

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES FLORESTAIS  
ARBÓREAS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS AO  
COBRE**

**TESE DE DOUTORADO**

**RODRIGO FERREIRA DA SILVA**

**Santa Maria, RS, Brasil,  
2007**

# **TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS AO COBRE**

**“por”:**

**Rodrigo Ferreira da Silva**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Ciência do Solo**

**Orientadora: Prof. Dra. Zaida Inês Antonioli**

Santa Maria, RS, Brasil

2007

S586t Silva, Rodrigo Ferreira da  
Tolerância de espécies florestais arbóreas e fungos ectomicorrízicos  
ao cobre / Rodrigo Ferreira da Silva. – Santa Maria, 2007.  
134 f.

Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Centro de Ciências Rurais  
da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

Orientadora: Zaida Inês Antonioli.

1. Micorriza. 2. Tolerância. 3. Metal pesado. 4. Plantas nativas.  
I. Título.

CDU 631.4

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS E  
FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS AO COBRE**

Elaborada por  
**Rodrigo Ferreira da Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Ciência do Solo**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Zaida Inês Antonioli, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientador)

**Afranio Almir Righes, Dr.** (UNIFRA)

**Rodrigo Seminoti Jacques, Dr.** (UNIPAMPA)

**Solon Jonas Longhi, Dr.** (UFSM)

**Vetúria Lopes de Oliveira, Dr<sup>a</sup>.** (UFSC)

Santa Maria, 13 de Dezembro de 2007

*A você minha mãe,  
que sempre acreditou em minha capacidade  
e mesmo só, é incansável na busca,  
pela vitória,  
daqueles que ama.*

*...EU DEDICO*

## Agradecimentos

À Deus, pois somente através Dele é possível explicar a superação diária dos momentos difíceis em nossas vidas. *“O senhor é o meu pastor, nada me faltará”*.

À professora Zaida Inês Antoniulli pela orientação, mas acima de tudo, pela amizade e ensinamentos diários que me proporcionou durante esses anos de convivência.

À FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) de Santa Maria – RS, pelas sementes doadas e auxílio técnico. Principalmente, ao Diretor Nelson Henrique Abiatti da Silva e Fabio Luíz Fleig Saidelles pelo suporte a pesquisa e orientações.

Aos bolsistas Carlos Moro Junior, Lineu Leal e Manuele Lupatini pela convivência, amizade, ajuda responsável durante a execução deste trabalho e pelos finais de semanas e feriados dedicados a pesquisa.

Ao Laboratorista Antônio Bassaco pela amizade e ajuda quando necessitada, sempre realizada com boa vontade.

Aos colegas de curso Robson Andreazza e Ricardo Bemfica Steffen, pelo dia a dia compartilhado juntos, amigos que serão sempre lembrados como pessoas íntegras e de bom coração.

À meus pais, José Cabral de Silva (*in memoriam*) e Maria Emilia Ferreira da Silva, a meu irmão, cunhada e sobrinhos pelo apoio constante e por mostrar-me que a vida pode ser melhor com muita luta e amor.

À Dalvana de Souza Ferreira pela ajuda, apoio, carinho e amor, pois sempre que precisei foste incondicional.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS E FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS AO COBRE**

Autor: Rodrigo Ferreira da Silva  
Orientadora: Zaida Inês Antonioli  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de Dezembro de 2007

A contaminação do solo por cobre tem contribuído negativamente para o estabelecimento de plantas em áreas de mineração e áreas vinícolas do sul do Brasil. Espécies florestais micorrizadas podem ser uma alternativa para viabilizar o desenvolvimento de plantas em áreas contaminadas por metais. O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Solos, no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria; na FEPAGRO – FLORESTA, Santa Maria e nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS. A primeira etapa objetivou avaliar a ocorrência de associação micorrízica nas espécies florestais *Luehea divricata* Mart. et Zucc. (açoita-cavalo), *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan (angico-vermelho), *Peltophorum dubium* (Sprengel) Tauber. (canafístula), *Cedrela fissilis* Vell. (cedro), *Eugenia involucrata* Dc. (cerejeira), *Ficus puschnathiana* (Miq.) Miq. (figueira-do-mato), *Apuleia leiocarpa* (J. Vogel) J.F. Macbr. (grápia), *Inga marginata* Willd. (ingá-feijão), *Tabebuia Alba* (Cham.) Sandwith (ipê-ouro), *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (timbaúva), *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (tipuana) e *Phytolacca dioica* L. (umbu). As coletas de raízes e de solo foram realizadas no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria e em mata nativa no distrito municipal de Boca do Monte, Santa Maria, RS. Nenhuma das espécies estudadas apresentaram associação com fungos ectomicorrízicos em ambiente natural. Raízes de açoita-cavalo, angico-vermelho, canafístula, cedro, figueira, ingá-feijão, ipê-ouro, ipê roxo, timbaúva, tipuana e umbu apresentam micorrizas arbusculares. Um segundo experimento foi desenvolvido para selecionar fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura líquido e sólido. Os fungos testados no meio de cultura sólido foram: *Pisolithus microcarpus* – UFSC-Pt116,

*Suillus* sp. – UFSM RA2.8, *Suillus* sp. – UFSM RA118, *Scleroderma* sp. – UFSM SC3.6 e *Scleroderma* sp. – UFSC-Sc124. No meio de cultura líquido foram testados os fungos: *Pisolithus microcarpus* – UFSC-Pt116, *Pisolithus tinctorius* – UFSC-Pt24, *Scleroderma* sp. – UFSC Sc124, o fungo UFSM MC e o UFSM RA2.8. O fungo UFSC-Pt116 apresentou tolerância ao cobre e produziu maior quantidade de massa seca do micélio fúngico. Posteriormente, caracterizou-se a formação de ectomicorrizas em plântulas de angico-vermelho, canafístula, grápia e timbaúva cultivadas *in vitro*, inoculadas com o fungo UFSC-Pt116. Plântulas de angico-vermelho, canafístula e timbaúva formam associação com fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116. Estudou-se a região do espaço interno transcrito e analisaram-se as diferenças no polimorfismo da seqüência desta região no isolado UFSC-Pt116 com as seqüências dos isolados de *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon* e *Suillus* do GenBank. Confirmou-se a identificação morfológica do isolado como pertencente ao gênero *Pisolithus*. Contudo, com os resultados moleculares não foi possível confirmar a espécie do fungo. A segunda etapa objetivou avaliar o comportamento de angico-vermelho, canafístula, cedro e timbaúva tolerantes ao cobre. Mudanças de cedro acumulam cobre na parte aérea e radicular. Mudanças de timbaúva acumulam cobre na raiz da planta, não o translocam para a parte aérea. O angico-vermelho pode ser considerado uma planta exclusora de cobre. Canafístula, angico-vermelho e timbaúva apresentaram maior tolerância a solo contaminado por cobre. A terceira etapa objetivou avaliar o comportamento de mudas de canafístula inoculadas com fungo ectomicorrízico em solo com excesso de cobre. O fungo ectomicorrízico utilizado como inoculante foi o isolado UFSC-Pt116. O incremento das doses de cobre reduziu o comprimento radicular, área superficial específica radicular, altura e diâmetro das plantas de canafístula. Mudanças de canafístula inoculadas com fungo ectomicorrízico apresentaram menor teor de cobre em seu tecido e reduziram a absorção de cobre em dose mais elevada. Concluiu-se que os isolados UFSC-Pt116, UFSC-Pt24 e UFSC-Sc124 foram eficientes *in vitro* na produção de micélio com elevada quantidade de cobre. O isolado UFSC-Pt116 não respondeu suficientemente para favorecer o desenvolvimento de canafístula em solo com excesso de cobre. Entretanto, este isolado reduziu a absorção de cobre pela planta.

Palavras-chave: micorriza; tolerância; metal pesado; plantas nativas.



## ABSTRACT

Thesis The Doctored  
Soil Science Pós-Graduated Program  
Santa Maria Federal University, RS, Brazil

### TOLERANCE ARBOREAL FORESTRY SPECIES AND ECTOMYCORRHIZAL FUNGI OF THE COPPER

Autor: Rodrigo Ferreira da Silva  
Orientadora: Zaida Inês Antonioli  
Date and Local of the defense: Santa Maria, December 2007

The contamination of soil for copper had refusal contribute to plants establishment in mining and vineyards areas of South Brazil. Mycorrhizal forestry species could be one alternative to viable the development of plants in contaminated areas for heavy metals. The work was developed at Soil Department and Botanical Garden, in Federal University of Santa Maria; FEPAGRO- FLORESATA, Santa Maria-RS and Camaquã Mines, RS. Firstly, it was evaluated the mycorrhizal occurrence in forestry species like *Luehea divricata* Mart. et Zucc., *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan, *Peltophorum dubium* (Sprengel) Tauber., *Cedrela fissilis* Vell., *Eugenia involucrata* Dc., *Ficus puschnathiana* (Miq.) Miq., *Apuleia leiocarpa* (J. Vogel) J.F. Macbr., *Inga marginata* Willd., *Tabebuia Alba* (Cham.) Sandwith, *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo, *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong., *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze and *Phytolacca dioica* L. Roots and soil sampling were performed at Botanical Garden of Federal University of Santa Maria and in native forest on Boca do Monte, district of Santa Maria, RS. No one of studied species had found ectomycorrhizal association in natural environment conditions. Roots of *Luehea divricata*, *Parapiptadenia rigida*, *Peltophorum dubium*, *Cedrela fissilis*, *Ficus puschnathiana*, *Ingá marginata*, *Tabebuia Alba*, *Tabebuia heptaphylla*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Tipuana tipu* and *Phytolacca dioica* had arbuscular mycorrhizal. An experiment in liquid and solid culture medium was conducted to select copper tolerant ectomycorrhizal fungi. The fungi tested in solid medium were: *Pisolithus microcarpus* – UFSC-Pt116, *Suillus* sp. – UFSM RA2.8, *Suillus* sp. – UFSM RA118, *Scleroderma* sp. – UFSM SC3.6 and *Scleroderma* sp. – UFSC-Sc124. In liquid culture medium were tested the species: *Pisolithus microcarpus* – UFSC-Pt116, *Pisolithus*

*tinctorius* – UFSC-Pt24, *Scleroderma* sp. – UFSC-Sc124, UFSM MC and UFSM RA2.8. The fungi UFSC-Pt116 showed copper tolerance and produced high amount of fungi mycelium. Latter, it was characterized ectomycorrhizal on *Parapiptadenia rigida*, *Peltophorum dubium*, *Apuleia leiocarpa* and *Enterolobium contortisiliquum* seedlings *in vitro* conditions, cultivated and previously inoculated with the ectomycorrhizal fungi UFSC-Pt116. Seedlings of *Parapiptadenia rigida*, *Peltophorum dubium* and *Enterolobium contortisiliquum* was formed association with UFSC Pt 116. The region of transcribed internal space was studied and evaluated the differences in sequencing polymorphism of this region of isolated UFSC-Pt116, it was compared to other ectomycorrhizal fungi like *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon* and *Suillus* available in the GenBank data. It was confirmed the morphological identification of the isolates as belonging to the genus *Pisolithus*. However, with molecular results did not confirm the species of this fungus. The second part, it was evaluated the tolerance to copper for forestry species like *Parapiptadenia rigida*, *Peltophorum dubium*, *Cedrela fissilis* and *Enterolobium contortisiliquum*. Seedlings of *Cedrela fissilis* was evidenced copper accumulation on leaves, stem and roots. Seedlings of *Enterolobium contortisiliquum* was accumulated copper on roots, but the metal was not translocated to stem and leaves. It is possible to consider *Parapiptadenia rigida* as a copper excluding plant. *Peltophorum dubium*, *Parapiptadenia rigida* and *Enterolobium contortisiliquum* was showed high tolerance to contaminated soil with copper. The thirdly part, it was evaluated the behavior *Peltophorum dubium* seedlings inoculated with the UFSC Pt 116 ectomycorrhizal fungi in soil with high copper concentrations. The increasing of copper doses was reduced root length, specific root surface area, height and stem diameter of *Peltophorum* plants. Seedlings of inoculated *Peltophorum* were showed less copper concentration on tissues and reduced copper absorption on more elevated doses. It was concluded that isolates UFSC-Pt116, UFSC-Pt24 and UFSC-SC124 were efficient on mycelium production in medium with high copper amounts. The isolated UFSC-Pt116 was not efficient to promote *Peltophorum* growth in soil with high copper concentration, but this isolated was reduced the copper absorption for plant.

