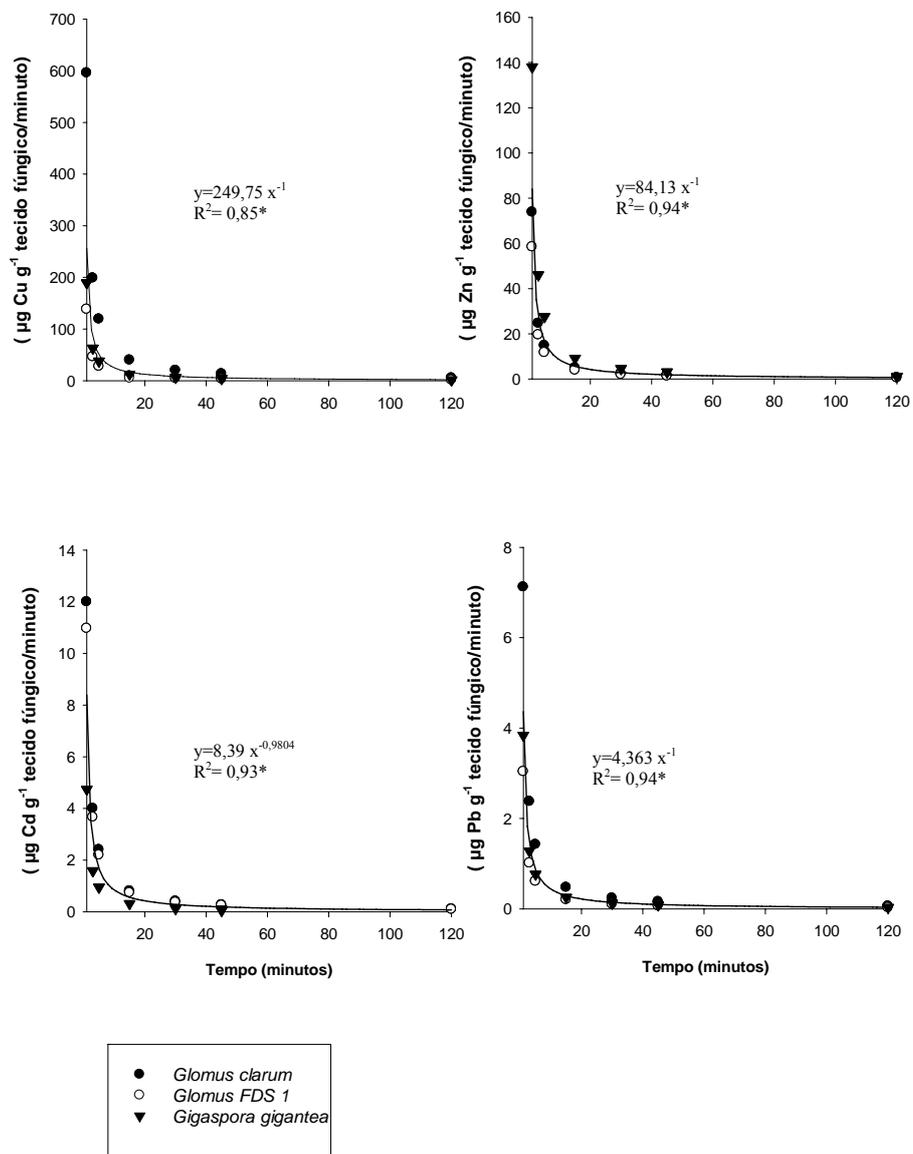


FIGURA 3. Velocidade média de retenção de Cu, Zn, Cd e Pb testados isoladamente nos fungos *Glomus clarum*, *Glomus FDS 1* e *Gigaspora gigantea* ($\mu\text{g g}^{-1}$ tecido fúngico/minuto).

estudados, enquanto que *G. FDSI* e *G. gigantea* obtiveram, em média, 3,4 μg de Cd g^{-1} tecido fúngico/minuto (Figura 3).

Para melhor visualização do comportamento diferenciado entre os isolados fúngicos e o efeito do tempo de exposição sobre a retenção de metais, estimou-se a velocidade de retenção no tempo de 15 minutos (Tabela 1). Neste tempo, verifica-se uma redução no processo de retenção, quando comparada aos tempos iniciais de exposição do tecido fúngico aos metais. Por exemplo, aos 15 minutos, a velocidade de retenção estimada de Cu , para o isolado *G. clarum*, foi de apenas 39,7 μg de Cu g^{-1} tecido fúngico/minuto entre os isolados testados, enquanto que a velocidade máxima para esse isolado foi de 595,74 μg de Cu g^{-1} tecido fúngico/minuto, no tempo de um minuto de exposição.

