

POTENCIAL DA ASSOCIAÇÃO *Pisolithus microcarpus* COM MUDAS DE *Corymbia citriodora* EM SOLO CONTAMINADO COM ZINCO

POTENTIAL ASSOCIATION WITH SEEDLINGS *Pisolithus microcarpus* *Corymbia citriodora* IN SOIL CONTAMINATED WITH ZINC

Rodrigo Ferreira da Silva¹ Zaida Inês Antonioli² Sidinei Wolnei Weirich³ Alex Dellai³
Evandro Luiz Missio⁴ Douglas Scheid⁵

RESUMO

O uso de plantas com potencial de associação com microrganismos é uma prática frequente em solos contaminados por metais pesados, considerada de baixo custo e ambientalmente correta. O trabalho objetivou avaliar o crescimento do *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson e o efeito da inoculação com *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 em solo contaminado com Zn. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2 x 6), sendo com e sem inóculo e seis doses de Zn (0, 300, 600, 900, 1200 e 1500 mg kg⁻¹ de solo), com seis repetições. As mudas foram inoculadas e cultivadas durante 90 dias em viveiro. Após 67 dias do transplante definitivo foi avaliado o percentual de colonização ectomicorrízica, a altura de planta, diâmetro do colo, número de folhas, índice de clorofila total, volume radicular, massa seca das folhas, da haste caulinar, radicular e total, relação massa seca aérea/massa seca radicular e a relação altura/diâmetro do colo. O percentual de colonização ectomicorrízica em *Corymbia citriodora* é estimulado pelo acréscimo de até 1412,21 mg kg⁻¹ de Zn no solo. O *Corymbia citriodora* é tolerante a adição de até 1500 mg kg⁻¹ de zinco em solo com 81% de argila, mesmo sem a inoculação com *Pisolithus microcarpus*. A análise de correlação canônica evidencia que a inoculação com *P. microcarpus* favorece a massa seca total, radicular e da parte aérea de *Corymbia citriodora* cultivado em solo com 81% de argila contaminada com 600 mg kg⁻¹ de Zn.

Palavras-chave: metal pesado; eucalipto; tolerância.

ABSTRACT

The use of microorganisms potential association with plants is a common practice in soil contaminated by heavy metals, considered low-cost and environmentally friendly. This study aimed to evaluate the growth of *Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L.A.S. Johnson and the effect of *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 inoculation in soil contaminated with Zn. The design was completely randomized in a factorial arrangement (2 x 6), with and without inoculum and six doses of Zn (0, 300, 600, 900, 1200 and

1 Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto do Departamento de Ciências Agrônômicas e Ambientais, Centro de Educação Superior Norte, Universidade Federal de Santa Maria, Linha 7 de Setembro, s/n, CEP 98400-000, Frederico Westphalen (RS), Brasil. rodrigossilva@smail.ufsm.br

2 Bióloga, Dra., Professora Associada do Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. Bolsista de Produtividade do CNPq. zantonioli@gmail.com

3 Engenheiro Agrônomo, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Agricultura e Ambiente, Centro de Educação Superior Norte, Universidade Federal de Santa Maria, Linha 7 de Setembro, s/n, CEP 98400-000, Frederico Westphalen (RS), Brasil. sidiww@hotmail.com/adellai2@yahoo.com.br

4 Engenheiro Agrônomo, MSc., Doutorando do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), Brasil. Pesquisador da FEPAGRO Florestas. evandro@fepagro.rs.gov.br

5 Acadêmico do Curso de Agronomia, Centro de Educação Superior Norte, Universidade Federal de Santa Maria, Linha 7 de Setembro, s/n, CEP 98400-000, Frederico Westphalen (RS), Brasil. Bolsista PIBIC/CNPq. douglasscheid@gmail.com

1500 mg kg⁻¹ soil), with six replications. Seedlings were inoculated and cultured for 90 days in nursery. After 67 days of transplantation was evaluated the ectomycorrhizal colonization percentage, plant height, stem diameter, number of leaves, chlorophyll index, root volume, leaf dry weight, stem, root and total, dry mass ratio / root dry mass and height / stem diameter. The ectomycorrhizal colonization percentage in *Corymbia citriodora* is stimulated by adding up to 1412.21 mg kg⁻¹ Zn. The *Corymbia citriodora* is tolerant to the addition of up to 1500 mg kg⁻¹ of zinc in soil with 81% clay even without inoculation with *Pisolithus microcarpus*. The canonical correlation analysis shows that inoculation with *P. microcarpus* favors total dry mass, root and aerial part of *Corymbia citriodora* grown in soil with 81% clay contaminated with 600 mg kg⁻¹ Zn.

Keywords: heavy metal; eucalyptus; tolerance.

INTRODUÇÃO

As atividades de mineração de Zn, refino do minério e sua industrialização, aumentam o teor desse elemento no solo nas proximidades das indústrias e nos locais de deposição de rejeitos (BORGES JR. et al., 2008; SWEDISH-EPA, 2011). O acúmulo deste elemento químico no solo também ocorre em situações de descartes, ou quando aplicações de produtos que contenham Zn, como por exemplo, resíduos de equipamentos eletrônicos (GRAMATYKA et al., 2007; LINCOLN et al., 2007), dejetos de suínos (HOODA, 2010), lodo de esgoto, biossólidos, lubrificantes, pesticidas, baterias e fertilizantes fosfatados (HOODA, 2010; KABATA-PENDIAS, 2010) são realizados de forma inadequada ou em excesso. Isto pode resultar em valores de Zn acima dos considerados seguros pelos órgãos ambientais. A CETESB (2005) indica como valor de referência para intervenção, quando o solo apresentar teores de Zn acima de 450 mg kg⁻¹ de peso seco em áreas agrícolas, 1000 mg kg⁻¹ em áreas residenciais, e acima de 2000 mg kg⁻¹ para áreas industriais.