Key-words: ectomycorrhizal; tolerance; heavy metals; native plants.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Presença (+) ou ausência (-) de colonização micorrízica arbuscular (MA) e ectomicorrízica (ECM) em 13 espécies florestais na região central do Estado do Rio Grande do Sul, 2006.....	29
TABELA 2 - Porcentagem de colonização e ocorrência de associação micorrízica por micorriza arbuscular em raízes de 13 espécies florestais na região central do Estado do rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2006.....	31
TABELA 3 - Comprimento radicular, massa radicular fresca (MRF) e altura da parte aérea de plântulas de grápia, canafístula, angico e timbaúva nos tratamentos sem e com inoculação do fungo ectomicorrízico UFSC Pt 116. UFSM, Santa Maria, 2006.....	71
TABELA 4 - Lista de fungos ectomicorrízicos do GenBank utilizados para comparação da seqüência ITS com o fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC-Pt116.....	86
TABELA 5 - Massa seca da parte aérea (g) de mudas de canafístula ( <i>Peltophorum dubium</i> ), cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> ), angico-vermelho ( <i>Parapiptadenia rigida</i> ) e timbaúva ( <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ) nas diferentes doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	103
Tabela 6. Características gerais do solo utilizado no experimento em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2006.....	119
TABELA 7 - Teor de cobre (Cu) e porcentagem de colonização micorrízica (CM) de mudas de <i>Peltophorum dubium</i> cultivada nas diferentes doses de cobre inoculadas e não inoculadas com fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC-Pt116. Santa Maria, 2006.....	123
TABELA 8 - Comprimento radicular e área superficial específica radicular (ASE) de mudas de <i>Peltophorum dubium</i> cultivadas nas diferentes doses de cobre, inoculadas e não inoculadas com fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116. Santa Maria, 2006.....	125

TABELA 9 - Diâmetro do colo, altura de planta e massa seca da parte aérea (MSPA) de mudas de *Peltophorum dubium* inoculadas e não inoculadas com fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116. Santa Maria, 2006..... 126

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Presença de hifas de fungo micorrízico arbuscular em raízes de açoita-cavalo (a), angico-vermelho (b), canafístula (c), cedro (d), figueira-do-mato (e), ipê-ouro (f), timbaúva (g), tipuana (h) e umbu (i). Santa Maria, RS, 2006.....	32
FIGURA 2 - Diâmetro médio do micélio de fungos ectomicorrízicos: UFSC-Pt116, UFSC-Sc124, UFSM 3.6, UFSM RA 2.8 e UFSM RA 118 submetidos a doses de cobre em meio de cultura sólido, com 30 dias de incubação a 28 °C.....	48
FIGURA 3 - Massa seca do micélio de fungos ectomicorrízicos: UFSC-Pt116, UFSC-Sc124, UFSM 3.6, UFSM RA 2.8 e UFSM RA 118 submetidos a doses de cobre em meio de cultura sólido, com 30 dias.....	49
FIGURA 4 - Produção total de pigmentos extracelulares expressas pela absorbância a 360 nm na solução do meio de cultura sólido (MNM) com dose crescente de cobre.....	50
FIGURA 5 - Diâmetro médio do micélio de fungos ectomicorrízicos submetidos a doses crescentes de cobre em meio de cultura MNM líquido.....	51
FIGURA 6 - Massa seca do micélio de fungos ectomicorrízicos UFSC-Pt24, UFSC-Pt116, UFSC-Sc124, UFSM MC e UFSM RA 2.8 em resposta a doses de cobre em meio de cultura MNM líquido.....	52
FIGURA 7 - Produção total de pigmentos extracelulares (a) e produção específica de pigmentos extracelulares (b) expressa pela absorbância a 360 nm na solução do meio de cultura (MNM) com doses crescentes de cobre.....	54
FIGURA 8 - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de <i>Parapiptadenia rígida</i> sem colonização micorrízica; morfologia externa (b) e interna (d,e) mostrando raízes com colonização micorrízica. Santa Maria, 2006.....	67
FIGURA 9 - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de <i>Peltophorum dubium</i> sem	

colonização micorrízica; morfologia externa (b) e interna (d, e) mostrando raízes com colonização micorrízica. Santa Maria, 2006.....	68
FIGURA 10 - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de <i>Apuleia leiocarpa</i> não colonizadas; morfologia externa (b) e interna (d, e) mostrando a possível presença da associação micorrízica. Santa Maria, 2006.....	69
FIGURA 11 - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> não inoculadas; morfologia externa (b) e interna (d,e) indicando raízes com colonização micorrízica. Santa Maria, 2006.....	70
FIGURA 12 - Esquema de uma seqüência do DNA mostrando a estrutura do gene do rRNA das células de eucariotos. Espaço intergênico (IGS), subunidade pequena (SSU) do rRNA; subunidade maior (LSU) do rRNA, espaço interno transcrito (ITS1 e ITS2), espaço não transcrito (NTS) e espaço interno transcrito (ITS).....	80
FIGURA 13 - Posição dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 utilizados para amplificar a região ITS do rRNA.....	84
FIGURA 14 - Região ITS amplificada do fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC-Pt116 e o número de bases encontradas (a). Foto do produto da PCR em gel de agarose (b). Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco (M) indicando amostras da amplificação da região ITS via PCR (P1 e P2).....	88
FIGURA 15 - Cladograma baseado na análise de grupamento pelo método de ligação simples (vizinho mais próximo) da região ITS com base em 1000 réplicas de <i>bootstrap</i> . Os números das ramificações representam o valor do <i>bootstrap</i> . Os Fungos de gênero <i>Suillus</i> spp., <i>Rhizopogon</i> spp. e <i>Scleroderma</i> spp. foram adicionados como “outgroup”....	89
FIGURA 16 - Massa seca da parte aérea (MSPA) de mudas de canafístula ( <i>Peltophorum dubium</i> ), cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> ), angico-vermelho ( <i>Parapiptadenia rigida</i> ) e timbaúva ( <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	104
FIGURA 17 - Altura de mudas de mudas de canafístula ( <i>Peltophorum dubium</i> ), cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> ), angico-vermelho ( <i>Parapiptadenia rigida</i> ) e timbaúva ( <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	105
FIGURA 18 - Comprimento radicular (CR) de mudas de canafístula ( <i>Peltophorum dubium</i> ), cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> ), angico-vermelho ( <i>Parapiptadenia rigida</i> ) e timbaúva ( <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	106
FIGURA 19 - Área superficial específica radicular (ASE) de mudas de canafístula	

( <i>Peltophorum dubium</i> ), cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> ), angico-vermelho ( <i>Parapiptadenia rigida</i> ) e timbaúva ( <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	107
FIGURA 20 - Teor de cobre na parte aérea (Cu PA) de mudas de canafístula ( <i>Peltophorum dubium</i> ), cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> ), angico-vermelho ( <i>Parapiptadenia rigida</i> ) e timbaúva ( <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	108
FIGURA 21 - Teor de cobre na raiz de mudas de canafístula ( <i>Peltophorum dubium</i> ), cedro ( <i>Cedrela fissilis</i> ), angico-vermelho ( <i>Parapiptadenia rigida</i> ) e timbaúva ( <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ) submetidas às doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	109
FIGURA 22 - Diâmetro (a), altura (b) e massa seca da parte aérea (MSPA) (c) de mudas de <i>Peltophorum dubium</i> nas diferentes doses de cobre. Santa Maria, 2006.....	127

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
SUMÁRIO.....	15
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
<b>CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM TREZE ESPÉCIES FLORESTAIS NA REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.....</b>	<b>21</b>
RESUMO.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 Espécies florestais estudadas.....	25
2.2 Caracterização das áreas de coleta.....	25
2.3 Coleta e acondicionamento das amostras.....	26
2.4 Coleta, isolamento e multiplicação de fungos ectomicorrízicos.....	26
2.5 Avaliação da associação micorrízica.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4 CONCLUSÕES.....	34
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
<b>CAPÍTULO II: TOLERÂNCIA AO COBRE NO CRESCIMENTO “in vitro” DOS FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS <i>Pisolithus microcarpus</i>, <i>Pisolithus tinctorius</i>, <i>Scleroderma</i> sp. e <i>Suillus</i> sp.....</b>	<b>39</b>
RESUMO.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura sólido.....	43
2.1.1 Isolados ectomicorrízicos estudados.....	43
2.1.2 Procedimento experimental.....	43
2.1.3 Delineamento Experimental.....	44
2.1.4 Avaliação dos resultados.....	44



<b>2.2</b>	<b>Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura líquido.....</b>	<b>44</b>
2.2.1	Isolados ectomicorrízicos estudados.....	44
2.2.2	Procedimento experimental.....	45
2.2.3	Delineamento Experimental.....	45
2.2.4	Avaliação dos resultados.....	45
2.2.5	Análise estatística.....	46
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura sólido.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura líquido.....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
	<b>CAPÍTULO III: CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS ENTRE UM ISOLADO FÚNGICO E ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS.....</b>	<b>60</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>60</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
2.1	Espécies nativas estudadas e origem das sementes.....	64
2.2	Fungo ectomicorrízico.....	64
2.3	Preparo das sementes.....	64
2.4	Germinação das sementes.....	65
2.5	Procedimento experimental.....	65
2.6	Avaliação dos resultados.....	66
2.7	Análise estatística.....	66
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
	<b>CAPÍTULO IV: CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DO ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS) DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO <i>Pisolithus microcarpus</i> (Cooke &amp; Masee) Cunn. UFSC-Pt116.....</b>	<b>78</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>78</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
2.1	Manutenção do isolado.....	83
2.2	Extração do DNA.....	83
2.3	Reação da Polimerase em Cadeia.....	84
2.4	Purificação e sequenciamento do DNA.....	85
2.5	Análise da seqüência.....	85
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

<b>CAPÍTULO V: COMPORTAMENTO DE CANAFÍSTULA, CEDRO, ANGICO-VERMELHO E TIMBAÚVA A SOLO CONTAMINADO DE COBRE.....</b>	<b>95</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>95</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
<b>2.1 Solo.....</b>	<b>99</b>
<b>2.2 Essências florestais.....</b>	<b>99</b>
<b>2.3 Delineamento experimental.....</b>	<b>100</b>
<b>2.4 Condução do experimento.....</b>	<b>100</b>
<b>2.5 Parâmetros analisados.....</b>	<b>100</b>
2.5.1 Altura de planta.....	101
2.5.2 Massa seca da parte aérea e do sistema radicular.....	101
2.5.3 Comprimento radicular.....	101
2.5.4 Área superficial específica radicular.....	102
2.5.5 Análise química.....	102
<b>2.6. Análise estatística.....</b>	<b>102</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO VI: TOLERÂNCIA DE CANAFÍSTULA INOCULADA COM O FUNGO <i>Pisolithus microcarpus</i> UFSC-Pt116 A SOLO CONTAMINADO DE COBRE.....</b>	<b>116</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>116</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>119</b>
<b>2.1 Solo.....</b>	<b>119</b>
<b>2.2 Espécie florestal.....</b>	<b>119</b>
<b>2.3 Inoculante ectomicorrízico.....</b>	<b>120</b>
<b>2.4 Delineamento experimental.....</b>	<b>120</b>
<b>2.5 Determinação na planta.....</b>	<b>120</b>
<b>2.6. Análise estatística.....</b>	<b>122</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>123</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>128</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>129</b>
<b>3 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>134</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação do solo por cobre tem se tornado comum em atividades de mineração e também em áreas vinícolas do sul do Brasil, tornando-se um problema ambiental. No Rio Grande do Sul, a contaminação do solo por cobre decorre, principalmente, da utilização de fungicidas a base de cobre aplicado em cultivos vinícolas, nas regiões de imigração italiana. Nessas regiões, tem-se detectado concentração de cobre solúvel superior a  $300 \text{ mg kg}^{-1}$ , mesmo em solo da ordem dos Cambissolos, com elevado teor de matéria orgânica (GIOVANNINI, 1997). Também, encontra-se contaminação por cobre nas Minas do Camaquã. As Minas do Camaquã é uma região pertencente ao município de Caçapava do sul, a qual foi explorada pela mineração de cobre e ouro. As plantas cultivadas nessas regiões apresentam redução em seu desenvolvimento. Nesse sentido, a inoculação de plantas com microrganismos do solo poderá ser uma alternativa para proporcionar melhor desenvolvimento vegetal em áreas contaminadas por cobre.

O cobre é um elemento químico essencial para as plantas. Ele participa como catalisador de reações bioquímicas, no metabolismo de carboidratos, do nitrogênio, na síntese de clorofila e na constituição de proteínas das plantas (TAIZ & ZEIGER, 2004; FILHO, 2005). Todas as espécies vegetais necessitam de cobre para realizar suas funções vitais básicas, como por exemplo, à produção de energia ao nível de cadeia respiratória. Portanto, para o desenvolvimento das plantas, é necessário o suprimento de pequenas quantidades de cobre.

Em decorrência dos mecanismos envolvidos nas suas reações químicas, como a formação de complexo de esfera interna com a matéria orgânica e óxidos do solo, o cobre apresenta-se em baixa concentração na solução do solo (McBRIDE, 1994; STEVENSON, 1994). Contudo, esse elemento, em determinadas concentrações pode exercer efeitos deletérios em diversas formas de vida, causando, de modo irreversível, contaminação e poluição dos ecossistemas (LEYVAL et al., 1997). Quantidades excessivas de cobre quando acumuladas nos tecidos das plantas alteram o crescimento, os processos fisiológicos e bioquímicos das mesmas (FERNANDES & HENRIQUES, 1991). Plantas expostas ao excesso de cobre apresentam menor crescimento em decorrência da alteração do N-total na planta e redução na síntese de clorofila (LUNA et al., 1997).

Vários grupos de organismos do solo podem auxiliar o estabelecimento de vegetações em áreas contaminadas. Dentre esses organismos destacam-se os fungos ectomicorrízicos, que ao associarem-se com as plantas, desenvolvem no solo, estruturas eficientes para a absorção de água e nutrientes, os quais são posteriormente transferidos às plantas. Além disso, esses organismos apresentam habilidade de reduzir a toxicidade dos íons metálicos para a planta hospedeira (KONG et al., 2000). O aumento na absorção destes elementos pelas raízes e o seu acúmulo no micélio extra radicial, confere ao hospedeiro maior tolerância a estes elementos (GRAZZIOTTI et al., 2001). Entretanto, não há estudo mostrando a eficiência desses organismos, no estabelecimento de plantas arbóreas da região central do Estado do Rio Grande do Sul, em solo contaminado por cobre.