Para o Zn aos 15 minutos, a velocidade de retenção estimada foi de 9,2 μg de Zn g^{-1} tecido fúngico/minuto, para o isolado *G. gigantea*, seguido por *G. clarum* e *G. FDSI* (4,9 e 3,9 μg de Zn g^{-1} tecido fúngico/minuto, respectivamente). Estes valores são 93% inferiores aos observados no tempo de um minuto de exposição. Enquanto isso, verifica-se que Cd e Pb apresentaram baixas velocidades de retenção estimada aos 15 minutos, obtendo-se valores inferiores a 1,0 μg de metal g^{-1} tecido fúngico/minuto. Os resultados evidenciam que a capacidade de retenção dos metais em tecidos fúngicos ocorre nos primeiros 20 minutos de exposição e que, independentemente dos isolados fúngicos testados, a velocidade de retenção decresce na seguinte ordem: $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Pb}$ (Tabela 1).

TABELA 1. Velocidade de retenção estimada aos 15 minutos de exposição, para Cu, Zn, Cd e Pb, em tecido fúngico de *G. clarum*, *G.FDSI* e *G.gigantea*.

Fungos	Velocidade de retenção estimada ($\mu\text{g metal g}^{-1}$ tecido fúngico min^{-1})			
	Cu	Zn	Cd	Pb
<i>G. clarum</i>	39,7	4,9	0,8	0,5
<i>G. FDSI</i>	9,2	3,9	0,7	0,2
<i>G .gigantea</i>	12,6	9,2	0,3	0,3
Média isolados	20,5	6,0	0,6	0,3

A capacidade máxima de retenção de metais pesados em tecidos fúngico dos FMAs é apresentada na Figura 4. Observa-se que o Cu foi o metal com maior retenção pelo tecido fúngico, entre os metais estudados. *Glomus clarum* obteve a maior retenção, atingindo valores de $3.259 \mu\text{g de Cu g}^{-1}$ tecido fúngico, tendo um incremento médio significativo de 73,84% em relação a *Gigaspora gigantea* e *Glomus FDSI*.

Já a capacidade máxima de retenção dos outros metais (Zn, Cd, Pb) no tecido fúngico também foi diferenciada entre os FMAs. Para Zn, a capacidade de retenção foi menor que Cu, mas foi maior do que Cd e Pb. O isolado *Gigaspora gigantea* apresentou valores médios de retenção de $729 \mu\text{g de Zn g}^{-1}$ tecido fúngico, sendo significativamente diferente dos demais (Figura 4), enquanto os isolados *Glomus clarum* e *Glomus FDSI* obtiveram os menores valores, de 328 e $392 \mu\text{g de Zn g}^{-1}$ tecido fúngico, respectivamente.

Para Cd e Pb, foram encontrados menores valores de capacidade máxima de retenção no tecido fúngico do que os observados para Cu e Zn (Figura 4). A capacidade máxima de retenção de Cd para *Glomus clarum* e *G.FDSI* obteve valores de 69 e $56 \mu\text{g g}^{-1}$ tecido fúngico, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. A capacidade máxima de retenção de Pb foi a menor entre todos os metais testados, tendo o isolado *Glomus clarum* apresentado a maior capacidade de retenção, atingindo $39 \mu\text{g de Pb g}^{-1}$, valor

que foi 56,4% e 43,6% superior em relação a *G.FDS1* e *Gigaspora gigantea*, respectivamente.