A recuperação de áreas contaminadas utilizando métodos de revegetação tem efeito permanente e baixo custo de manutenção (GRAZZIOTTI et al., 2003). Nesse sentido, tem-se referenciado a importância para o uso de árvores pela produção de fitomassa e acumularem maior quantidade de metais (GARCÍA et al., 2004). Para isso, é importante que as plantas apresentem rápida taxa de crescimento (PUNSHON et al., 1996) e valor econômico (KOS et al., 2003). Em clima tropical, o eucalipto produz elevado volume de madeira (ALVEZ et al., 2007; VITAL, 2007), e foi utilizado em 75% das áreas de florestas plantadas no Brasil até 2011 (ABRAF, 2012). O *Corymbia citriodora* é uma espécie de eucalipto originária da Austrália, no estado de Queensland (SMITH et al., 2007),

utilizado no Brasil geralmente para produção de madeira (VILAS BÔAS et al., 2009) e óleo essencial (SILVA et al., 2009). Além disso, o eucalipto tem capacidade de associar-se simbioticamente com alguns fungos ectomicorrízicos (MELLO et al., 2006), o que poderia melhorar seu desenvolvimento em ambiente contaminado por metais.

As ectomicorrizas podem favorecer o crescimento das plantas hospedeiras em solos contaminados por metais pesados (GRAZZIOTTI et al., 2003). As ectomicorrizas podem tornar as plantas micorrizadas mais tolerantes aos estresses causados pelas concentrações de metais pesados, por meio da redução da exposição radicular, devido à excreção de substâncias quelantes, imobilização extracelular, alterações do pH, modificação no sistema de absorção e destoxificação intracelular nos tecidos fúngicos (KABATA-PENDIAS, 2010). O uso de mudas inoculadas com fungos ectomicorrízicos ainda no viveiro possibilita o controle da presença do fungo nas plantas e a efetividade do fungo na associação, contribuindo para o estabelecimento e desenvolvimento de plantas na área de plantio (ANDREAZZA et al., 2004). Nesse sentido, é possível que a associação ectomicorrízica possa contribuir para o desenvolvimento do eucalipto em solo contaminado por Zn.

Nesse caso, tem sido relatado o uso de eucalipto em experimentos e projetos com vistas à extração de elementos químicos do solo (EPA, 2005; ITRC, 2009; MAGALHÃES et al., 2011). Entretanto, são poucos os testes com mudas de eucalipto em solo contaminado com Zn (RAMOS et al., 2009) e pouco se conhece especificamente sobre o desenvolvimento do *Corymbia citriodora* e o efeito de ectomicorrizas em solo contendo elevadas concentrações de Zn. Assim, este trabalho objetivou caracterizar a associação do isolado fúngico *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 no desenvolvimento de mudas de *Corymbia citriodora*

e o efeito da inoculação com *Pisolithus microcarpus* em solo contaminado com Zn.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do viveiro florestal, da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* de Frederico Westphalen – RS.

A espécie de eucalipto utilizada foi a *Corymbia citriodora*. As sementes foram obtidas na FEPAGRO FLORESTAS – Centro de Pesquisas Florestais de Santa Maria, RS. As mesmas foram desinfetadas em álcool 70% por 30 segundos e lavadas em água destilada, antecedendo a semeadura. As mudas de eucalipto foram inicialmente produzidas em tubete plástico de seção circular, com capacidade de 120 cm³, contendo substrato comercial Tecnomax[®]. O substrato foi submetido a dois ciclos de autoclavagem (121°C por 60 minutos) em intervalo de 24 horas. Os tubetes foram previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 12 horas, e enxaguados com água destilada.

Foram semeadas quatro sementes por tubete e, após emergência das plântulas, procedeu-se o raleio visando à uniformidade das mesmas, que foram cultivadas por 90 dias sob irrigação diária. A adubação foi realizada semanalmente, com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951) sem fósforo, pois elevados teores desse nutriente podem prejudicar o estabelecimento da micorriza (SOUZA et al., 2004).

Aos três meses de cultivo, selecionaram-se as mudas do substrato comercial que apresentavam 15 cm de altura, 12 folhas e 1,5 mm de diâmetro de colo, as quais foram transplantadas para vasos de plástico rígido e escuro com capacidade de 1 L, sendo submetidas aos tratamentos de inoculação e solo contaminado com Zn, classificado como Latossolo Vermelho (SANTOS et al., 2006). As características física e química foram: 81% de argila; 2,4% de MO; pH_{água (1:1)}: 4,9; Ca+Mg: 5,4 Cmol_c L⁻¹; Al: 6,6 Cmol_c L⁻¹; H+Al: 4,3 Cmol_c L⁻¹; P: 6,6 mg dm⁻³; K: 111 mg dm⁻³ e Zn: 2,9 mg dm⁻³.

A adubação de base e de cobertura no solo foi conforme as recomendações da SBCS (2004) para a cultura do eucalipto. As fontes de nutrientes aplicadas foram cloreto de potássio (K) e ureia (N). Para estabilização do pH do solo em 5,5 foi aplicada a mistura de carbonato de cálcio (CaCO₃) com carbonato de magnésio (MgSO₃) na relação

molar 3:1. Deixou-se um período de 60 dias para ocorrer o efeito da calagem. Posteriormente, o solo foi submetido a dois ciclos de autoclavagem (121°C por 60 minutos) em intervalo de 24 horas e então conduzido para o enchimento dos vasos plásticos para receber as referidas doses de Zn.