Neste contexto, a associação de espécies florestais nativas com fungos que formem simbiose mutualística, provavelmente seja uma alternativa promissora, para colocar essas áreas de volta ao processo produtivo. Na literatura, encontram-se exemplos dos benefícios desta associação para com as plantas e para o estabelecimento de plantas adaptadas as condições ambientais.

Para que isso possa ser feito, é necessário solucionar algumas questões. Uma delas é saber se os fungos ectomicorrízicos estabelecem associação simbiótica com espécies arbóreas do estado do Rio Grande do Sul. A outra, é investigar se espécies florestais nativas crescem em solo contaminado por cobre e se a contaminação do solo por cobre reduz a associação dessas plantas com fungos ectomicorrízicos. Finalmente, é necessário saber se o desenvolvimento de plantas arbóreas em solo contaminado por cobre depende da inoculação com fungos micorrízicos e se algumas espécies de fungos micorrízicos são mais tolerantes à contaminação por cobre.

Para realização do trabalho, utilizou-se solo classificado como Argissolo Vermelho-amarelo distrófico arênico, acrescido de doses de cobre. O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Solo e no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria, na FEPAGRO Florestas e nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS. O trabalho foi dividido em três etapas. Primeiramente, foi realizado um levantamento da ocorrência de fungos micorrízicos em espécies florestais nativas e cultivadas do Rio Grande do Sul, seleção dos fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre, a avaliação do potencial da associação ectomicorrízica com espécies florestais nativas *in vitro* e a caracterização molecular de fungo ectomicorrízico. Na segunda etapa selecionou-se espécies florestais tolerante a cobre e, na terceira etapa, avaliou-se o comportamento de espécie florestal em presença de fungo ectomicorrízico em solo acrescido de cobre.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERNANDES, J. C.; HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiology and structural effects of excess copper in plants. **Botanic Review**, Bronx, v. 57, p. 246-273, 1991.

FILHO, H. G. **Cobre na planta**. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas. Departamento de Recursos Naturais. Área de Ciência do Solo. 2005. Disponível em: < <http://www.fca.unesp.br/intranet/arquivo>>. Acesso em: 8 de setembro 2006.

GIOVANNINI, E. Toxidez por cobre em vinhedos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 3, p. 115-117, 1997.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeito do Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 25, n. 10, p. 831-838, 2001.

KONG, F. X. et al. Biochemical responses of the mycorrhizae in *Pinus massoniana* to combined effects of Al, Ca and low pH. **Chemosphere**. Ottawa, v. 41, n. 3, p. 311-318, 2000.

LEYVAL, C.; TURNAU, K. & HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**. Florida, v. 7, n. 10, p. 139-153, 1997.

LUNA, C. M.; CASANO, I. M.; TRIPPI, V. S. Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Triticum aestivum* treated with high levels of copper. **Physiology Plant**. Rockville, v. 101, p. 103-108, 1997.

McBRIDE, M.B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1994. 406p.

STEVENSON, F.J. Organic Matter reactions involving metal ions in soil. In: STEVENSON, F.J. **Humus-Chemistry, genesis, composition, reactions**. 2.ed, New York: Oxford, University Press, 1994. p.378-403.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed., Porto Alegre: Artmed,., 2004. 719p.

# CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM TREZE ESPÉCIES FLORESTAIS NA REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

## RESUMO

O estabelecimento da micorriza pode favorecer o desenvolvimento em plantas de espécies florestais. O trabalho teve como objetivo de determinar a ocorrência e o tipo de associação micorrízica em treze espécies florestais da região central do Rio Grande do Sul. As espécies florestais analisadas foram: *Luehea divricata* Mart. et Zucc. (açoita-cavalo), *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan (angico-vermelho), *Peltophorum dubium* (Sprengel) Tauber. (canafístula), *Cedrela fissilis* Vell. (cedro), *Eugenia involucrata* Dc. (cerejeira), *Ficus puschnathiana* (Miq.) Miq. (figueira-do-mato), *Apuleia leiocarpa* (J. Vogel) J.F. Macbr. (grápia), *Ingá marginata* Willd. (ingá-feijão), *Tabebuia Alba* (Cham.) Sandwith (ipê-ouro), *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (timbaúva), *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (tipuana) e *Phytolacca dioica* L. (umbu). As coletas de raízes e solo foram realizadas no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria e em mata nativa no distrito municipal de Boca do Monte, Santa Maria, RS. As raízes foram processadas e determinadas o tipo de micorriza presente e a porcentagem de colonização radicular. Não foi detectada associação com fungos ectomicorrízicos nas espécies estudadas em ambiente natural. Raízes de açoita-cavalo, angico-vermelho, canafístula, cedro, figueira-do-mato, ingá-feijão, ipê-ouro, ipê-roxo, timbaúva, tipuana e umbu apresentaram associação com fungo micorrízico arbuscular.

Palavras chave: micorriza arbuscular, ectomicorriza, árvores nativas

## 1 INTRODUÇÃO

As essências florestais nativas podem ser uma alternativa para revegetação de áreas contaminadas. Essas plantas, além de suas características fisiológicas desejáveis, apresentam também, grandes vantagens comerciais quanto à madeira e os subprodutos, em relação às comercialmente mais utilizadas como o eucalipto e pínus (SCHROEDER, 1991). No Rio Grande do Sul, embora as espécies florestais nativas tenham sido muito estudadas nos últimos anos, pela sua adaptabilidade e rusticidade, principalmente em solos com processo de degradação, poucos estudos têm sido realizados com ênfase nas associações com outros organismos benéficos às plantas que viabilizem o crescimento em condições adversas.

A escolha de espécies adequada aos processos de revegetação é muito importante, devido à necessidade de rápida adaptação aos fatores limitantes de crescimento da planta, principalmente quando relacionado a solos degradados (PRALON & MARTINS, 2001). Espécies madeireiras nativas não leguminosas do Sul do Brasil, podem ser uma alternativa para o reflorestamento, como o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*), o pau-marfim (*Balfourodendron riedelianum*), a canjerana (*Cabrela canjerana* subsp. *canjerana*), pau-ferro (*Myracrodruon balansae*) e o pessegueiro-bravo (*Prunus brasiliensis*) (CARVALHO, 1998). Entre as espécies florestais nativas leguminosas o autor cita o angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*), angico-branco (*Anadenanthera colubrina* var. *colubrina*), angico-cascudo (*Anadenanthera peregrina* var. *falcata*), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*), bracatinga (*Mimosa scrabella*), canafístula (*Peltophorum dubium*) e guapuruvú (*Schizolobium parahyba*).

No Estado do Rio Grande do Sul, embora tenha ocorrido uma devastação em sua floresta nativa, reduzindo de 42% para apenas 4% da sua superfície territorial coberta com florestas, ainda apresenta locais com representantes da diversidade original da floresta nativa (ZACHIA et al., 2002). Essas florestas estão localizadas na região sudoeste, região de Santa Maria e na metade norte do Rio Grande do Sul. As poucas áreas nativas existentes restringem-se às áreas de preservação, aos parques, às reservas e a pequenas áreas de difícil acesso. Segundo levantamentos florestais, as famílias vegetais mais comuns encontradas são: Myrtaceae (69 espécies), Fabaceae (38 espécies), Lauraceae (25 espécies), Euphorbiaceae (16 espécies), Asteraceae e Rubiaceae (13 espécies), Solanaceae (11 espécies), Flacourtiaceae, Rutaceae, Verbenaceae e Bignoniaceae (10 espécies), Meliaceae e Sapindaceae (9 espécies), Moraceae (8 espécies), Anacardiaceae, Aquifoliaceae, Sapotaceae e Celastraceae (7 espécies),

Annonaceae (5 espécies), Myrsinaceae (6 espécies), Apocynaceae, Araliaceae, Melastomataceae, Monimiaceae, Rhamnaceae e Ulmaceae (4 espécies) (IFCRS, 2006).

Uma alternativa para aumentar a taxa de crescimento das espécies florestais nativas do Estado do RS poderia ser a associação com fungos micorrízicos. Os fungos micorrízicos desenvolvem associação simbiótica com as plantas vasculares. Por meio dessa associação, a planta fornece ao fungo os carboidratos necessários ao seu crescimento, enquanto que o fungo, por meio de suas estruturas externas (hifas), auxilia na absorção dos nutrientes da solução do solo e os transfere para as plantas (PASCOAL & NAVARRO, 1985; ANTONIOLLI & KAMINSKI, 1991; SMITH & READ, 1997). Contudo, pouco se sabe a respeito da ocorrência dessa associação em espécies florestais nativas do estado do Rio Grande do Sul.

Os Fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos são os fungos de maior importância para o setor florestal. Trabalhos de pesquisa indicam que na fase de muda, são as micorrizas arbusculares que parecem desempenhar um importante papel na absorção de nutrientes, sendo progressivamente substituídas pelas ectomicorrizas com o desenvolvimento da planta (BELLEI et al., 1992; ROJAS & SIQUEIRA, 2000). No açoita-cavalo (*Luehea divaricata*), observou-se maior altura das plantas, quando inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. Este comportamento foi observado também, para *Cassia verrugosa*, sesbânia (*Sesbania* sp.) e tamboril (*Enterolobium cotortisiliquum*) que mostraram maior crescimento nas plantas micorrizadas aos 30 dias e para colvílea com diferença aos 60 dias do transplante das mudas (ROJAS & SIQUEIRA, 2000).

Os fungos ectomicorrízicos ao associar-se com as plantas desenvolvem estruturas muito eficientes na absorção de água e nutrientes do solo, os quais são posteriormente transferidos as plantas (SMITH & READ, 1997; SILVA 2002; SILVA et al., 2003). Estes fungos destacam-se por interagir com as espécies vegetais formando uma associação simbiótica mutualística, que através da maior absorção de nutrientes e proteção das raízes, contribuem para o desenvolvimento das plantas (PEROTTO & BONFANTE, 1997; PFLEGER et al., 1994). Isto resulta dos efeitos morfogenéticos proporcionados ao sistema radicular por esses fungos, como aumento da ramificação das raízes e redução da dominância apical (MARX & CORDELL, 1989; SMITH & READ, 1997).

Para aumentar a eficiência produtiva de nossas florestas é necessário o estudo dos organismos que formam associações com as plantas e auxiliam no desenvolvimento e no estabelecimento das mudas a campo. Neste contexto, a associação de espécies florestais com fungos que formem associações simbióticas mutualísticas, é uma alternativa promissora



(BRUNDRETT et al., 1996; SMITH & READ, 1997; SILVA, 2002; SILVA et al., 2003; ANDREAZZA et al., 2004). O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência e o tipo de associação micorrízica em treze espécies florestais da região central do Rio Grande do Sul.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Prof. Marcos Rubens Fries, pertencente ao Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria. No distrito de Boca do Monte em Santa Maria, RS e no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria foram realizadas as coletas de raízes e do solo adjacente ao sistema radicular. Posteriormente, o material foi submetido à avaliação morfológica das raízes, visando a determinação da presença de micorrizas arbusculares ou ectomicorrizas.

### 2.1 Espécies florestais estudadas

As espécies nativas estudadas foram: açoita-cavalo (*Luehea divricata* Mart. et Zucc.), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan), canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.), cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), cerejeira (*Eugenia involucrata* Dc), figueira-do-mato (*Ficus puschnathiana* (Miq.) Miq.), grápia (*Apuleia leiocarpa* (J. Vogel) J.F. Macbride), ingá-feijão (*Inga marginata* Willd.), ipê-ouro (*Tabebuia alba* (Cham.) Sandw.), ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Tol.), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.), tipuana (*Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze) e umbu (*Phytolacca dioica* L.). Estas espécies de plantas foram escolhidas com base em sua importância ambiental e econômica.

### 2.2 Caracterização das áreas de coleta

O distrito de Boca do Monte está localizado a aproximadamente 10 km a oeste da cidade de Santa Maria, RS. A coleta nesse distrito foi realizada na propriedade do senhor Carlos Augusto Moro, apresentando 60 ha e relevo fortemente ondulado. As espécies nativas utilizadas para coleta estavam dispersas sobre um Neossolo Litólico e pertenciam à área de preservação permanente da propriedade, sendo representante da floresta nativa da região, contendo camada de serrapilheira e não tendo sido alterado pela atividade antrópica.

O jardim Botânico localiza-se no Campus da Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS e foi instalado em um Argissolo Vermelho-amarelo distrófico típico. As espécies estudadas foram plantadas no local a cerca de 30 anos e estavam distribuídas sistematicamente de forma isolada, uma da outra, não representando uma floresta nativa. A vegetação predominante nesta área é de gramíneas. Nessa área, foram coletadas amostras de raízes e solo em plantas de canafístula, ipê-ouro e tipuana.

### **2.3 Coleta e acondicionamento das amostras**

As coletas das amostras a campo foram realizadas na primeira quinzena de novembro no jardim Botânico e na segunda quinzena de novembro no Distrito de Boca do Monte. Raízes e solo foram coletados simultaneamente.

Após as coletas, as raízes foram imediatamente separadas do solo adjacente ao sistema radicular. O solo coletado foi homogeneizado e separado dos restos vegetais para a análise química no Laboratório Central de Análises de Solo da Universidade Federal de Santa Maria. O material coletado, solo e raízes foram colocados em sacos plásticos tipo feira de 1 L, sendo posteriormente, acondicionados em caixas de isopor com gelo, para evitar o aquecimento excessivo das amostras.