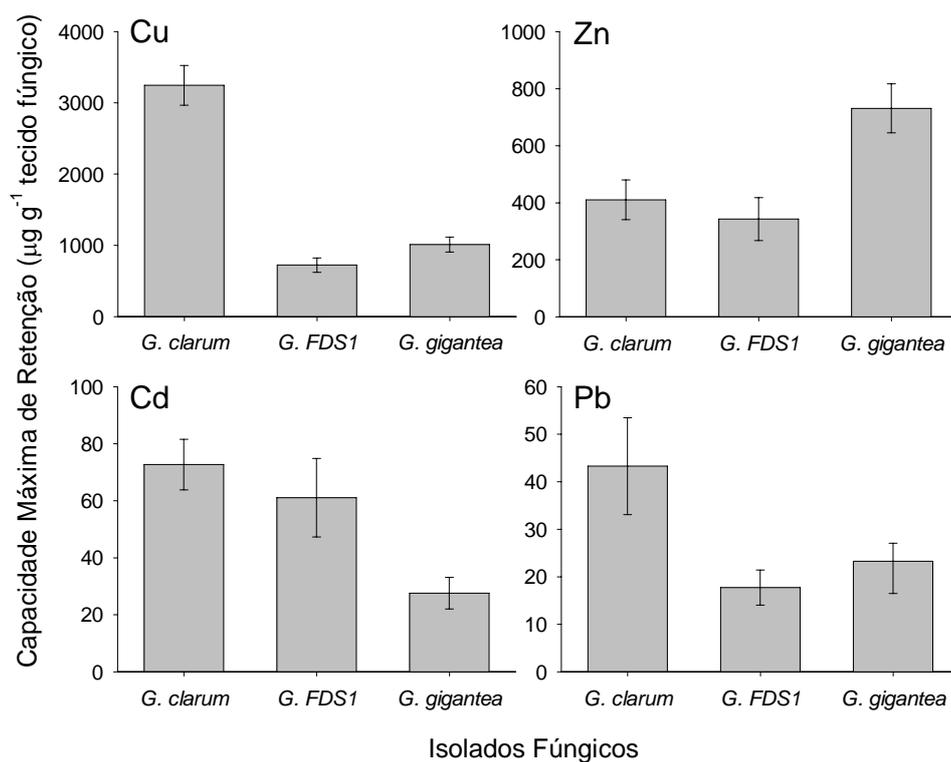


FIGURA 4. Capacidade máxima de retenção de Cu, Zn, Cd e Pb, em tecido fúngico de *Glomus clarum*, *Glomus FDS1* e *Gigaspora gigantea*. Barras verticais representam o intervalo de confiança, a 95% de probabilidade.

Quando são considerados os valores médios de capacidade de retenção dos metais (Figura 5), verifica-se que o Cu apresenta a maior capacidade máxima de retenção entre os metais estudados, retendo, em média, 1.769 µg de Cu g⁻¹ tecido fúngico, seguido de Zn, que reteve 483 µg de Cu g⁻¹ tecido

fúngico. Já Cd e Pb tiveram os menores valores médios de retenção, 50 e 26 μg de Cu g^{-1} tecido fúngico, respectivamente. Estes resultados evidenciam a maior capacidade de retenção de Cu e Zn, enquanto Cd e Pb são pouco retidos pelos tecidos dos FMAs estudados.

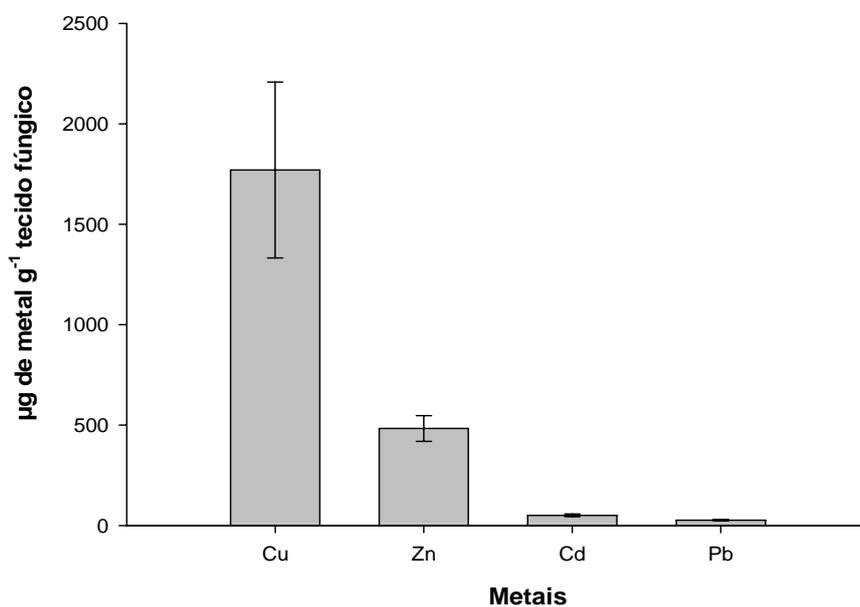


FIGURA 5. Capacidade máxima de retenção de metais pesados em tecidos de FMAs (média dos três isolados testados). Barras verticais representam o erro padrão da média.

A taxa de retenção de Cu, Zn, Cd e Pb pelos FMAs foi avaliada também quando estes elementos foram aplicados simultaneamente em solução. Neste estudo, foram testados apenas os isolados *Glomus clarum* e *Gigaspora gigantea* (Figura 6), uma vez que não foi possível obter quantidade suficiente de tecido fúngico de *Glomus FDSI* para a condução do ensaio. Para *Glomus clarum*, verifica-se, novamente, a maior retenção de Cu no tecido fúngico, em relação

aos demais metais. Entretanto, a retenção máxima de Cu neste ensaio foi de apenas 295 μg de Cu g^{-1} de tecido fúngico. Esta tendência também foi observada para o *Gigaspora gigantea*, cuja capacidade máxima de retenção de Cu foi de apenas 212 μg de Cu g^{-1} .

Para Zn, verificou-se que a capacidade máxima de retenção para *Glomus clarum* e *Gigaspora gigantea* foi de 113 e 210 μg de Zn g^{-1} tecido fúngico, respectivamente. Mesmo havendo uma redução nos valores de Zn quando esse elemento é aplicado em mistura, verifica-se, novamente, que o isolado *G. gigantea* apresentou maior capacidade de retenção de Zn do que o isolado *G. clarum*. Para Cd e Pb, assim como observado para o ensaio anterior, os valores obtidos foram muito baixos, para ambos os isolados, confirmando a baixa capacidade de retenção desses elementos pelos FMAs.