O isolado ectomicorrízico utilizado foi o UFSC-Pt116 - *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Cunn., obtido do banco de fungos do Laboratório de Microbiologia do Solo Dr. Marcos Rubens Fries da Universidade Federal de Santa Maria. O isolado foi mantido em placa de petry contendo 20 mL de meio sólido Melin Norkrans Modificado (MARX, 1969), incubado em BOD a 28°C com ausência de luz e multiplicado, por repicagem em condições assépticas a cada 30 dias. O conteúdo de uma placa de petry com meio de cultura coberto pelo micélio fúngico foi fragmentado em liquidificador contendo 200 mL de meio líquido Melin Norkrans Modificado, durante 10 segundos. Posteriormente, 2 mL dessa suspensão micelial foi inoculada diretamente no substrato comercial, por três vezes, em intervalos de 10 dias, a partir da semeadura do eucalipto, seguindo a metodologia adaptada de Brundrett et al. (1996). Nos tratamentos sem fungo foram aplicados apenas 2 mL de meio líquido Melin Norkrans Modificado no substrato.

Estabeleceu-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (2 x 6), sendo os tratamentos do fator A (com e sem inoculação ectomicorrízica) e os tratamentos do fator D, seis doses de zinco (0, 300, 600, 900, 1200 e 1500 mg kg⁻¹ de solo), com seis repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso plástico contendo 1 kg de solo e uma muda de eucalipto.

Após 67 dias de cultivo em casa de vegetação foram avaliadas a altura de planta, diâmetro do colo, número de folhas, índice de clorofila total, volume de radicular, massa seca das folhas, da haste caulinar e radicular, percentual de colonização ectomicorrízica e calculadas a massa seca total, relação massa seca aérea/massa seca radicular e a relação altura/diâmetro do colo. Durante a coleta de dados, foi realizada a contagem do número de folhas por planta, que foram separadas e colocadas para secar em estufa para a obtenção da massa seca das folhas. O diâmetro do colo foi obtido com paquímetro digital por meio da medida na região do colo da planta, sendo então seccionadas para posterior medição da altura com régua graduada, obtendo-se tais valores a partir do colo da planta

até o meristema apical. Posteriormente, o material vegetal da parte aérea das plantas foi submetido à secagem em estufa a 60°C, até peso constante e então, pesado em balança analítica.

As raízes foram separadas do solo e lavadas com água. O volume radicular foi obtido pelo método de deslocamento de água em proveta, adaptado da metodologia utilizada em solo pela Embrapa (1997). Foram separadas amostras de 0,1 g de raízes, com 1 cm de comprimento, para a obtenção do percentual de colonização ectomicorrízica, por meio da quantificação do número de raízes colonizadas e não colonizadas, conforme descrito por Brundrett (2008). As raízes foram secas em estufa a 60°C até apresentar massa constante. Após a secagem, foram obtidas as massas secas das folhas, dos caules e das raízes. Os valores das massas secas das folhas foram somados à massa seca dos caules, resultando na massa seca aérea das plantas.

A partir dos valores obtidos nas variáveis acima, foi calculada a relação massa seca aérea/massa seca radicular, que relaciona as partes transpirantes com as absorptivas de água, cujo valor recomendado é de 2:1 (CALDEIRA et al., 2008). A relação altura/diâmetro do colo, também denominada de quociente de robustez, fornece informações sobre a espessura da haste caulinar e de quanto estiolada está a planta (JOHNSON e CLINE, 1991), representando o equilíbrio de desenvolvimento das plantas, seus valores devem se situar entre 5,4 e 8,1 (CARNEIRO, 1995). O índice de clorofila total foi medido na quarta folha, a partir do meristema (folha desenvolvida), por meio do equipamento portátil clorofiLOG CFL1030 (FALKER, 2009).

Os dados referentes às variáveis avaliadas foram submetidos à análise da variância pelo Teste F ($p \leq 0,05$). Quando houve interação significativa, as médias foram comparadas dentro de cada dose no fator A (inoculação), pelo Teste de Tukey, e para o fator dose D (doses), as médias foram ajustadas por equações de regressão, tendo-se como base os níveis de significância maiores que 95% ($p \leq 0,05$). Para variáveis sem interação significativa no Teste F desmembrou-se os efeitos simples. O procedimento estatístico foi realizado no programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A altura de planta, diâmetro do colo, número de folhas, massa seca das folhas, da haste caulinar, radicular e total não apresentaram

interação significativa e nem significância para os efeitos simples dos tratamentos inoculação e doses de Zn (Tabela 1). O eucalipto associa-se simbioticamente com fungos ectomicorrízicos (MELLO et al., 2006) e estes fungos apresentam mecanismos para destoxificação de metais pesados, protegendo o hospedeiro da toxidez causada pelo metal (COURBOT et al., 2004; BELLION et al., 2006). Contudo, como a espécie *Corymbia citriodora* não foi influenciada pelas doses de Zn aplicadas ao solo, não foi possível evidenciar o efeito protetor da ectomicorriza em relação às altas doses de Zn aplicadas no solo. Esse resultado pode estar relacionado à possível tolerância de *Corymbia citriodora* ao Zn no solo, indicando algum mecanismo de destoxificação de metais por essa espécie, conforme relatado por Graziotti (1999), não necessitando, portanto, da formação da ectomicorriza.