No laboratório as raízes foram lavadas em água corrente sobre uma peneira de 50 µm de malha e armazenadas em 80 mL de álcool 50%, durante 10 dias. Após esse período, foram observadas em microscópio estereoscópio para descrição da morfologia radicular e análise da colonização micorrízica. Para isso, as raízes foram segmentadas de 1 em 1 cm, separando-se uma porção representativa de 0,1 g, guardadas em álcool 50% para posterior caracterização do tipo de associação micorrízica.

### **2.4 Coleta, isolamento e multiplicação de fungos ectomicorrízicos**

Após a observação a campo dos corpos de frutificação dos fungos ectomicorrízicos e detectando-se a conexão com o sistema radicular, esses eram coletados e levados ao laboratório para o isolamento (BRUNDRETT et al., 1996). Para o isolamento, os corpos de

frutificação foram desinfestados pincelando-se externamente com uma solução de álcool 70%. Essas estruturas foram manualmente quebradas ao meio, retirando-se uma pequena porção do interior do tecido e semeando-se em meio de cultura Hagem sólido modificado, em placa de Petri, incubando-as a 25°C, durante 3 dias, até o aparecimento de micélio. Após este período, as culturas sem contaminação evidente, e nas quais observou-se o aparecimento de micélio, foram transferidas para placas de crescimento, contendo meio de cultura sólido Melin-Norkrans Modificado (MNM) (MARX, 1969) e mantidas sob as mesmas condições de incubação.

## **2.5 Avaliação da associação micorrízica**

A avaliação da colonização micorrízica nas raízes das plantas foi realizada por meio de dois procedimentos: a) pela identificação a olho nu e sob lupa das alterações morfológicas, possivelmente provocadas por fungos ectomicorrízicos; b) pelo auxílio de técnica de coloração das raízes para visualização das micorrizas arbusculares em microscópio e também de ectomicorrizas em lupa (BRUNDRETT et al., 1996).

As amostras para determinação da percentagem de raízes colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos seguiram o seguinte procedimento: as raízes das plantas foram separadas do solo, com peneiras e lavadas com água destilada e em seguida, retirou-se uma amostra de 0,1 g de raízes, as quais foram cortadas em 1cm e conservadas em solução com álcool comercial a 50%. No laboratório, essas raízes foram submetidas ao processo de clareamento e coloração. O procedimento de clareamento e coloração das raízes consistiu em deixar uma amostra de 0,1g de raízes imersas em solução de KOH 10%, a 80 °C durante 48h. Em seguida, lavou-se com água e posteriormente colocou-se em HCl 0,1N durante 2 minutos. Lavou-se novamente com água e colocou-se em Trypan Blue (corante) a 80° C por 30 minutos. Posteriormente, lavou-se novamente com água e armazenou-se em lactoglicerol, conforme Brundrett et al. (1996).

Na avaliação da percentagem de colonização radicular utilizaram-se 5 repetições por planta. A colonização ectomicorrízica foi estimada pelo método da placa quadriculada (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980) e a colonização micorrízica arbuscular foi feita pela técnica de seguimento radicular em lâmina (BRUNDRETT et al., 1996). Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Colonização Micorrízica: } \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de raízes colonizadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de raízes}} \times 100$$

As espécies nativas foram classificadas em categorias quanto à ocorrência de associação micorrízica, em muito alta (> 80%), alta (60 - 79%), média (40 - 59%), baixa (20 - 39%), muito baixa (1 - 19%) e Au: ausente, conforme Zangaro et al. (2002).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o açoita-cavalo, angico-vermelho, canafístula, cedro, figueira-do-mato, ingá-feijão-feijão, ipê-ouro, ipê-roxo, timbaúva, tipuana e umbú apresentam micorrizas arbusculares e não ectomicorrizas (Tabela 1). Zangaro et al. (2002), em levantamento de 51 espécies nativas do Parque Estadual Mata dos Godoy (PR), também observaram a ocorrência de micorrizas arbusculares em ipê-roxo, ipê-ouro e timbaúva. Contudo esses autores não detectaram a ocorrência dessa associação em canafístula. Andrade et al. (2000), estudando o status micorrízico de espécies nativas da Mata Atlântica e da Floresta de Araucária em Santa Catarina, detectaram micorrizas arbusculares nas 29 espécies examinadas, pertencentes a 19 famílias, sendo várias espécies das famílias Myrtaceae e Fabaceae. Sabe-se que o angico-vermelho-vermelho é uma Fabaceae arbórea com capacidade de formar micorriza arbuscular (THOMAZINI, 1974). Os resultados indicam que plantas arbóreas do Rio Grande do Sul apresentam a tendência de formar micorrizas arbusculares.

**Tabela 1** - Presença (+) ou ausência (-) de colonização micorrízica arbuscular (MA) e ectomicorrízica (ECM) em 13 espécies florestais na região central do Estado do Rio Grande do Sul, 2006.

Nome comum	Nome científico	AM	ECM
Açoita-cavalo	<i>Luehea divricata</i> Mart. et Zucc.	+	-
Angico-vermelho	<i>Parapiptadenia rigida</i> (Benth) Brenan	+	-
Canafístula	<i>Peltophorum dubium</i> (Spreng.) Taub.	+	-
Cedro	<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	+	-
Cerejeira	<i>Eugenia involucrata</i> DC.	-	-
Figueira-do-mato	<i>Ficus puschnathiana</i> (Miq.) Miq.	+	-
Grápia	<i>Apuleia leiocarpa</i> (J.Vogel) J.F. Macbr.	-	-
Ingá-feijão-feijão	<i>Inga marginata</i> Willd.	+	-
Ipê-ouro	<i>Tabebuia alba</i> (Cham.) Sandwith	+	-
Ipê-roxo	<i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vell.) Toledo	+	-
Timbaúva	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	+	-
Tipuana	<i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze	+	-
Umbú	<i>Phytolacca dioica</i> L.	+	-

As treze espécies estudadas não apresentaram associação com fungo ectomicorrízico (Tabela 1) e as plantas de cerejeira e grápia não apresentaram qualquer tipo de micorriza. Esses resultados assemelham-se aos obtidos por Andreatza (2006), que também não detectou a presença de ectomicorrizas em plantas de timbaúva, canafístula, grápia, ipê-amarelo, ipê-roxo e pinheiro-do-paraná. Entretanto, muitas essências florestais nativas são potencialmente capazes de formar micorrizas arbusculares e ectomicorrizas, como é o caso de algumas espécies das famílias Fabaceae e Myrtaceae (STÜRMER & BELLEI, 1994).

Árvores importantes da família Caesalpinaceae são naturalmente colonizadas por fungos ectomicorrízicos (SMITH & READ, 1997), enquanto que espécies arbóreas da família Papilionoidaceae apresentam normalmente associação com fungos micorrízicos arbusculares. Entretanto, a não ocorrência de inoculação por fungos micorrízicos pode estar relacionada, não somente à compatibilidade entre fungo e planta, mas também, à ocorrência e ao nível do inóculo de um ou outro tipo de micorriza presente no local (AMARANTHUS & PERRY, 1994; OLIVEIRA et al., 1997; DODD & THOMSON, 1994). Desse modo, a ausência de ectomicorrizas em certas plantas não significa que as plantas analisadas não tenham a capacidade de formar essas associações, mas pode ser que a disponibilidade de inóculo dos fungos não seja suficiente para aumentar a probabilidade do encontro das raízes com o fungo.

A porcentagem de colonização micorrízica variou de 0 a 83 %, sendo que o angico-vermelho apresentou 80 %, a canafístula 77 %, o cedro 70 %, o ingá-feijão 50 %, o ipê-ouro 73 %, o ipê-roxo 60 %, a timbaúva 64 % e a tipuana 83 % micorrizas arbusculares (Tabela 2). Gross et al. (2004), observaram colonização da ordem de 78% para o angico-vermelho do cerrado. O cedro é considerado uma espécie com elevada dependência micorrízica (SAGGIN JÚNIOR, 1997) e apresenta contribuição de até 63 % na nutrição fosfatada dessa planta (ROCHA, 2006). Em outro estudo, em florestas nativas no Uruguai, a espécie *Peltophorum dubium* teve uma colonização com fungos micorrízicos arbusculares de 48% e não foi encontrada colonização ectomicorrízica nessa planta (FRIONI et al., 1999). Contudo, esses mesmos autores não observaram colonização micorrízica em *Enterolobium* sp., o que foi visto no presente estudo

Observou-se também que raízes de açoita-cavalo e umbú apresentaram colonização micorrízica média, a figueira-do-mato apresentou baixa colonização, enquanto que cerejeira e grápia não apresentaram colonização (Tabela 2). Embora esteja documentado que plantas da família Fabaceae podem formar associação com fungos micorrízicos arbusculares (HARLEY & SMITH, 1983), isso não foi confirmado neste trabalho, para plantas de grápia crescendo em floresta nativa.

**Tabela 2** - Porcentagem de colonização e ocorrência de associação micorrízica por micorriza arbuscular em raízes de 13 espécies florestais na região central do Estado do Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2006.

Nome comum	Colonização micorrízica (%)	Associação micorrízica
Açoita-cavalo	47	Média*
Angico-vermelho	80	Muito alta
Canafístula	77	Alta
Cedro	70	Alta
Cerejeira	0	Ausente
Figueira-do-mato	20	Baixa
Grápia	0	Ausente
Ingá-feijão	50	Média
Ipê-ouro	73	Alta
Ipê-roxo	60	Alta
Timbaúva	64	Alta
Tipuana	83	Muito alta
Umbu	40	Média

\*Muito alta (> 80%), Alta (60 - 79%), Média (40 - 59%), Baixa (20 - 39%), Muito baixa (1 - 19%) e Ausente.

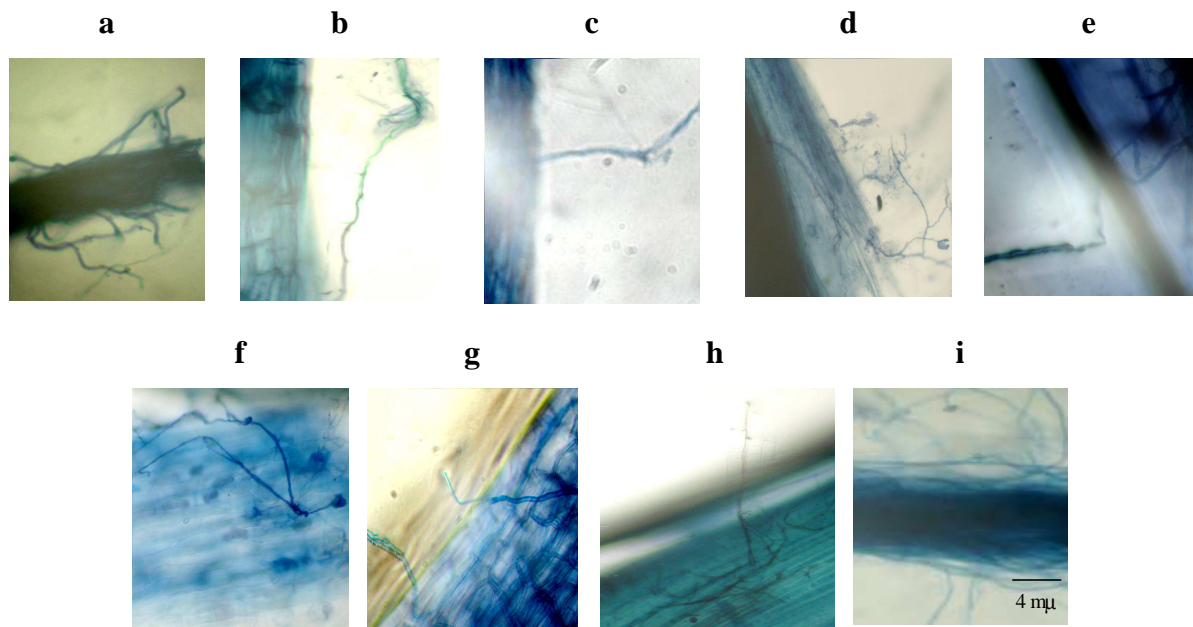
Andreazza (2006) observou colonização em grápia por fungos micorrízicos arbusculares. Entretanto, essas plantas pertenciam a florestas plantadas, que durante a produção de mudas, têm suas sementes cobertas com serrapilheira, o que pode aumentar a quantidade de inóculo. Saggin Júnior & Siqueira (1995), sugerem ainda, que tais diferenças podem ser causadas pelo balanço entre o benefício nutricional, promovido pelo fungo à planta e o dreno de fotoassimilados da planta para o fungo. Como este trabalho não teve a intenção de determinar a ocorrência de espécies de fungos micorrízicos envolvida na simbiose, sugere-se então, que estudos relacionando a capacidade da planta em formar micorriza sejam realizados, não somente para comprovar a capacidade da planta em associar-se com o fungo mas também, para avaliar o benefício desta associação.