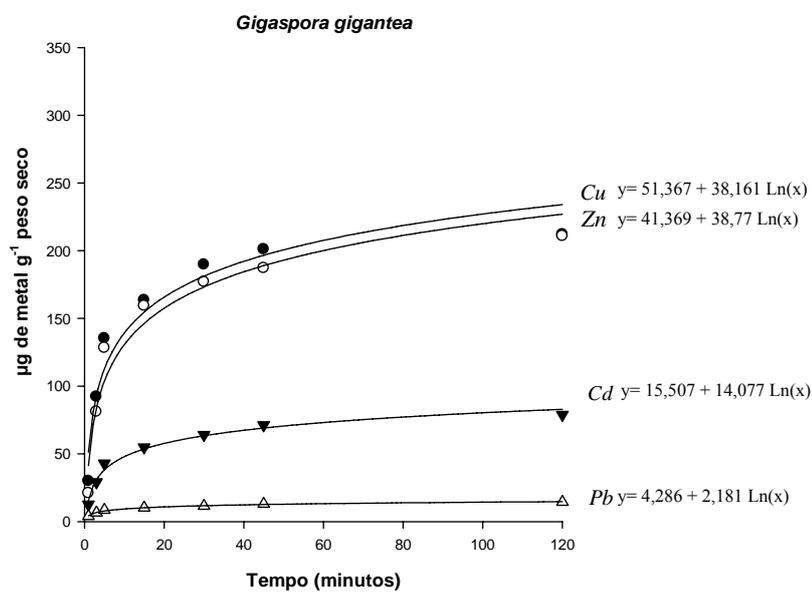
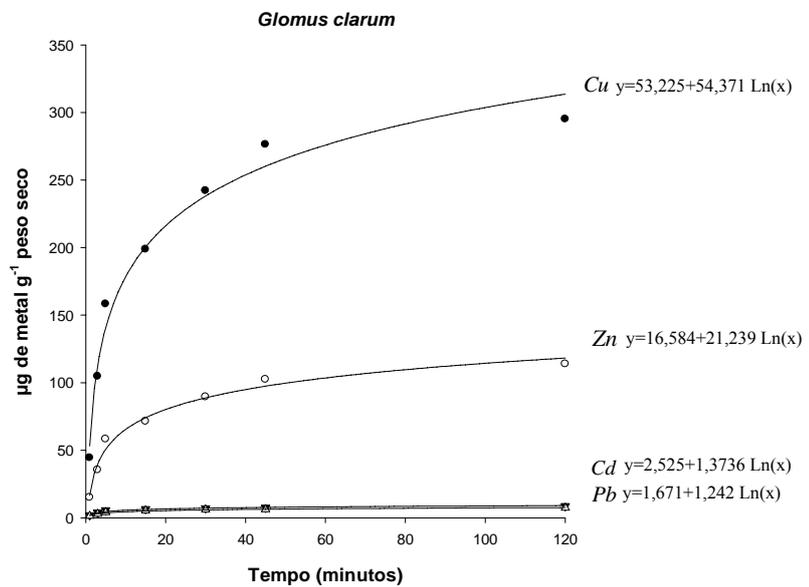


FIGURA 6. Taxa de retenção de Cu, Zn, Cd e Pb, aplicados simultaneamente em solução, para *Glomus clarum*, *Glomus FDS 1* e *Gigaspora gigantea*.

Assim como no presente estudo, González-Chavez et al. (2004a) observaram também que as maiores velocidades de retenção de Cu ocorreram nos primeiros 20 minutos de exposição. Além disso, estes autores verificaram valores de retenção de Cu, para *Glomus mosseae*, de 13.200 µg de Cu g⁻¹ e, para *Glomus claroideum*, 13.800 de µg de Cu g⁻¹ micélio seco, os quais foram coletados de solos contaminados. Estes valores são superiores aos encontrados para *G. clarum* no presente estudo (3.259 µg de Cu g⁻¹ tecido fúngico), evidenciando que isolados provenientes de solos contaminados possuem maior capacidade de retenção de metais em seu micélio. No entanto, este comportamento não se confirmou para *Glomus caledonium*, também proveniente de área contaminada, avaliado por aqueles autores, o qual reteve apenas 2.800 µg de Cu g⁻¹. Este valor é inferior ao encontrado para *Glomus clarum* no presente estudo, indicando que há uma variabilidade na capacidade de retenção de Cu dentro do gênero *Glomus*.

Isolados provenientes de áreas não contaminadas, como é o caso do *Glomus clarum* deste estudo, podem apresentar uma capacidade intrínseca de elevada retenção de metais, mesmo quando não apresentam histórico de exposição aos poluentes.