O índice de clorofila total de *Corymbia citriodora* apresentou interação significativa ($p \leq 0,05$) entre o tratamento de inoculação e as doses de Zn aplicadas no solo (Tabela 1), sendo que as plantas inoculadas apresentaram maior índice de clorofila total no tratamento testemunha (sem adição de Zn). As ectomicorrizas promovem maior absorção de nitrogênio quando comparadas a plantas sem esse tipo de associação (SMITH e READ, 2008) e, conforme Lima et al. (2001), o nitrogênio tem efeito sobre a síntese de clorofila. Soma-se a isso, a habilidade da ectomicorriza em possibilitar a absorção de nutrientes de baixa disponibilidade, como o Zn, mantendo uma nutrição adequada da planta (SOUSA et al., 2012). Além disso, os fungos ectomicorrízicos exsudam ácidos orgânicos no solo, que pela redução do pH solubilizam elementos químicos no solo, aumentando a possibilidade de absorção de fósforo, cálcio, magnésio para as plantas (GONZALEZ et al., 2009).

O volume radicular apresentou interação significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos de inoculação e doses de Zn, sendo que as mudas inoculadas manifestaram maior volume radicular em relação as sem inoculação nas doses de 300 e 600 mg kg⁻¹ de Zn (Tabela 1). As raízes com ectomicorrizas geralmente manifestam mais ramificações (SMITH e READ, 2008) e apresentam engrossamento (BRUNDRETT, 2008). Isso pode ter sido favorecido pelo maior volume nas doses de 300 e 600 mg kg⁻¹ de Zn.

O efeito das doses de Zn no índice de clorofila total foi significativo somente para plantas

sem inoculação, nas quais a resposta foi quadrática 920 mg kg⁻¹ de Zn no solo (Figura 1A). Como negativa, com ponto de máxima na dose de o Zn participa na síntese da clorofila (TAIZ e

TABELA 1: Altura de planta, diâmetro do colo, número de folhas, índice de clorofila total, massa seca das folhas, volume radicular, massa seca radicular, massa seca da haste caulinar e massa seca total de *Corymbia citriodora*, inoculada com o isolado de fungo ectomicorrízico, *Pisolithus microcarpus* UFSC - Pt116 e sem inoculação, cultivada em solo contaminado com doses crescentes de Zn.

TABLE 1: Plant height, stem diameter, number of leaves, chlorophyll index, leaf dry weight, root volume, root dry mass, dry mass of the stem and stem dry mass of *Corymbia citriodora*, inoculated with the ectomycorrhizal fungal isolate, *Pisolithus microcarpus* UFSC - Pt116, and without inoculation, grown in soil contaminated with increasing levels of Zn.

Tratamentos	Doses Zn (mg kg ⁻¹)					
	0	300	600	900	1.200	1.500
----- Altura de planta (cm) -----						
Inoculado	32,84 ns	30,68 ns	30,16 ns	29,50 ns	30,00 ns	31,50 ns
Sem inoculação	31,70 ns	29,00 ns	30,00 ns	29,80 ns	29,50 ns	27,98 ns
CV	11,9%					
----- Diâmetro do colo (mm) -----						
Inoculado	3,59 ns	3,67 ns	3,91 ns	3,72 ns	3,80 ns	3,70 ns
Sem inoculação	4,24 ns	3,46 ns	3,60 ns	3,52 ns	4,00 ns	3,90 ns
CV	24,3%					
----- Número de folhas -----						
Inoculado	25 ns	27 ns	26 ns	27 ns	25 ns	25 ns
Sem inoculação	25 ns	25 ns	25 ns	25 ns	24 ns	25 ns
CV	15%					
----- Índice de clorofila total -----						
Inoculado	38,37 aA	40,10 aA	37,27 aA	39,53 aA	38,10 aA	38,87 aA
Sem inoculação	24,23 bB	41,30 aA	41,50 aA	42,43 aA	41,83 aA	40,03 aA
CV	6,6 %					
----- Massa seca das folhas (g) -----						
Inoculado	2,02 ns	2,31 ns	2,37 ns	2,30 ns	1,79 ns	2,09 ns
Sem inoculação	2,06 ns	2,18 ns	2,06 ns	2,00 ns	2,10 ns	2,13 ns
CV	26,8%					
----- Volume radicular (cm ³) -----						
Inoculado	7,83 aAB	8,00 aAB	10,16 aA	8,17 aAB	8,40 aAB	6,70 aB
Sem inoculação	8,30 aA	6,01 bA	6,50 bA	8,00 aA	8,00 aA	7,50 aA
CV	13,7 %					
----- Massa seca radicular (g) -----						
Inoculado	1,27 ns	1,20 ns	1,60 ns	1,40 ns	1,42 ns	1,28 ns
Sem inoculação	1,39 ns	1,13 ns	1,14 ns	1,18 ns	1,28 ns	1,13 ns
CV	17,9 %					
----- Massa seca caule (g) -----						
Inoculado	0,75 ns	0,81 ns	1,05 ns	0,90 ns	0,67 ns	0,74 ns
Sem inoculação	0,90 ns	0,75 ns	0,82 ns	0,78 ns	0,86 ns	0,97 ns
CV	23,2%					
----- Massa seca total (g) -----						
Inoculado	4,03 ns	4,32 ns	5,01 ns	4,60 ns	3,88 ns	4,11 ns
Sem inoculação	4,38 ns	4,05 ns	4,04 ns	3,96 ns	4,22 ns	4,20 ns
CV	21,5%					

Em que: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, dentro de cada variável analisada, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$); ns = interação não significativa a 5% de probabilidade de erro pelo Teste F ($p \leq 0,05$). CV = coeficiente de variação.