Nas espécies nativas, a rápida taxa de crescimento e a grande demanda pelos minerais, comum nas espécies arbóreas pioneiras e secundárias iniciais, como angico-vermelho, ingá-feijão e ipê podem levar essas plantas a apresentar deficiência de P na parte aérea, o que



aumenta a colonização de MA nas raízes e produz melhorias na performance do hospedeiro (ZANGARO et al., 2000). Essas espécies, por apresentar altas taxas de absorção de nutrientes e imobilização na biomassa para posterior transferência para os outros componentes do ecossistema, são consideradas as mais indicadas para revegetação de áreas degradadas e são as espécies responsáveis pela estruturação inicial da floresta (MONTAGNINI & SANCHO, 1994). Plantas que apresentam micorrizas arbusculares nas raízes possuem menor estresse nutricional (KOIDE, 1991), maior disponibilidade de água e aumento na taxa fotossintética (SMITH & READ, 1997), maior densidade de raízes e proteção contra patógenos (SYLVIA & WILLIAMS, 1992).

Na Figura 1 constata-se a presença de estruturas fúngicas no interior e parte externa do sistema radicular das plantas de açoita-cavalo (Figura 1a), angico-vermelho (Figura 1b), canafístula (Figura 1c), cedro (Figura 1d), figueira-do-mato (Figura 1e), ipê-ouro (Figura 1f), timbaúva (Figura 1g), tipuana (Figura 1h) e umbu (Figura 1i). A presença de hifas caracteriza o estabelecimento de micorrizas arbusculares no sistema radicular de plantas superiores e influencia diretamente na absorção de nutrientes e água do solo pelos fungos micorrízicos (SMITH & READ, 1997).



**Figura 1** - Presença de hifas de fungo micorrízico arbuscular em raízes de açoita-cavalo (a), angico-vermelho (b), canafístula (c), cedro (d), figueira-do-mato (e), ipê-ouro (f), timbaúva (g), tipuana (h) e umbu (i). Santa Maria, RS, 2006.

Os fungos micorrízicos arbusculares podem também apresentar arbúsculos, cuja função pode estar relacionada à troca de elementos nutritivos com a planta hospedeira (SMITH & READ, 1997). Contudo não foi observada a presença de arbúsculos no interior do sistema radicular das plantas avaliadas, mas nota-se a presença de esporos fúngicos extracelulares nas raízes de cedro (Figura 1 d), indicando ser uma simbiose funcional.

As espécies estudadas apresentam grande importância por serem plantas adaptadas às condições ambientais e edáficas do Rio Grande do Sul. Ipê, açoita-cavalo e cedro são importantes economicamente, pois são utilizadas em marcenaria e construção civil. Canafístula, angico-vermelho e timbaúva são plantas leguminosas de revegetação primária, contribuindo para a cobertura vegetal, sendo importante para recuperação de áreas degradadas (BACKES & IRGANG, 2002). A identificação das micorrizas arbusculares nestas plantas possibilita avaliar os efeitos dessas associações nas espécies vegetais. Entretanto, embora não tenha ocorrido associação com ectomicorrizas no ambiente natural, não significa que essas plantas não formem ectomicorriza, pois a presença desta associação deve-se a interação entre fungo, planta e ambiente. Portanto, é interessante realizar estudos mais detalhados em ambiente controlado, para poder comprovar a capacidade dessas plantas em formar este tipo de associação micorrízica.

## 4 CONCLUSÕES

As espécies florestais nativas açoita-cavalo, angico-vermelho, canafístula, cedro, cerejeira, figueira-do-mato, grápia, ingá-feijão, ipê-ouro, ipê-roxo, timbaúva, tipuana e umbu não apresentam ectomicorrizas em ambiente natural.

A associação com micorriza arbuscular em ambiente natural ocorre em raízes de açoita-cavalo, angico-vermelho, canafístula, cedro, figueira-do-mato, ingá-feijão, ipê-ouro, ipê-roxo, timbaúva, tipuana e umbu.

As plantas de cerejeira e grápia não apresentam ectomicorriza e nem micorrizas arbusculares.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTHUS, M.P.; PERRY, D.A. The functional of ectomycorrhizal fungi in the field: linkages in space and time. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.159, n.1, p.133-140, 1994.

ANDRADE, A.C.S. et al. Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brasil. **Mycorrhiza**, Florida, v.10, p.131-136, 2000.

ANDREAZZA, R. **Associação de fungos ectomicorrízicos com espécies florestais nativas do estado do Rio Grande do Sul**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

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, n. 2, p. 51-60, 2004.

ANTONIOLLI, Z.I.; KAMINSKI, J. Micorrizas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.2, n.3, p.441-455, 1991.

BACKES, P.; IRGANG, B, **Árvores do Sul**. Guia de Identificação e Interesse Ecológico. 2. ed. Porto Alegre: Pallotti, Instituto Souza Cruz, 2002.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: Aciar, 1996. 400 p.

CARVALHO, P.E.R. Espécies alternativas para o reflorestamento e o seu futuro industrial nos estados do Sul do Brasil. In: SIMPÓSIO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 5.; SIMADER - RS. 1., 1998, Santa Maria – RS. **Anais...** Santa Maria - RS.: UFSM, 1998.p. 21-28.

DODD, J.C.; THOMSON, B.D. The screening and selection of inoculant of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 159, n. 1, p. 149-158, 1994.

FRIONI, L.; MINASIAN, H.; VOLFOVICZ, R. Arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal in native tree legumes in Uruguay. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 115, p. 41-47, 1999.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. Na evaluation of techniques for mesuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v.84, n.3, p.489-500, 1980.

GROSS, E.; CORDEIRO, L.; CAETANO, F. H. . Nodulação e Micorrização em *Anadenanthera peregrina* VAR. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 95-101, 2004.

HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. New York: Academic Press, 1983. 483p.

IFCRS - INVENTÁRIO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL. Inventário Florestal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2007. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/ifcrs>>. Acesso em: 10 Jul. 2007.

KOIDE, R.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, Cambridge, v. 117, n. 3, p. 365-386, 1991.

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. **Phytopathol.**, Saint. Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.

MARX, D.H.; CORDELL, C.E. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: WHIPPS, J.M.; LUMSDEN, R.D. (eds.). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. New York: Stanford, 1989. p.1-25.

MONTAGININI, F.; SANCHO, F. Nutrient budgets of young plantations with native trees: strategies for sustained management. In: BENTHEY, W.; GOWEN, M. (Ed.). **Forest sources and wood-based biomass energy as rural development assets**. New Delhi: Oxford & IBH Publishing, 1994. p. 213-233.

OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; BELLEI, M.M. Patterns of arbuscular- and ectomycorrhizal colonization of *Eucalyptus dunnii* in southern Brazil. **Annuaire des Sciences Forestières**, v. 54, p. 73-481, 1997.

PASCOAL, J.O.; NAVARRO, J.M.B. Significado de los microorganismos del suelo em nutrición vegetal: Simbiosis *Rhizobium leguminos* y micorrizas VA. In: GARRIDO, M.L. e OROSTICA, C.G., eds. **Nutrición Vegetal: algunos aspectos químicos y biológicos**. Granada, Consejo superior de investigaciones científicas, 1985, p.151-196.

PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, p. 496-501, 1997.

PFLEGER, F. L.; STEWART, E. L.; NOYD, R. K. Role of VAM fungi in mine land revegetation. In: PFLEGER, F. L.; LINDERMAN, R. G. (Eds.). **Mycorrhizae and plant health**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 47-82.

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

ROCHA, F.S. et al. Dependência e resposta de mudas de cedro a fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.77-84, 2006.

ROJAS, E.P.; SIQUEIRA, J.O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.1, p.103-114, 2000.

SAGGIN JÚNIOR, O.J. **Micorrizas arbusculares de espécies arbóreas do Sudeste brasileiro**.1997. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.19, p.221-228, 1995.

SANTOS, V.L. et al. Vesicular-arbuscular and ectomycorrhiza succession in seedlings of eucalyptus spp.. **Plant Physiology**, Rockville, v. 34, n. 3, p. 23-30, 2001.

SCHROEDER, M. Cobertura florestal do Rio Grande do Sul: Tendências e Perspectivas. In: SEMINÁRIO SOBRE A SITUAÇÃO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 1, 1991, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1991. p.01-09.

SILVA, R.F. **População de fungos micorrízicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii* em solo arenoso**. 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

SILVA, R.F; ANTONIOLLI, Z.I; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.1, p.33-42, 2003.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1997. 605 p.

STÜRMER, S.L.; BELLEI, M.M. Composition and seasonal variation of spore populations of Arbuscular Mycorrhizal fungi in dune soils in island of Santa Catarina, Brazil. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.72, p.359-365, 1994.

SYLVIA, D. M.; WILLIAMS, S. E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: BETHLENFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. (Ed.). **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: ASA Special Publication, 1992. p. 101-124.

THOMAZINI, L.I. Mycorrhiza in plants of the “Cerrado”. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.41, p.707-711, 1974.

ZACHIA, R.A. et al. Florística e síndromes de dispersão de espécies lenhosas em um fragmento de floresta ripária em Santa Maria, RS. 2002. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO FLORESTAL DO CONE-SUL. A Floresta e o Meio Ambiente, 2., 2002, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2002. p.121.

ZANGARO, W.; BONONI, V. L. R.; TRUFEN, S. B. Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 16, n. 4, p. 603-622, 2000.

ZANGARO, W. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Iibagi, Paraná. **Cerne**, Larvas, v. 8, n. 1, p. 77-87, 2002

## **CAPÍTULO II: TOLERÂNCIA AO COBRE NO CRESCIMENTO “in vitro” DOS FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS *Pisolithus microcarpus*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma* sp. e *Suillus* sp.**

### **RESUMO**

Fungos ectomicorrízicos que apresentam tolerância a metais pesados poderão ser uma alternativa para o estabelecimento das plantas em ambientes contaminados. Avaliou-se o crescimento de cinco isolados de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura sólido e líquido com variação nas doses de cobre. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Solo Prof. Marcos Rubens Fries, pertencente ao Departamento de Solos-UFSM. Os fungos testados no meio de cultura sólido foram: *P. microcarpus* – UFSC - Pt116; *Suillus* sp. – UFSM RA 2.8; *Suillus* sp. – UFSM RA 118; *Scleroderma* sp. – UFSM - Sc3.6 e *Scleroderma* sp. – UFSC - Sc124. No meio de cultura líquido foram testados os fungos: *P. microcarpus* – UFSC - Pt116, *Pisolithus* sp. – UFSC Pt24, *Scleroderma* sp. – UFSC - Sc124, o fungo UFSM MC e o UFSM RA 2.8. As doses de cobre testadas foram: 0,00; 0,25; 0,5; 0,75 ; 1,0 e 1,25 mmol.l<sup>-1</sup> para o experimento em meio sólido e 0,00; 0,32; 0,64 e 0,96 mmol.L<sup>-1</sup> para o meio líquido, sendo aplicado como sulfato de cobre, de forma suplementar ao meio de cultura MNM, em pH 4,8, com seis repetições para cada combinação fungo-dose. Os fungos cresceram em incubadora microbiológica por 30 dias a 28°C. Os fungos foram analisados também quanto à produção de pigmentos extracelulares. O crescimento dos fungos foi inibido com a elevação das doses de cobre no meio sólido e líquido, contudo de forma diferenciada. Os fungos UFSM RA 2.8, UFSC - Pt116 e UFSC - Sc124 apresentaram maior tolerância ao cobre em meio de cultura sólido. O fungo UFSC - Pt116 apresentou maior tolerância ao cobre em meio de cultura líquido. O fungo UFSC - Pt116 apresentou maior produção de pigmentos extracelulares, enquanto que o fungo UFSC - Sc124 apresentou maior produção específica de pigmentos extracelulares. De todos os fungos testados, o fungo UFSC - Pt116 apresentou maior tolerância ao cobre e produziu maior quantidade de micélio.

Palavras-chave: ectomicorriza, metal pesado, meio de cultura.



## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo por metais pesados pode influenciar negativamente a atividade microbiana do solo e a composição de espécies de fungos e de plantas (RÜHLING & SÖDERSTÖM, 1990; DIAS JÚNIOR, et al., 1998), acarretando até mesmo a destruição da vegetação. Entretanto, muitos fungos ectomicorrízicos apresentam tolerância a metais pesados (MARTINO et al., 2000). Esses fungos são na sua maioria basidiomicetos, cuja estrutura fúngica se desenvolve na raiz e nos espaços intercelulares do córtex, sem que ocorra penetração celular, sendo considerado um simbiote de plantas (PETERSON & BONFANTE, 1994). A presença desses fungos nas plantas indica a possibilidade do uso dos mesmos em processos de biorremediação de solos poluídos por meio do acúmulo desses elementos nas estruturas fúngicas localizadas no sistema radicular das plantas (LEYVAL et al., 1997; KHAN, 2001). Desse modo, a seleção de fungos tolerantes a metais pesados, torna-se necessária para o melhor aproveitamento desta simbiose no crescimento das plantas nas áreas contaminadas.

Nesse sentido, vários estudos têm sido desenvolvidos para determinar a tolerância de fungos ectomicorrízicos a diferentes concentrações de diferentes metais pesados (HOWE et al., 1997; MARTINO et al., 2000; GRAZZIOTTI et al., 2001). Howe et al. (1997) estudaram a tolerância ao cobre em três isolados de *Laccaria laccata*, cinco *Paxillus involutus* e um de *Scleroderma citrinum* em meio de cultura líquido e observaram que *Paxillus involutus* foi o mais tolerante, apresentando crescimento na maior dose de cobre ( $4\text{mmol L}^{-1} \text{CuSO}_4$ ). Graziotti et al. (2001), detectaram, em meio de cultura líquido, tolerância de *Pisolithus tinctorius* a cobre até  $1,18 \text{mmol L}^{-1}$ . Portanto, tem sido observada variação na tolerância a cobre entre os diferentes isolados, mostrando a necessidade de seleção destes fungos, para serem utilizados em áreas contaminadas por esse elemento.