Essa maior capacidade dos fungos do gênero *Glomus* em reter Cu, comparada a outros FMAs, pode ser devido a diferenças na composição química da parede celular (Gadd, 1993; Kapoor & Viraraghavam, 1995), a qual possui quitina e polissacarídeos β-glucan (1-3), que são os principais componentes desta espécie (Smith & Read, 1997). Tem sido especulado também que os componentes da parede celular dos fungos, tais como grupos amino, hidroxílicos, carboxílicos, dentre outros, podem representar sítios de ligação para os íons Cu⁺² em fungos (Zhou, 1999; Kapoor & Viraraghavan, 1995). Além disso, os metais podem interagir com as proteínas, favorecendo a retenção desses elementos na parte externa da parede celular (Ross, 1994; Gardea-

Torresdey et al., 1997). Dentre estas substâncias, pode-se destacar a glomalina, que é uma glicoproteína que possui elevada afinidade por Cu, além de formar complexos Cu-glomalina bastante estáveis (González-Chávez et al., 2004b). Contudo, no presente trabalho não foram avaliados os componentes da parede celular do micélio dos FMAs, sendo necessários de estudos adicionais para verificar a possível influência destes sobre os mecanismos de retenção de Cu.

Os valores de capacidade máxima de retenção de Cu no presente estudo corroboram com os resultados de estudos utilizando alguns fungos de solos, como, por exemplo, *Aspergillus niger* (2.000-10.000 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$) e *Mucor rouxi* (1.000-3.000 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$) (Kapoor & Virarghavan, 1995; Muellen et al., 1992), *Rhizopus arrhizus* (1.500 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$) e *Trichoderma viride* (2.200 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$) (Morley & Gadd, 1995).

A taxa de retenção de Zn pelos FMAs do presente estudo variou de 328 a 729 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ tecido fúngico, sendo estes valores muito inferiores aos encontrados para alguns microrganismos do solo, tais como: *Streptomyces noursei*: 1.600 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ (Mattuscka & Straube, 1993) e *Rhizopus arrhizus*: 14.000-20.000 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ (Tobin et al., 1984; Zhou, 1999). Enquanto isso, Chen et al. (2001) demonstraram que tecidos fúngicos de *Glomus mosseae* e *Glomus versiforme* apresentaram concentrações de 1.200 e 600 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, respectivamente. Apesar de *Gigaspora gigantea* apresentar tecido micelial mais espesso (Figura 7), verifica-se que esta espécie apresenta maior capacidade de retenção de Zn, atingindo valores de 729 $\mu\text{g de Zn g}^{-1}$. Segundo Christie et al. (2004), a capacidade de retenção de Zn pelos FMAs é determinada pela presença de proteínas ligantes nas estruturas dos FMAs contendo cisteínas, as quais têm a habilidade de complexar este elemento presente em solução.

No presente estudo, a capacidade de retenção de Pb pelos FMAs variou de 39,9 a 17,3 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ tecido fúngico. Estes valores são superiores aos encontrados para os fungos ectomicorrízicos em estudos realizados por

Marschner et al. (1998), que observaram os seguintes valores de capacidade de retenção de Pb em tecido fúngico de *Laccaria bicolor* e *Paxillus involutus*: 4,82 e 1,44 μg de Pb g^{-1} peso seco, respectivamente. Fica demonstrada, assim, a maior capacidade dos FMAs em reter Pb.