ZEIGER, 2009), as doses desse elemento no solo, pode favorecer a maior produção deste pigmento. Entretanto, esse efeito das doses de Zn no índice de clorofila total não foi evidenciado nas mudas inoculadas com o fungo ectomicorrízico, podendo estar relacionado à capacidade de absorção de nutrientes, pela presença das hifas fúngicas na matriz do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Nesse caso, para obtenção do maior índice de clorofila, não haveria necessidade da adição de Zn a esse solo, ao efetuar a inoculação com o isolado UFSC-Pt116 em *Corymbia citriodora*.

Verifica-se efeito significativo das doses de Zn para o volume radicular das plantas inoculadas, revelando ponto de máxima em 750 mg kg⁻¹ de Zn no solo (Figura 1B). Provavelmente, por causa do estresse causado pela maior dose de Zn

(1.500 mg kg⁻¹), é possível que as plantas possam ter favorecido a associação ectomicorrízica, em detrimento do desenvolvimento das raízes (SMITH e READ, 2008). No entanto, é possível que haja efeito protetor pelas hifas do fungo que possuem capacidade de imobilizar metais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O volume radicular das plantas sem inoculação apresentou resposta cúbica à aplicação das doses crescentes de Zn no solo (Figura 1B). E o menor volume radicular foi com a dose de 392,37 mg kg⁻¹ de Zn, com ponto de inflexão em 833,33 mg kg⁻¹ de Zn e o maior volume radicular na dose 1.274,29 mg kg⁻¹ de Zn. Esse resultado corrobora com o relato de Graziotti et al. (2003) que consideraram esta espécie como tolerante aos metais pesados, com reduzida capacidade de retenção dos

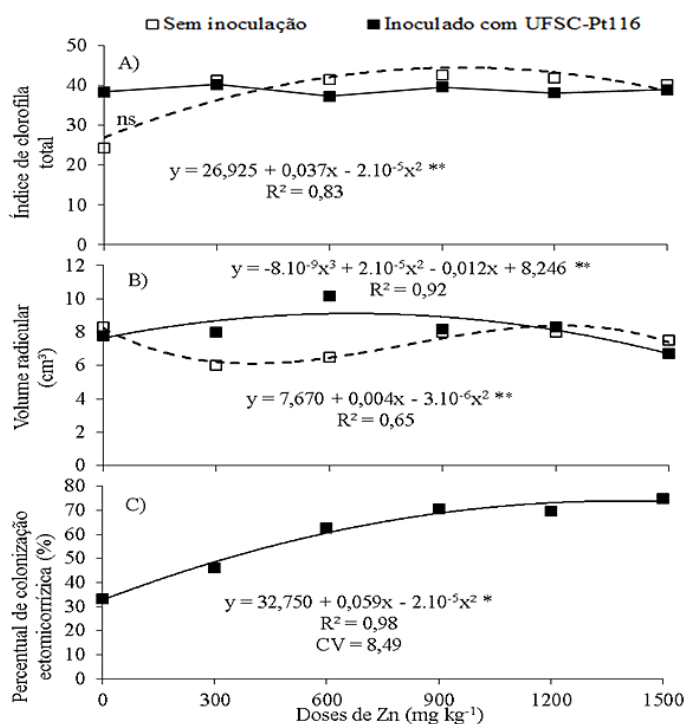


FIGURA 1: Equação de regressão e pontos médios referentes ao índice de clorofila total (A), volume radicular (B) e percentual de colonização ectomicorrízica (C) de *Corymbia citriodora*, com e sem inoculação com *Pisolithus microcarpus* UFSC - Pt116, em diferentes doses de Zn adicionadas ao solo. **Significativo a 1% de probabilidade de erro pelo Teste de F. ns = Pontos ligados por linha contínua não apresentaram diferença significativa para análise de regressão. na = sem ajuste de regressão. CV = Coeficiente de variação.

FIGURE 1: Regression Equation and midpoints for the content of chlorophyll (A), root volume (B) and percentage of colonization ectomicorrízica (C) *Corymbia citriodora*, with and without inoculation with *Pisolithus microcarpus* UFSC - Pt116, in different doses of Zn added to the soil. **Significant at 1% level of probability by F test ns = Points connected by solid line showed no significant difference in regression analysis. na = no regression adjustment. CV = variation coefficient.

metais nas raízes, e maiores teores na parte aérea, com provável mecanismo de destoxificação na parte aérea. Os resultados desse trabalho indicam a ativação de um provável mecanismo de tolerância a elevadas concentrações de Zn no solo por *Corymbia citriodora*.

A análise de regressão para o percentual de colonização ectomicorrízica revelou ponto de máxima em 1412,21 mg kg⁻¹ de Zn (Figura 1C). Esse resultado corrobora com o relato de Moreira e Siqueira (2006), no qual afirmam que *Pisolithus* sp. apresenta elevada tolerância a Zn. A produção de massa micelial em meio contaminado e a taxa de colonização da planta hospedeira é importante para a proteção das raízes (GRAZZIOTTI et al., 2003). Eucalipto submetido a proporções menores de solo contaminado com um total de 17.937 mg dm⁻³ de Zn, somado a outros metais pesados, aumentaram a colonização ectomicorrízica a ponto que proporções maiores de solo contaminado reduziram a colonização (SOARES et al., 2002).