Os fungos apresentam vários mecanismos para tolerar metais pesados (GADD, 1993). Nesses mecanismos podem estar incluídos precipitações extracelulares (TAM, 1995; FORGATY & TOBIN, 1996), ligação a polímeros da parede celular (GALLI et al., 1993), complexação e compartimentalização dos metais pesados (TAM, 1995; BLAUDEZ et al., 2000a; BLAUDEZ et al., 2000b). A produção de pigmentos extracelulares como melaninas tem sido considerado o principal mecanismo de precipitação extracelular de metais pesados (FORGATY & TOBIN, 1996), sendo relacionada principalmente à adsorção de cobre (GADD & DE ROME, 1988). As melaninas são pigmentos de alto peso molecular, marrom-escuros ou

pretos formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (FOGARTY & TOBIN, 1996). Estas são encontradas em animais, plantas, fungos e bactérias (BELL & WHERLLER, 1986; FOGARTY & TOBIN, 1996); em fungos estão localizadas na parede celular ou como polímeros extracelulares. O cobre é considerado um elemento essencial para formação da melanina e na falta desse elemento a síntese de melanina poderá ser bloqueada (BELL & WHERLLER, 1986). Por meio desses mecanismos, os fungos ectomicorrízicos podem apresentar variação quanto a sua capacidade de tolerar diferentes elementos químicos.

Os metais pesados, quando em excesso, podem influenciar negativamente os fungos ectomicorrízicos. Resultados de pesquisa têm demonstrado que a contaminação por metais pesados pode inibir o desenvolvimento do fungo (GRAZZIOTTI et al., 2001) e a colonização ectomicorrízica (BELL et al., 1988). Rühling & Söderstrom (1990), observaram redução no número de frutificações e espécies de basidiomicetos à medida em que aumentava o nível de contaminação por As, Cd, Cu, Pb e Zn. Observa-se que os fungos ectomicorrízicos respondem de maneira diferenciada ao excesso de metais pesados, de acordo com sua espécie e o tipo de elemento químico envolvido.

A seleção de fungos ectomicorrízicos é normalmente realizada em meio de cultura, em condição controlada. Contudo, tanto o meio sólido, quanto o líquido podem apresentar problemas em estudos de tolerância a metais pesados. Gadd (1993) relata a complexação de metais pesados na matriz do substrato podendo alterar a disponibilidade deste, ou o próprio ágar pode também conter metais pesados. Desse modo, Jones & Muehlchen (1994), não observaram inibição no crescimento de *Thelephora terrestris* em meio de cultura sólido contendo 15 mmol L<sup>-1</sup> de zinco. Enquanto que Tam (1995), verificou redução na biomassa maior que 50%, em meio líquido com 150 µmol L<sup>-1</sup> de zinco. Normalmente tem-se encontrado valores de CL<sub>50</sub> (concentração para reduzir 50% do crescimento) em torno de dez vezes menores em meios líquidos do que em meios sólidos (MARTINO et al., 2000; BLAUDEZ et al., 2000a). Esta ampla faixa de variação na CL<sub>50</sub> entre meios sólidos e líquidos mostra a dificuldade que se tem para comparar a tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados. Além disso, medir somente o diâmetro da colônia em meios sólidos pode ser falho em trabalhos que avaliam a tolerância a metais por fungos ectomicorrízicos. *Paxillus involutus* cultivado em meio de cultura sólido, adicionado de Cd, apresentou maior densidade de micélio devido ao maior número de ramificações laterais e menor distância entre os pontos de ramificação (DARLINGTON & RAUSER, 1988).

Os meios de cultura líquidos permitem regulação mais precisa da concentração de metal a qual o fungo é exposto. Dessa forma, os meios líquidos favorecem a determinação da

produção de biomassa fúngica, pois independe da forma de crescimento do fungo (GRAZZIOTTI et al., 2003). Contudo, Hartley et al. (1997) relataram que o micélio de basidiomicetos não se desenvolve completamente em meio líquido e isso pode afetar a resposta do organismo aos metais pesados. Desse modo, os meios líquidos e sólidos podem apresentar desvantagens que devem ser consideradas durante a análise e comparação dos resultados obtidos em trabalhos de seleção de fungos tolerante a metais pesados.

Diante da crescente contaminação do solo por cobre em grandes áreas do Rio Grande do Sul, selecionar fungos ectomicorrízicos tolerantes a esse elemento, torna-se cada vez mais importante, para que possam ser utilizados em programas de biorremediação. Busca-se desse modo, alcançar a máxima eficiência da associação micorrízica em solos contaminados por esse elemento químico. O presente trabalho objetivou determinar a tolerância de fungos ectomicorrízicos a doses de cobre.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Solo e Ambiente Prof. Marcos Rubens Fries, Departamento de Solos da Universidade Federal da Santa Maria, RS. O experimento foi desenvolvido de em duas etapas: uma em meio sólido e outra em meio líquido.

### 2.1 Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura sólido

#### 2.1.1 Isolados ectomicorrízicos estudados

Foram estudadas cinco isolados de fungos ectomicorrízicos: *P. microcarpus* – UFSC - Pt116; *Suillus* sp. – UFSM RA 2.8; *Suillus* sp. – UFSM RA 118; *Scleroderma* sp. – UFSM SC 3.6 e *Scleroderma* sp. – UFSC - Sc124. O isolado de *Pisolithus* e o de *Scleroderma* sp. (UFSC - Sc124) foram obtidos junto a Universidade Federal de Santa Catarina. Os demais foram coletados no Centro de Pesquisa de Recursos Florestais de Santa Maria (FEPAGRO FLORESTA – RS) selecionados e identificados conforme Brundrett et al. (1996).

#### 2.1.2 Procedimento experimental

Os fungos ectomicorrízicos foram cultivados e selecionados em meio de cultivo sólido MNM (MARX, 1969), em pH 4,8 para evitar a precipitação de cobre. Três discos de 10 mm de diâmetro contendo fungo e meio de cultura MNM foram transferidos para placa de Petri contendo o meio MNM sólido. Essas culturas foram incubadas em incubadora microbiológica a 28°C, durante 30 dias.

Após este período foram cortados 3 discos de 10 mm de diâmetro de micélio, das bordas da colônia e transferidos para placas de Petri contendo 12 mL de meio de cultura MNM sólido e diferentes doses de cobre. Estas placas foram colocadas em incubadora microbiológica a 28°C, durante 30 dias.

### 2.1.3 Delineamento Experimental

Os tratamentos testados foram 6 níveis de cobre (0,00; 0,25; 0,5; 0,75 ; 1,0 e 1,25 mmol L<sup>-1</sup>) em cinco isolados de fungos ectomicorrízicos, com sete repetições. O cobre foi aplicado como solução de sulfato de cobre, de forma suplementar em meio de cultura MNM, com sete repetições.

### 2.1.4 Avaliação dos resultados

As variáveis analisadas foram: massa da matéria seca do micélio fúngico, diâmetro médio do crescimento micelial e produção total de pigmentos extracelulares. Para a determinação da massa seca do micélio fúngico, o meio de cultura foi solubilizado em forno microondas para remoção do micélio. Posteriormente, o micélio foi seco em estufa a 60 °C até a obtenção de peso constante, medido em balança de precisão com três casas decimais.

O diâmetro médio do crescimento micelial foi medido com régua de 20 cm e determinada pela média da medida de duas secções transversais a posição central do micélio fúngico. A produção total de pigmentos extracelulares foi obtida pela expressão da absorvância da luz do visível a 350 nm (GRAZZIOTTI, 2001). Para determinação de pigmentos extracelulares, o meio MNM sólido foi aquecido em forno microondas e diluído 5 vezes para se manter líquido, posteriormente foi passado em papel filtro Watman nº 42 para retenção da massa fúngica.

## **2.2 Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura líquido**

### 2.2.1 Isolados ectomicorrízicos estudados

Utilizaram-se cinco isolados de fungos ectomicorrízicos: *Pisolithus microcarpus* – UFSC - Pt116, *Pisolithus* sp. – UFSC - Pt24, *Scleroderma* sp. UFSC - Sc124, UFSM MC e o

UFSM RA 2.8. Os isolados de *Pisolithus* e de *Scleroderma* foram obtidos junto à Universidade Federal de Santa Catarina. O fungo UFSM MC não foi identificado, mas foi utilizado no trabalho por ter sido coletado e isolado de área de mineração de cobre, localizado nas Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS.

### 2.2.2 Procedimento experimental

Os fungos foram previamente cultivados em incubadora microbiológica durante 30 dias a 28°C em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido MNM. Após este período, foram retirados 3 discos de 10 mm de diâmetro das bordas da colônia fúngica e transferidos para erlenmeyer de 250mL contendo 25mL de meio de cultura MNM líquido, em pH 4,8. Esses erlenmeyers foram colocados em incubadora microbiológica a 28°C, permanecendo sem agitação, durante 30 dias. O cobre foi adicionado de maneira suplementar ao meio de cultura líquido MNM, na forma de solução de sulfato de cobre.

### 2.2.3 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os tratamentos testados foram 4 níveis de cobre (0,00; 0,32; 0,64 e 0,96 mmol L<sup>-1</sup>) em cinco isolados de fungos ectomicorrízicos, com seis repetições.

### 2.2.4 Avaliação dos resultados

Avaliou-se a massa da matéria seca do micélio fúngico, o diâmetro médio do crescimento micelial, a produção total de pigmento extracelulares, medido pela absorvância da luz do visível a 350 nm (GRAZZIOTTI et al., 2001) As variáveis foram determinadas conforme descrito no item 2.1.4. Calculou-se também, a produção específica de pigmentos extracelulares, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Produção específica de pigmentos extracelulares} = \frac{\text{Absorbância a 350 nm}}{\text{Massa da matéria seca do micélio}}$$

### 2.2.5 Análise estatística

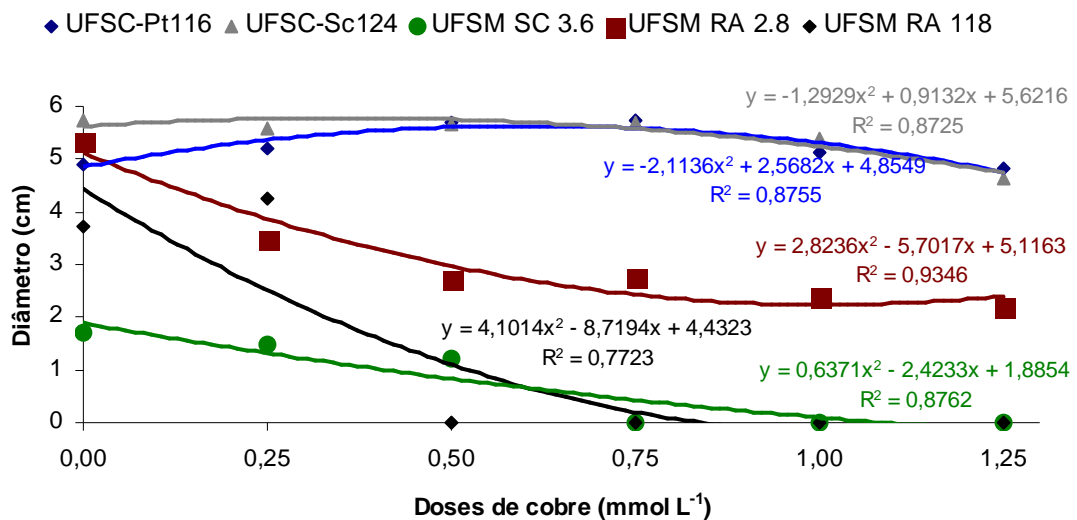
Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando da significância dos efeitos, foram ajustadas equações de regressão para as doses de cobre aplicadas, tomando como base os níveis de significância maiores que 95% ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura sólido

O diâmetro médio do micélio dos cinco isolados foi inibido, de forma diferenciada, com a elevação das concentrações de cobre no meio de cultura sólido (Figura 2). Os fungos que apresentaram maior tolerância ao cobre foram os fungos UFSC - Pt116 e UFSC - Sc124, sendo que o diâmetro médio do fungo UFSC - Pt116 aumentou até 0,61 mmol L<sup>-1</sup> de cobre e o do fungo UFSC - Sc124 até 0,35 mmol L<sup>-1</sup> de cobre, a partir dessas doses os fungos apresentaram pequena redução em seu diâmetro. Os outros fungos testados apresentaram redução em seu diâmetro a medida em que aumentava o cobre no meio de cultura sólido, indicando a inabilidade dessas espécies em crescer em ambiente com excesso de cobre. Resposta diferenciada, quanto à tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados tem sido observada por outros autores, como Hartley et al. (1997), que observaram maior tolerância a cádmio em *Suillus granulatus* em relação a *Suillus variegatus* e Howe et al. (1997), que observaram maior tolerância a cobre para *Pisolithus involutus* em relação a isolados de *Laccaria laccata* e *Scleroderma citrinum*. Esses resultados indicam a necessidade de seleção de espécies de fungos ectomicorrízicos tolerante a metais pesados. Convém destacar que a tolerância de fungos ectomicorrízicos avaliada pelo diâmetro médio do micélio, fornece apenas uma indicação grosseira da tolerância dos fungos, pois embora alguns fungos apresentem menor diâmetros de micélio, estes ainda podem aumentar a ramificação lateral das hifas, produzindo mais massa fúngica (DARLINGTON & RAUSER, 1988). Em contrapartida, os fungos UFSC - Pt116 e UFSC - Sc124 por apresentar a capacidade de expandir seu micélio, aumentando o diâmetro médio do micélio fúngico, em doses mais elevadas de cobre, poderão produzir um volume maior de hifas, aumentando a possibilidade da ocorrência da associação micorrízica em solo contaminado.