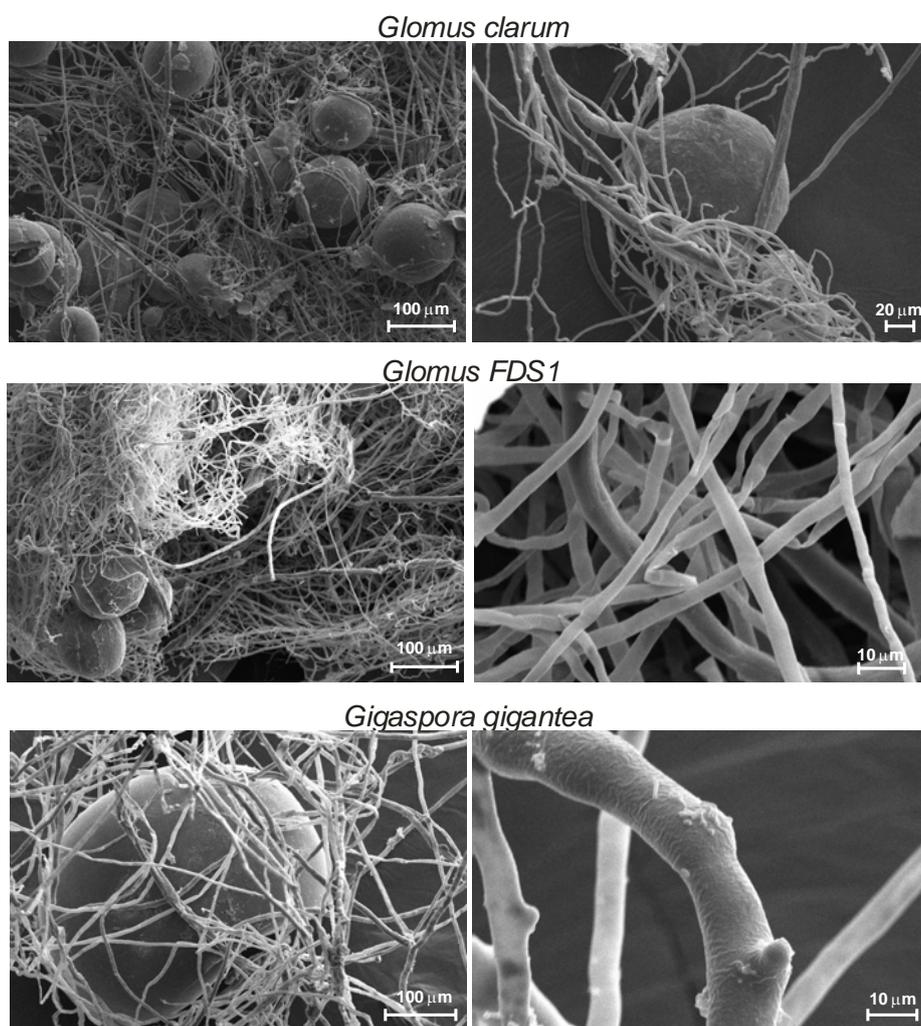


FIGURA 7. Micrografias de varredura de tecido fúngico dos isolados *Glomus clarum*, *Glomus, FDS 1* e *Gigaspora gigantea*.

Quando os metais são testados simultaneamente, os resultados evidenciam redução acentuada sobre a retenção de Cu e Zn, principalmente, e isto pode estar relacionado com a competição entre os sítios de ligação dos metais. Por exemplo, sítios que seriam destinados ao Cu e Zn foram ocupados por outros elementos, diminuindo, por consequência, sua capacidade de ligação. De fato, dentre os metais estudados, Cu e Zn apresentam menor tamanho de raio iônico (apenas 0,72–0,74 Å), enquanto para Cd e Pb, os raios iônicos são da ordem de 0,97 e 1,32 Å, respectivamente (Mahan & Myers, 2003). Com isso, a capacidade de retenção do Cu e Zn pelo tecido fúngico dos FMAs é muito afetada na presença de outros elementos, principalmente o Pb, o qual apresenta elevado raio iônico. Além disso, tem sido demonstrado que o Pb pode formar complexos de elevado tamanho com compostos orgânicos (Silva et al., 2006), os quais podem comprometer a capacidade de retenção de outros elementos no tecido fúngico. Vale ressaltar que a avaliação da capacidade de retenção de FMAs em mistura de metais é importante, pois solos contaminados, normalmente, apresentam um ou mais metais potencialmente tóxicos (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Considerando que os diferentes FMAs apresentam características distintas quanto à espessura e à morfologia de parede celular, é provável que tais características se relacionem com a capacidade destes em reter metais pesados acumulando-se em seus tecidos. A retenção dos metais pelos FMAs apresentada no presente trabalho pode evitar a translocação para os tecidos da planta, pois este mecanismo é a provável proteção dos FMAs à planta hospedeira (Christie et al., 2004).

É razoável considerar que a retenção de metais seja maior em tecidos fúngicos com menor espessura, como observado em membros da família Glomeraceae, os quais apresentam tecido micelial fino, com diâmetro variando entre 0,8-4,5 µm e parede celular da hifa com espessura $\leq 1,2$ µm. Enquanto isso,

espécies da família Gigasporaceae apresentam hifas mais espessas e com diâmetro acima de 20 μm e espessura de parede das hifas multilaminadas variando de 4 a 7 μm (Beck et al., 2007).

Isolados com hifas grossas retêm menos metais por apresentarem menor superfície. Vale ressaltar que *G. clarum* apresentou maior capacidade de retenção para Cu, Cd e Pb e isto pode estar relacionado com as características morfo-anatômicas desta espécie, que apresenta tecido micelial mais fino, com diâmetro de, aproximadamente, 4 μm em comparação ao isolado *G. gigantea*, que apresenta 13 μm de diâmetro do tecido micelial (Figura 7) Esta característica permite uma maior superfície de contato, facilitando o processo de retenção dos metais no tecido fúngico do *G. clarum*. No entanto, este comportamento não pode ser atribuído ao *Glomus FDS1*, o qual apresenta também tecido micelial fino, porém, com baixa capacidade de retenção dos metais.

Além das características morfo-anatômicas dos tecidos dos FMAs, estudos adicionais são necessários para compreender a natureza do acúmulo, os componentes da parede celular dos fungos e os mecanismos envolvidos. Estas informações podem auxiliar no melhor entendimento da participação dos FMAs na tolerância de plantas e seu significado ecológico em solos poluídos (González-Chavez et al., 2004a; Christie et al., 2004).

5 CONCLUSÕES

A retenção de metais pesados em tecidos de FMAs é um processo rápido, tendo a capacidade de retenção sido maior para Cu e Zn, enquanto que Cd e Pb foram pouco retidos pelos FMAs.

Os isolados comportam-se de modo diferenciado na retenção de metais pesados, mas a tendência geral de retenção descece na seguinte ordem: Cu>Zn>>Cd>Pb.