Não houve interação significativa para as relações massa seca aérea/massa seca radicular e altura/diâmetro do colo (Tabela 3). Desmembraram-se os efeitos simples, verificando-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) somente na relação massa seca aérea/massa seca radicular para o fator (A) inoculação, na qual se observa menor valor nas mudas inoculadas com o isolado UFSC-Pt116 (Tabela 3). Isso demonstra que a inoculação de *Corymbia citriodora* com o isolado UFSC - Pt116

possibilitou maior massa seca radicular em relação à parte aérea das plantas e se manteve próximo do valor recomendado, que é de 2:1 (CALDEIRA et al., 2008). Esse resultado corrobora com Souza et al. (2004) que verificaram aumento de 38% da matéria seca radicular em *Eucalyptus dunnii*, quando inoculado com o isolado UFSC-Pt116 e pode ser atribuído ao aumento do número total de raízes secundárias e pela modificação estrutural das raízes, quando colonizadas por fungos ectomicorrízicos (SMITH e READ, 2008). Desse modo, a presença do isolado ectomicorrízico proporcionou distribuição equilibrada entre as partes transpirantes e absorptivas de água em relação ao tratamento sem inoculação.

Embora não tenha havido diferença significativa nem para os efeitos simples de tratamento, os valores da relação altura/diâmetro do colo foram próximos ou acima do valor máximo (8,1), considerado como ideal por Carneiro (1995) (Tabela 3). Os maiores valores foram obtidos em plantas inoculadas, demonstrando um maior crescimento em altura em relação ao diâmetro do colo (JOHNSON e CLINE, 1991). Possivelmente, esse resultado seja por causa da maior capacidade de absorção de nutrientes do solo pelas hifas dos fungos (KABATA-PENDIAS, 2010).

O modelo multivariado utilizado para avaliar os parâmetros das plantas nas diferentes doses de zinco demonstrou variabilidade dos parâmetros em relação às doses estudadas. Nesse sentido, os parâmetros relacionados ao volume

TABELA 3: Relação massa seca aérea/massa seca radicular e a relação altura/diâmetro do colo de *Corymbia citriodora*, inoculada com o isolado de fungo ectomicorrízico, UFSC - Pt116, e sem inoculação, cultivada em solo contaminado com doses crescentes de Zn.

TABLE 3: Relationship between dry mass / root dry mass and height / stem diameter *Corymbia citriodora*, inoculated with the ectomycorrhizal fungal isolate, *Pisolithus microcarpus* UFSC - Pt116 and without inoculation, grown in soil contaminated with increasing levels of Zn.

Tratamentos	Doses Zn (mg kg ⁻¹)						Média geral
	0	300	600	900	1.200	1.500	
----- Relação massa seca aérea/massa seca radicular -----							
Inoculado	2,15 ns	2,55 ns	2,18 ns	2,28 ns	1,09 ns	2,25 ns	2,08 b*
Sem inoculação	2,16 ns	2,61 ns	2,48 ns	2,32 ns	2,35 ns	2,76 ns	2,44 a
CV**	22,8%						21,20%
----- Relação altura/diâmetro do colo -----							
Inoculado	9,25 ns	8,53 ns	7,74 ns	7,94 ns	8,2 ns	8,53 ns	-
Sem inoculação	7,57 ns	8,39 ns	8,36 ns	8,47 ns	7,39 ns	7,16 ns	-
CV	13,03%						-

Em que: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ns = interação não significativa pelo Teste F ($p \leq 0,05$). CV = coeficiente de variação.

radicular, massa seca radicular, massa seca aérea e massa seca total apresentaram tendência de associação com o tratamento submetido à dose de 600 mg kg⁻¹ de zinco quando inoculado com o isolado ectomicorrízico (Figura 2). Esse resultado indica capacidade da ectomicorriza em possibilitar o crescimento de planta, em condições de excesso de metais. Não foi observada relação do tratamento 600 mg kg⁻¹ de zinco sem inoculação micorrízica com os parâmetros avaliados.

A clorofila apresentou associação com as doses 300, 600 e 900 mg kg⁻¹ de zinco sem inoculação ectomicorrízica, enquanto que a relação massa seca aérea/massa seca radicular apresentaram relação com a dose 1200S e em menor escala com a dose 1500S. Entretanto, os valores da relação massa seca aérea/massa seca radicular ficaram acima do considerado adequado para o transplante da muda

para o campo (Tabela 3).

CONCLUSÕES

A associação micorrízica do fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 com *Corymbia citriodora* é estimulada pelo acréscimo de até 1412,21 mg kg⁻¹ de Zn no solo.

O *Corymbia citriodora* é tolerante à adição de até 1500 mg kg⁻¹ de zinco em solo com 81% de argila, mesmo sem a inoculação com *Pisolithus microcarpus*.

A inoculação com *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 favorece a massa seca radicular, massa seca da parte aérea e total de *Corymbia citriodora* cultivada em solo com 81% de argila contaminada com 600 mg kg⁻¹ de Zn, isto evidenciado pela análise de correlação canônica.