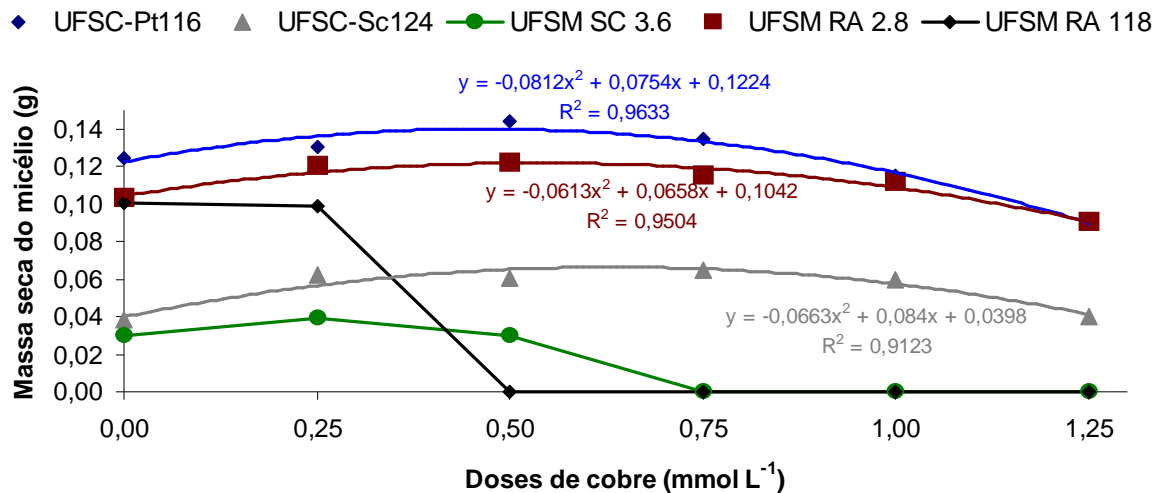




**Figura 2** - Diâmetro médio do micélio de fungos ectomicorrízicos: UFSC-Pt116, UFSC-Sc124, UFSM 3.6, UFSM RA 2.8 e UFSM RA 118 submetidos a doses de cobre em meio de cultura sólido, com 30 dias de incubação a 28 °C.

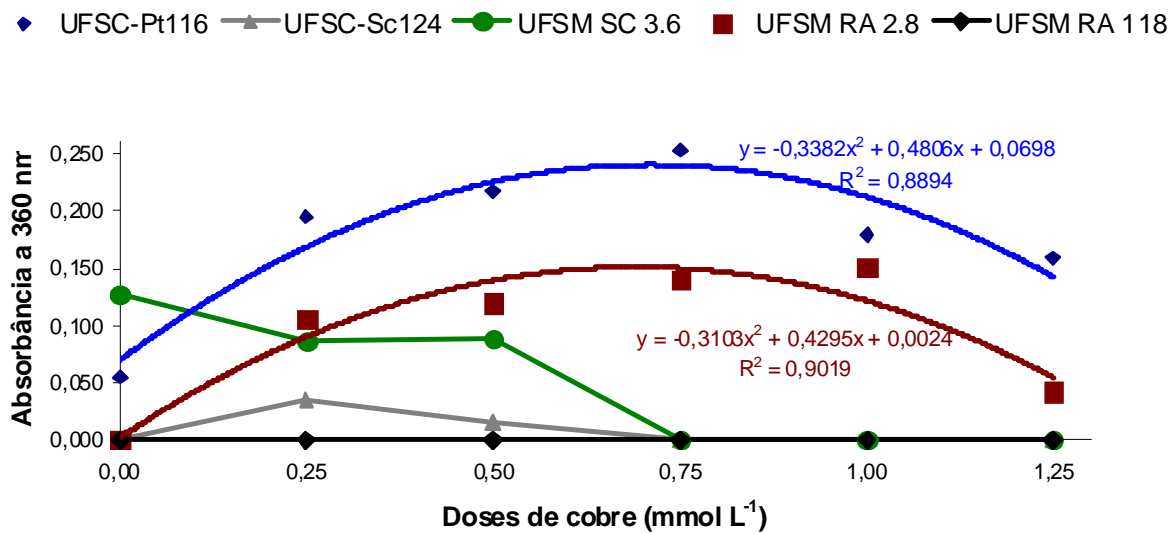
Os fungos apresentaram comportamento diferente em relação à produção de massa seca do micélio fúngico em meio de cultura sólido contendo doses de cobre (Figura 3). Os fungos UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), UFSM RA 2.8 e UFSC-Sc124 (*Scleroderma* sp.) apresentaram maior produção de massa seca em relação aos demais fungos testados, sendo incrementada até a dose 0,46 mmol L<sup>-1</sup> de cobre, 0,54 mmol L<sup>-1</sup> de cobre e 0,63 mmol L<sup>-1</sup> de cobre, respectivamente. Os fungos UFSM Sc 3.6, UFSM RA 2.8 e o UFSM RA 118 reduziram a massa seca do micélio com a aplicação das doses de cobre, indicando não apresentar tolerância ao cobre. O fungo UFSC-Pt116 apresentou CL<sub>50</sub> em 1,69 mmol L<sup>-1</sup> de cobre, o fungo UFSM RA 2.8 CL<sub>50</sub> em 1,93 mmol L<sup>-1</sup> de cobre e o fungo UFSC-Sc124 em 1,58 mmol L<sup>-1</sup> de cobre. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Tam (1995), para *Pisolithus tinctorius*, na qual os valores de CL<sub>50</sub> para os fungos, considerados tolerantes, estavam entre 1,5 e 3,0 mmol.L<sup>-1</sup> de cobre. No entanto, esses valores são superiores ao observado por Graziotti et al. (2001), para os fungos *Pisolithus tinctorius* e *Suillus bovinus*, para os quais os valores de CL<sub>50</sub> em relação ao cobre foram de 1,18 mmol.L<sup>-1</sup> e 0,12 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente, contudo os fungos foram selecionados em meio de cultura líquido. Portanto, a maior produção de massa seca e do diâmetro médio do micélio apresentado pelos fungos UFSC-Pt116 e UFSC-Sc124 em doses mais elevadas de cobre, indicam a capacidade desses fungos crescerem em ambiente contaminado por esse metal pesado. Os demais fungos

apresentaram redução na sua massa seca com o aumento da quantidade de cobre no meio de cultura não sendo indicados para áreas contaminadas por esse elemento.



**Figura 3** - Massa seca do micélio de fungos ectomicorrízicos: UFSC-Pt116, UFSC-Sc124, UFSM 3.6, UFSM RA 2.8 e UFSM RA 118 submetidos a doses de cobre em meio de cultura sólido, com 30 dias.

Os fungos UFSC-Pt116 e UFSM RA 2.8 apresentaram maior produção de pigmentos extracelulares, medido pela absorvância a 360 nm, em relação aos outros fungos testados (Figura 4). A produção de pigmentos extracelulares eleva-se com a adição de cobre ao meio de cultura até  $0,71 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cobre para o fungo UFSC-Pt116 e até  $0,69 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cobre para o UFSM RA 2.8. Trabalhos de pesquisa indicam que esses pigmentos são basicamente formados por melanina (GADD & DE ROME, 1988; FORGATY & TOBIN, 1996). A importância das melaninas como mecanismo de compartimentalização de cobre, deve-se por serem constituídas por grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos e aminas, que possuem sítios potenciais para ligação ou bioadsorção de íons metálicos (FORGATY & TOBIN, 1996). O isolado UFSM RA 118 não apresentou produção de pigmentos extracelulares, enquanto que os isolados UFSM SC 3.6 e UFSC-Sc124 somente até a dose  $0,75 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cobre. Esses isolados apresentam micélio de coloração branca. Conforme Forgaty & Tobin (1996) isolados albinos apresentam capacidade reduzida, ou não conseguem produzir melanina na presença de cobre em excesso no meio de cultura.



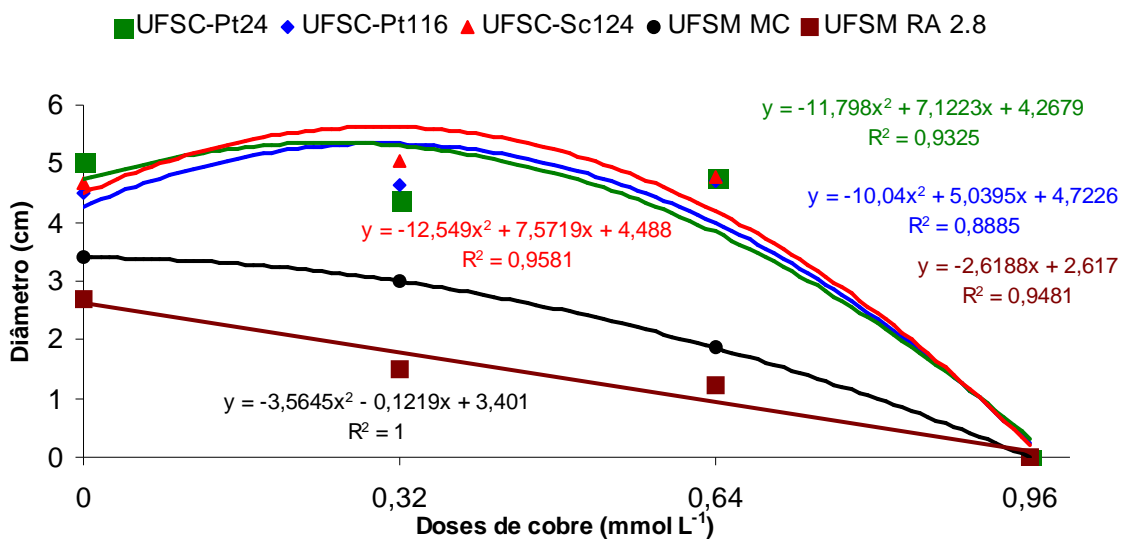
**Figura 4** - Produção total de pigmentos extracelulares expressas pela absorbância a 360 nm na solução do meio de cultura sólido (MNM) com dose crescente de cobre.

A seleção de fungos ectomicorrízicos é de fundamental importância para revegetação de áreas contaminadas por metais pesados. É bastante conhecida a potencialidade das ectomicorrizas de associar-se com plantas expostas ao excesso de metais pesados a partir de mecanismos como: excreção de substâncias quelantes reduzindo a exposição aos metais pesados; imobilização extracelular pela mucilagem, alterações no pH; modificação no sistema de absorção na plasmalena e compartimentalização intracelular. Estes mecanismos apresentam respostas variadas em função do metal, da concentração e localização da ação adversa do mesmo, do fungo e plantas envolvidos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Dessa forma, o fungo UFSC-Pt116 pode ser um organismo promissor em áreas contaminadas por cobre. Entretanto, há a necessidade de conhecer se esse isolado é capaz de estimular o crescimento da planta na presença de metais.

### 3.2 Seleção de fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre em meio de cultura líquido

A análise de regressão para o diâmetro médio do micélio no experimento em meio de cultura líquido indica que os fungos UFSC Pt 24, UFSC-Pt116 e o UFSC-Sc124 apresentam

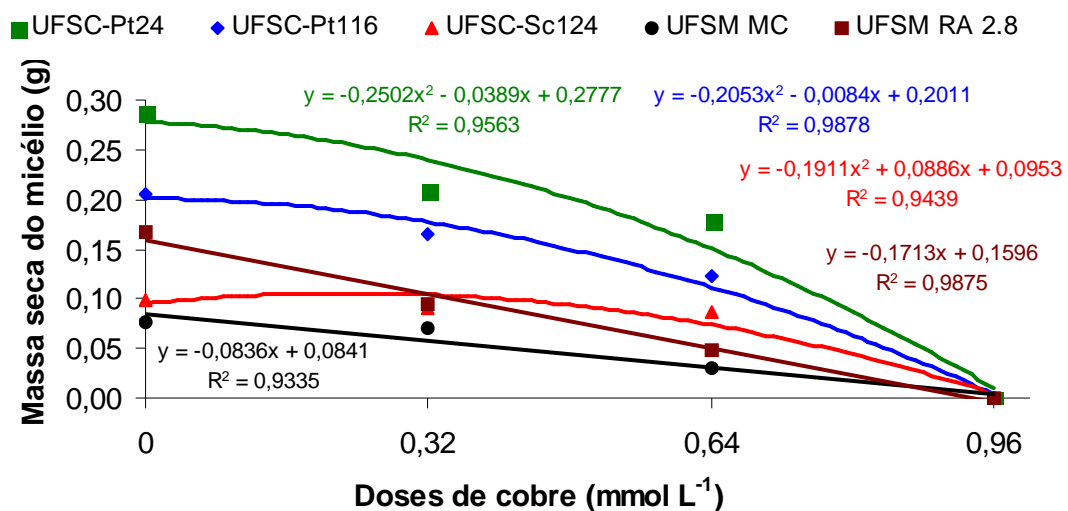
comportamento semelhante em relação à presença de cobre no meio de cultura sólido, tendo seu diâmetro inicialmente aumentado e depois reduzido à medida que aumenta a concentração de cobre no meio (Figura 5). No entanto, diferem quanto ao seu ponto de máximo desenvolvimento. O fungo UFSC-Pt24 apresenta aumento no diâmetro do micélio até a dose de  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ , enquanto que os fungos UFSC-Pt116 e UFSC-Sc124 até a dose de  $0,30 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cobre. A partir dessas doses, o cobre passa a ter um efeito deletério no crescimento desses fungos. Esses resultados indicam que os fungos UFSC-Pt116 e o UFSC-Sc124 podem ser mais tolerantes à adição de cobre ao meio de cultura.