O tecido fúngico de *Glomus clarum* apresentou maior capacidade de retenção para Cu, Cd e Pb, enquanto que, para Zn, foi *Gigaspora gigantea*.

A exposição de tecido fúngico aos metais aplicados simultaneamente em solução reduz a capacidade de retenção de Cu e Zn pelos FMAs.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEONI, L.R.F.; BORBA, R.P.; CAMARGO, O.A. Metais pesados: da Cosmogênese aos solos brasileiros. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v.4, p.1-42.

ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. New York: J. Willey, 1990. 339p.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2007. 42p.

AUDEST, P.; CHAREST, C. Effects of AM colonization on 'wild tobacco' plants grown in zinc-contaminated soil. **Mycorrhiza**, n.16, p.277-283, 2006.

BECÁRD, G.; FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, v.108, p.211-218, 1988.

BECK, A.; HAUG, I.; OBERWINKLER, F. Structural characterization and molecular identification of arbuscular mycorrhiza morphotypes of *Alzatea verticillata* (Alzateaceae), a prominent tree in the tropical mountain rain forest of South Ecuador. **Mycorrhiza**, v.30, p.607-625, 2007.

BOSSOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy**. 2.ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670p.

BURKHARDT, C.; INSAM, H.; HUTCHINSON, T.C.; REBER, H.H. Impact of heavy metal on the degradative capabilities of soil bacterial communities. **Biology and Fertility of Soils**, v.16, p.154-156, 1993.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36. n.11, p.1443-1452, nov. 2001.

CHEN, B.; SHEN, H.; LI, Z.; FENG, G.; CHRISTIE, P. Effects of EDTA application and arbuscular mycorrhizal on growth and zinc uptake by maize (*Zea mays* L.) in soil experimentally contaminated with zinc. **Plant and soil**, v.261, p.219-229, 2004.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v.261, p.209-217, 2004.

COLOZZI-FILHO, A. **Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares**. 1998. 80 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CRANENBROUCK, S.; VOETS, L.; BIVORT, C.; RENARD, L.; STRULLU, D.G.; DECLERCK, S. Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs (Ed.). **In vitro culture of mycorrhizas**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2005. Cap.18, p.342-375.

DAVIES, F.T.; PURYER, J.D.; NEWTON, R.J.; EGILLA, J.N.; SARAIVA GROSSI, J.A. Mycorrhizal enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). **Journal of Plants Physiology**, n.158, p.777-786, 2001.

DAVIES, F.T.; PURYER, J.D.; NEWTON, R.J.; EGILLA, J.N.; SARAIVA GROSSI, J.A. Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. **Journal of Plants Physiology**, n.25, p.2389-2407, 2002.

DECLERCK, S.; STRULLU, D.G.; FORTIN, J.A. **In vitro culture of mycorrhizas**. Germany: Springer – Velarg Berlin Heidelberg, 2005. 388p.

DIAS JÚNIOR, H.E.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.631-640, 1998.

DÍAZ, G.; AZCÓN AGUILAR, C.; HONRUBIA, M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthylis cytisoides*. **Plant and Soil**, n.180, p.241-249, 1996.

DUDKA, S.; PIOTROWSKA, M.; TERELAK, H. Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. **Environmental Pollution**, v.94, p.181-188, 1996.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOMETRIA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.235.

GADD, G.M. Interactions of fungi with toxic metals – Tansley Review. **New Phytologist**, v.124, p.25-60, 1993.

GARDEA-TORRESDEY, J.L.; CANO-AGUILERA, I.; WEBB, R.; GUTIERREZ-CORONA, F. Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. **Environmental Toxicologist Chemistry**, n.16, p.435-441, 1997.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v.46, n. 2, p.235-244, Apr. 1963.

GILDON, A.; TINKER, P.B. Interactions of vesicular-arbuscular infection and heavy metal in plants. I. The effect of heavy metal on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, v.95, p.247-261, 1983.

GONZÁLEZ CHAVEZ, M.C.; D'HAEN, J.; VANGRONSVELD, J.; DODD, J.C.C. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**, v.240, p.287-297, 2004a.

GONZÁLEZ CHAVEZ, M.C.; CARRILO GONZALEZ, R.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A. The role of glomalina, a protein produced by mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution**, v.130, p.317-323, 2004b.

GRAZZIOTTI, P.H. **Comportamento de fungos ectomicorrízicos, *Acacia mangium* e espécies de *Pinus* e *Eucalytus* em solo contaminado por metais pesados.** 1999. 177p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HASELWANDTER, K.; LEYVAL, C.; SNADERS, F.E. Impact mycorrhizal fungi on plant uptake of heavy metals and radionuclides from soil. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPPS, H. (Ed.). **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems.** Basel: Birkhäuser Verlag, 1994. p.179-189.

HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T.; FIGGE, D.A.H. The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metal mine spoil. **Environmental Pollution**, v.86, p.171-179, 1994.