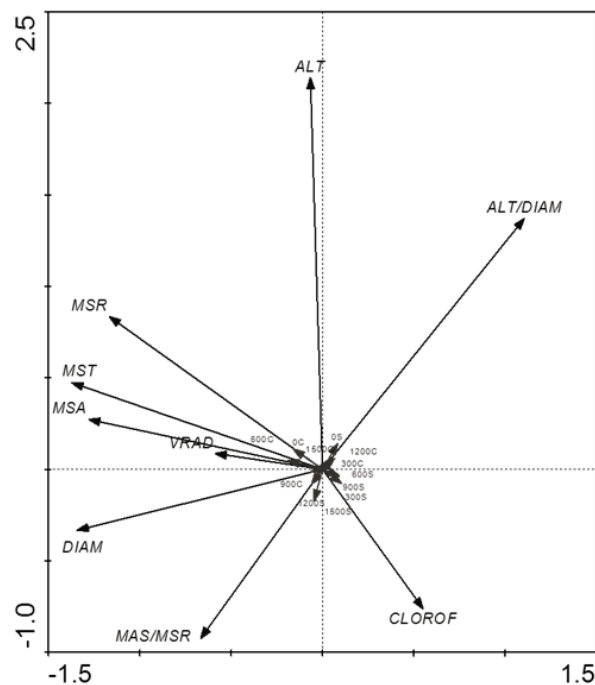


FIGURA 2: Representação gráfica da análise de correlação canônica (CCA) da altura (ALT), altura/diâmetro (ALT/DIAM), clorofila (CLOROF) massa aérea seca/massa seca radicular (MAS/MSR), diâmetro (DIAM), volume radicular (VRAD), massa seca aérea (MAS), massa seca total (MST), massa seca radicular (MSR), de mudas de *Corymbia citriodora* submetidas às doses 0, 300, 600, 900, 1200, 1500 mg kg⁻¹ de zinco, com (C) e sem (S) inoculação ectomicorrízica com *Pisolithus microcarpus* UFSC - Pt116. Frederico Westphalen, 2013.

FIGURE 2: Graphical representation of the canonical correlation analysis (CCA) height (ALT), height / diameter (ALT / DIAM), chlorophyll (chlorofluorocarbon) dry weight / dry root biomass (MAS / MSR), diameter (DIAM) root volume (VRAD), dry mass (MAS), total dry matter (TDM), root dry mass (RDM), *Corymbia citriodora* seedlings subjected to doses 0, 300, 600, 900, 1200, 1500 mg kg⁻¹ zinc, with (C) and without (S) ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus microcarpus* UFSC - Pt116. Frederico Westphalen, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário estatístico da ABRAF 2012, ano base 2011**. Brasília, DF, 2012. 150 p.
- ALVES, A. M. C. et al. Quantificação da produção de biomassa em clones de eucaliptos com 4,5 anos, no polo gesseiro do Araripe-PE. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 48, p.161-173, 2007.
- ANDREAZZA, R. et al. Espécies de *Pisolithus* sp. na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, p. 51-59, 2004.
- BELLION, M. et al. COURBOT, M.; JACOB, C.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 254, p. 173-181, 2006.
- BORGES JR, M. et al. Valores de referência local e avaliação da contaminação por Zn em solos adjacentes a áreas mineradas no município de Vazante-MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2883-2893, 2008.
- BOUGHER, N.L.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* B. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. **New Phytologist**, Lancaster, v. 114, p. 77-85, 1990.
- BROWN, S. L. et al. Using municipal biosolids in combination with other residuals to restore metal-contaminated mining areas. **Plant Soil**, Grahamstown, v. 249, p. 203-215, 2003.
- BRUNDRETT, M. et al. **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400 p.
- BRUNDRETT, M. C. **Mycorrhizal Associations: The Web Resource**. 2008. Disponível em: <mycorrhizas.info>. Acesso em: 05 nov. 2012.
- CALDEIRA, M. V. W. et al. Composto orgânico na produção de mudas de aroeira-vermelha. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, p. 27-33, 2008.
- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba, UFPR/FUPEF, 1995. 451 p.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**. Diretoria de controle e licenciamento ambiental. 2005. (Decisão de diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005).
- CHANG, A. C.; PAGE, A. L. Trace elements slowly accumulating, depleting in soils. **California Agriculture**, California, v. 54, p. 49-55, 2000.
- COURBOT, M. et al. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 7413-7417, 2004.
- DACH, J.; STARMANS, D. Heavy metals balance in Polish and Dutch agronomy: Actual state and previsions for the future. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, New York, v.107, p. 309-316, 2005.
- EBBS, S.D.; KOCHIAN, L.V. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 32, p. 802-806, 1998.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997, 212 p.
- EPA. U.S. - Environmental Protection Agency. **Introduction to Phytoremediation**. Cincinnati, OH: National Risk Management Research Laboratory / Office of Research and Development/ Environmental Protection Agency. 2000. 105 p. Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em: 14 out. 2012.
- EPA. U.S. - Environmental Protection Agency. **Use of Field-Scale Phytotechnology for Chlorinated Solvents, Metals, Explosives and Propellants, and Pesticides**. Cincinnati, OH: Environmental Protection Agency. 2005. 14 p. Disponível em: <<http://www.cluin.org/download/remed/542-r-05-002.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2012.
- FALKER – Automação agrícola. **Medidor Eletrônico de Teor de Clorofila: Dados Técnicos clorofLOG CFL1030**. Rev. C – Set. 2009. 6 p. Disponível em: http://www.falker.com.br/download.php?file_id=74>. Acesso em 27 de dez. 2012.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Recife, v. 6, p. 36-41. 2008.
- GARCÍA, G.; FAZ, Á.; CUNHA, M. Performance of *Piptatherum miliaceum* (Smilo grass) in edaphic Pb and Zn phytoremediation over a short growth period. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Lodz, v. 54, p. 245-250, 2004.
- GONZALEZ, J. A. Z. et al. Acúmulo de ácido oxálico e cristais de cálcio em ectomicorrizas