HOVSEPYAN, A.; GREIPSSON, S. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on phytoextraction by corn (*Zea mays*) of lead-contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, n.6, p.305-321, 2004.

INVAM. **International culture collection of vesicular and arbuscular mycorrhizal fungi. species description**. Morgantown: West Virginia Agriculture and Forestry Experimental Station, 2000. Disponível em: <<http://www.invam.caf.wvu.edu>>.

JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainable of plant-soil systems. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPPS, H. (Ed.). **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994. p.101-115.

JONER, E.J.; BRIONES, R.; LEYVAL, C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. **Plant and Soil**, n.226, p.227-234, 2000.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. Boca Raton: CRC, 2001. 413p.

KALDORF, M.; KUHN, A.J.; SCHRÖDER, W.R.; HILDEBRANDT, U.; BOTHE, H. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal of Plant Physiology**, v.154, p.718-728, 1999.

KAPOOR, A.; VIRARGHAVAN, T. Fungal biosorption Ú- an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. **Bioresource Technology**, v.53, p.195-206, 1995.

KLAUBERG FILHO, O. **Ecologia e atividade de fungos micorrízicos arbusculares em solo poluído com metais pesados**. 1999. 161p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, MG.

KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solo poluído com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.125-134, 2002.

KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; SOARES, C.R.F.S.; SILVA, S. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v.4, p.85-144.

LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, New York, v.7, n.3, p.139-153, Sept. 1997.

MAHAN, B.M.; MYERS, R.J. **Química: um curso universitário**. São Paulo: E. Blücher, 2003. 581p.

MARSCHNER, P.; JENTESCHKE, G.; GODBOLD, D.L. Cation exchange capacity and lead sorption in ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, p.93-98, 1998.

MATTUSCHKA, B.; STRAUBE, G. Biosorption of metals by a waste biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v.58, p.57-63, 1993.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MORLEY, G.F.; GADD, G.M. Sorption of toxic metals by fungi and clay minerals. **Mycological Research**, v.99, p.1429-1438, 1995.

MUELLEN, M.D.; WOLF, D.C.; BEVERIDGE, T.J.; BAILEY, G.W. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.129-135, 1992.

MUGNIER, J.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular infections in Ri T-DNA transformed roots grown axenically **Phytopathology**, v.77, p.1045-1050, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**; Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NOGUEIRA, A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. p.135-174.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. **New Phytologist**, v.115, p.69-75, 1990.

RIBEIRO FILHO, M.R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O. & MOTTA, P.E.F Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.453-464, 1999.

ROSS, S.M. Retention transformation and mobility of toxic metals in soils. In: ROSS, S.M. (Ed.). **Toxic metals ins soil-plant systems**. Chichester: J. Wiley, 1994. p.63-152.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT**: users's guide, release 8 edition. Cary, NC, 1988.

SILVA, S. **Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento, extração de metais pesados e características anatômicas da *Brachiaria decumbens* Stapf. em solo**. 2006. 82p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, MG.

SILVA, V.L.; CARVALHO, R.; FREITAS, M.P., TORMENA, C.F.; MELO, W.C. Spectrometric and theoretical investigation of the structures of Cu and Pb/DTPA complexes. **Struct Chem**, v.18, p.605-609, 2007.

SIQUEIRA, J.O. Cultura axênica e monoxênica de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2., 1987, São Paulo. **Programas e resumos...** São Paulo: SEMA/ SA/USP, 1987. p.44-70.

SIQUEIRA, J.O.; POUYÚ ROJAS, E.; MOREIRA, F.M.S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplântio de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.569-580, 1999.

SMITH, S.E. & READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. 2.ed. London, Academic Press, 1997. 605p

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G.; MOREIRA, F.M.S. Fitotoxicidez de cádmio em *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, v.29, n.2, p.175-183, 2005.

tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, 2008. (DOI 10.1007/s00374-007-026-z)..

TOBIN, J.M.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. Uptake of metals ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, p.821-824, 1984.

VANGROSVELD, J.; COLPAERT, J.V.; Van TICHELEN, K.K. Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physico-chemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental Pollution**, v.94, p.131-140, 1996.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z.R. Biosorption of heavy metals *Biotechnol, Prog.* V.11, p.235-250, 1995

WEISSENNHORN, I.; LEYVAL, C.; BERTHELIN, J. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy metals polluted soils. **Plant Soil**, v.157, p.247-210, 1993.

WEISSENNHORN, I.; LEYVAL, C.; BERTHELIN, J. Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular in soil polluted by atmospheric deposition from a smelter. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.22-28, 1995.

WHITFIELD, L.; RICHARDS, A.J.; RIMMER, D.L. Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonization in *Thymus polytrichus* in northern England. **Mycorrhiza**, v.14, p.55-62, 2004.

WRIGTH, S.F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v.198, p.97-107, 1998.

ZHOU, J. L. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.686-693, 1999.

ZHU, Y.G.; CHRISTIE, P.; LAIDLAW, A.S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere**, v.42, p.193-199, 2001.