- de eucalipto. i - produção de ácido oxálico e concentração de nutrientes em raízes laterais finas colonizadas por fungos ectomicorrízicos. Seção III – Biologia do Solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, 33, p. 541-553, 2009.
- GRAMATYKA, P.; NOWOSIELSKI, R.; SAKIEWICZ, P. Recycling of waste electrical and electronic equipment. **Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering**, Gliwice, v. 20, p. 535-538, 2007.
- GRAZZIOTTI, P. H. **Comportamento de fungos ectomicorrízicos, *Acácia mangium* e espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* em solo contaminado por metais pesados**. 1999. 177 p. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG, 1999.
- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso e metais pesados. In: CURI, R. F.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; LOPES, A. S.; ALVARES V., V. H. (Eds). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 3, p. 55-105, 2003.
- GRACE, C.; STRIBLEY, D. P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 1160-1162, 1991.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA: University of California, (California Agricultural Experiment Station). Circular, 1951. 347 p. Disponível em: <<http://www.cluin.org/download/remed/542-r-05-002.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2012.
- HOODA, P. S. **Trace Elements in Soils**. Ed. 1. United Kingdom: Wiley-Blackwell. 2010. 616 p. ITRC - Interstate Technology & Regulatory Council. **Emerging technologies for the remediation of metals in soils - Phytoremediation**. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Phytotechnologies Team, Tech Reg Update. 1997. Disponível em: <www.itrcweb.org>. Acesso em: 05 out. 2012.
- ITRC - Interstate Technology & Regulatory Council. **Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised. PHYTO-3**. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Phytotechnologies Team, Tech Reg Update. 2009. Disponível em: <www.itrcweb.org>. Acesso em: 06 out. 2012.
- JOHNSON, J. D.; CLINE, P. M. Seedling quality of southern pines. In: DUREYA, M. L.; DOUGHERTY, P. M. (Eds.). **Forest regeneration manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.143-162. 1991.
- KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. Ed. 4. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2010. 548 p.
- KOS, B.; GRČMAN, H.; LEŠTAN, D. Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. **Plant Soil Environment**, Praha, v. 49, p. 548-553, 2003.
- LIMA, E. V. et al. Adubação NK no desenvolvimento e na concentração de macro-nutrientes no florescimento do feijoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, p.125-129, 2001.
- LINCOLN, J. D. et al. Leaching assessments of hazardous materials in cellular telephones. **Environmental Science & Technology**, Berkeley, v. 41, p. 2572-2578, 2007.
- MAGALHÃES, M. O. L. et al. Potencial de duas espécies de eucalipto na fitoestabilização de solo contaminado com zinco. **Revista Ciência Agrônômica**, Ceará, v. 42, p. 805-812, 2011.
- MARX, D. H. 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**, Saint Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.
- MELLO, A. H. et al. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 3, p. 293-301, 2006.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras - MG: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- PULFORD, I. D.; WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees, a review. **Environment International**, v. 29, p. 529-540, 2003.
- PUNSHON, T.; DICKINSON, N. M.; LEPP, N. W. The potential of *Salix* clones for bioremediating metal polluted soil. In: GLIMMERVEEN, I. (Ed). **Heavy metals and trees: Proceedings of a Discussion Meeting**, Glasgow. Edinburgh: Institute of Chartered Foresters, p. 93-104, 1996.
- RAMOS, S. et al. Uso do silício na redução da toxidez de zinco em mudas de eucalipto. **Interciência**, v. 34, p. 189-194. 2009.
- SANTOS, H. G. dos. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.

- SCHUMACHER, M. V.; CALDEIRA, M. V. W. Estimativa da biomassa e do conteúdo de nutrientes de um povoamento de *Eucalyptus globulus* (Labillardière) sub-espécie *maidenii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, p. 45-53. 2001.
- SILVA, P. H. M. et al. Produção de óleo essencial e balanço nutricional em *Corymbia citriodora* adubado com lodo de esgoto em diferentes espaçamentos. **Cerne**, Lavras, v.15, p. 346-354. 2009.
- SMITH, H.J.; HENSON, M.; BOYTON, S. Forests NSW' spotted gum (*Corymbia* spp.) tree improvement and deployment strategy. **Proceeding of the inaugural Australasian Forest Genetics Conference**, Breeding for Wood Quality, Tasmania. 10–14 April 2007.
- SMITH, S. E.; READ, D. **Mycorrhizal Symbiosis**. Ed. 3., London: Elsevier, Academic Press. 2008. 800 p.
- SBCS – Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/ Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/ SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 2004. 400 p.
- SOARES, C. R. F. S. et al. Diagnóstico e reabilitação de área degradada pela contaminação por metais pesados. CEMAC; **V Simpósio Nacional sobre Recuperação de Áreas Degradadas**. Lavras, v. 1, p. 56-82. 2002.
- SOUSA, N. R. et al. Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. **Journal of Environmental Management**. v. 95, Supplement p. 269–274. March 2012.
- SOUZA, L. A. B.; FILHO, G. N. S.; OLIVEIRA, V. L. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 349-355, 2004.
- SWEDISH EPA - Swedish Environmental Protection Agency. **Recycling and disposal of electronic waste**. Health hazards and environmental impacts. Stockholm, Sweden. report 6417, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre-RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).
- VILAS BÔAS, O.; MAX, J. C. M.; MELO, A. C. G. Crescimento comparativo de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* no município de Marília, SP. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 21, p. 63-72, 2009.
- VITAL, M. H. F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 235-276, 2007.