**Figura 5** - Diâmetro médio do micélio de fungos ectomicorrízicos submetidos a doses crescentes de cobre em meio de cultura MNM líquido.

Observa-se na figura 6 que quanto maior a concentração de cobre no meio de cultura líquido, menor foi a produção de massa seca do micélio fúngico, evidenciando não haver tolerância na maior dose de cobre. O fungo UFSC-Sc124 teve seu ponto de máxima produção na dose de  $0,23 \text{ mmol L}^{-1}$ , muito superior à observada para o fungo UFSC-Pt116 que foi de  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 6), e também apresentou maior produção de massa seca do micélio em relação aos outros quatro fungos analisados. Ao analisar a  $CL_{50}$  desses fungos, verifica-se que o UFSC-Pt24 apresenta  $CL_{50}$  em  $0,69 \text{ mmol L}^{-1}$  de cobre, o fungo UFSC-Pt116 em  $0,44 \text{ mmol L}^{-1}$  de cobre, o fungo UFSC-Sc124 em  $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$  de cobre, o fungo MC em  $0,55$

mmol L<sup>-1</sup> de cobre e o fungo UFSM RA 2.8 em 0,44 mmol.L<sup>-1</sup> de cobre. Colpaert & Van Asche (1988) encontraram para *Paxillus involutus*, CL<sub>50</sub> em meio líquido entre 392 a 785 µmol, contudo para *Amanita muscaria* a CL<sub>50</sub> foi de 785 a 2360 µmol, mostrando haver grande variação na resposta dos fungos ectomicorrízicos a doses de cobre. Nota-se maior tolerância do fungo UFSC-Pt116 em relação ao excesso de cobre comparado aos demais fungos testados. Blaudez et al. (2000a, 2000b), observaram que os fungos *Suillus luteus*, *S. variegatus* e *Pisolithus tinctorius* foram os mais tolerantes a Cu, Cd e Zn quando comparados com *P. involutus*. Os isolados de *Pisolithus* mostram-se promissores em áreas contaminadas por metais pesados, necessitando, contudo, de seleção prévia pois há diferença em sua resposta aos metais ao nível de espécie ou de isolado.



**Figura 6** - Massa seca do micélio de fungos ectomicorrízicos UFSC-Pt24, UFSC-Pt116, UFSC-Sc124, UFSM MC e UFSM RA 2.8 em resposta a doses de cobre em meio de cultura MNM líquido.

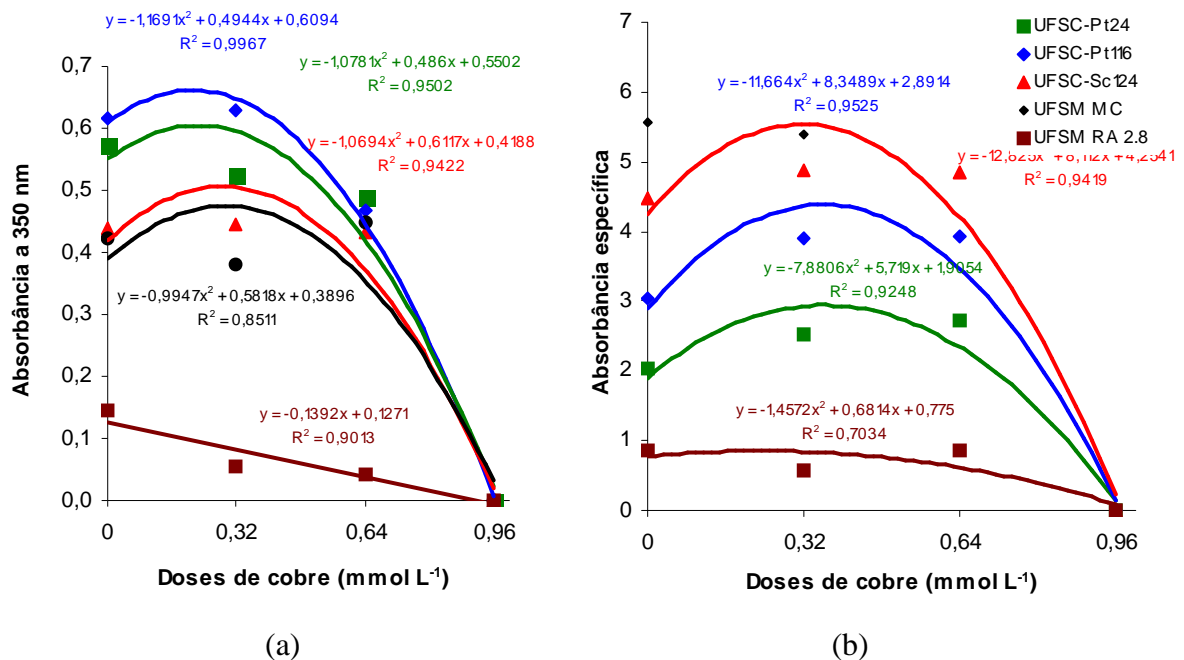
Verifica-se, também, que o fungo UFSM MC, isolado de área contaminado por cobre, apresenta CL<sub>50</sub> inferior ao fungo UFSC-Pt116, o qual não foi isolado de área contaminada, indicando não haver relação entre a tolerância e a origem do fungo ectomicorrízico (Figura 7). Esse resultado corrobora com o encontrado por Graziotti et al. (2001), os quais verificaram que os isolados PT-306 e PT-RV82, embora tenham sido respectivamente tolerante e medianamente tolerante a solo contaminado por mistura de metais pesados, nenhum deles foi

isolado de locais contaminados por metais pesados, indicando não existir relação entre a contaminação do solo de origem e a tolerância aos metais pesados. Denny & Wilkins (1987) trabalhando com dez isolados de *P. involutus*, também não encontraram relação entre a tolerância a metais pesados e o sítio de origem do fungo. Howe et al. (1997) observaram para três isolados de *Laccaria laccata*, cinco de *Paxillus involutus* e um de *Scleroderma citrinum*, que a tolerância ao cobre não estava relacionada a contaminação dos sítios de origem por esse metal pesado. Blaudez (2000b) também observaram que os valores de  $CL_{50}$  de isolados originados de solos poluídos não diferiram estatisticamente dos valores de  $CL_{50}$  de isolados originados de solo não contaminado. No entanto, outros autores evidenciaram a existência dessa relação (EGERTON-WARBURTON & GRIFFIN, 1995). O fungo UFSM MC, embora tenha sido isolado de área contaminada por cobre, apresentou redução linear em seu crescimento com adição de cobre ao meio de cultura, demonstrando baixa tolerância a esse elemento.

Certos fungos podem, ainda, apresentar elevada tolerância a metais pesados (MEDVE & SAYRE, 1994). Este efeito tem sido atribuído à habilidade dessas associações em reter os metais pesados no micélio fúngico, evitando a translocação destes para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (AGGANGAN et al., 1998). Moreira & Siqueira (2002) atribuem essa habilidade a mecanismos que incluem processos externos às hifas, ligação a polímeros da parede celular e processos internos nas células dos fungos, onde os metais pesados podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados. Segundo Doelman (1986) alguns fungos ectomicorrízicos podem acumular mais de 30 vezes a concentração de Cd presente no solo de sua ocorrência. Contudo, são poucos os trabalhos que visam selecionar fungos ectomicorrízicos tolerante a cobre.

A análise de pigmentos extracelulares revelou que o fungo UFSC-Sc124 tem seu ponto de máxima produção em  $0,28 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cobre, sendo superior ao UFSC-Pt116 de  $0,21 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cobre (Figura 7a), contudo, o fungo UFSC-Pt116 apresentou maior produção de pigmentos extracelulares que os demais isolados, em todas as doses de cobre testadas. Na produção específica de pigmentos extracelulares o fungo UFSC-Pt116 foi superior ao UFSC-Sc124, apresentando máxima produção em  $0,36 \text{ mmol L}^{-1}$  contra  $0,32 \text{ mmol L}^{-1}$  do segundo isolado. O seqüestro de metais por melaninas fúngicas representa um mecanismo de proteção para microrganismos que crescem em ambientes contaminados por metais pesados (FOGARTY & TOBIN, 1996). Gadd & De Rome (1988), observaram que a ligação de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) por melanina extracelular e biomassa intacta de isolado albino e pigmentada de *Amorphotheca resinae* e *Amorphotheca pullulans* e quantidade de cobre

adsorvido por unidade de peso do adsorvente foram aumentadas com o incremento da concentração de cobre na solução. A produção de melanina por *A. resiniae* e *A. pullulans* aumentou na presença de cobre (GADD & GRIFFITHS, 1980; GADD & DE ROME, 1988). A estreita relação entre melanina e cobre deve-se ao fato da capacidade máxima de ligação de metais por melaninas fúngicas variar em função do elemento e tem sido demonstrado ocorrer na seguinte ordem: Cu > Cd > Mn > Zn (ZUZINO & MARTIN, 1977; SAIZ-JIMINEZ & SHAFIZADEH, 1984). Desse modo, a melanina pode representar um mecanismo de tolerância ao cobre pelos fungos ectomicorrízicos.



**Figura 7** - Produção total de pigmentos extracelulares (a) e produção específica de pigmentos extracelulares (b) expressa pela absorbância a 360 nm na solução do meio de cultura (MNM) com doses crescentes de cobre.

A produção de massa é uma característica importante durante o crescimento de um organismo, pois pode estar indicando a sua capacidade de adaptar-se a um solo contaminado. Associada a essa característica, a produção de grande volume de propágulos pode aumentar a probabilidade da ocorrência da associação simbiótica. Assim, não somente o fungo UFSC-Sc124, mas também o UFSC-Pt116, por apresentar grande quantidade de massa seca e diâmetro médio do micélio, pode se tornar importante no estabelecimento da associação micorrízica em área contaminada por cobre.

## 4 CONCLUSÕES

Os fungos UFSM RA 2.8, UFSC-Pt116 e UFSC-Sc124 apresentam maior tolerância ao cobre em meio de cultura sólido.

O fungo UFSC-Pt24 apresenta maior tolerância ao cobre seguido pelo fungo UFSC-Sc124 em meio de cultura líquido.

A maior produção de pigmentos extracelulares é obtida com o fungo UFSC-Pt116 e a maior produção específica de pigmentos extracelulares foi com o fungo UFSC-Sc124.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGANGAN, N.S. et al. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blanke. **Geoderma**, Amsterdam, v. 84, p. 15-27, 1998.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 24, p.411-451, 1986.

BELL, R. et al. Decreased incidence of mycorrhizal root tips associated with soil heavy metal enrichment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 106, p. 143-145, 1988.

BLAUDEZ, D.; BOTTON, B.; CHALOT, M. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Microbiology**, Reading, v.146, p. 1109-17, 2000a.

BLAUDEZ, D. et al. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. **Mycology Research**, London, v.104, p. 1366-1371, 2000b.

BRUNDRETT, M., et al. **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400 p.

COLPAERT, J.V.; VAN ASSCHE, J.A. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. **Function Ecology**, London, v.1, p. 415-421, 1988.

DARLINGTON, A.B.; RAUSER, W.E. Cadmium alters the growth of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: a new growth model accounts for changes in branching. **Canadian Journal Botanic**, Ottawa, v.66, p. 225-229, 1988.

DENNY, H.J. e WILKINS, D.A. Zinc tolerance in *Betula* spp. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. **New Phytologist**, London, v.10, p. 535-544, 1987.

DIAS JÚNIOR, H.E. et al. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústrias de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.. 22, p. 331-340, 1998.

DOELMAM, P. Resistência of soil microbial to heavy metals. In: JENSEN, U. KJOLLER, A.; SORENSEN, L.H., EDS. **Microbial communities in soil**. New York: E.A.S., 1986. p. 369-385.

EGERTON-WARBURTON, L.M.; GRIFFIN, B.J. Differential responses of *Pisolithus tinctorius* isolates to aluminum in vitro. **Canadian Journal Botanic**, Ottawa, v.73, p. 1229-1233, 1995.

FERREIRA, D.F. Sistemas de análise estatística para dados balanceados. Lavras: <UFLA/DEX/SISVAR>. 145 p., 2000.

FORGATY, R.V.; TOBIN, J.M. Fungal melanins and their interactions with metal. **Enzime Microbiology. Technology**, New York, 19, p. 311-317, 1996.

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

GADD, G.M.; DE ROME, L. Biosorption of copper by fungal melanin. **Applied Microbiology Biotechnology**, Cambridge, v.29, p.610-617, 1988.

GADD, G.M.; GRIFFITHS, A.J. Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. **Transaction Brimstone Mycology Society**, London, v. 74, v.387-392, 1980.

GALLI, U.; MEIER, M.; BRUNOLD, C. Effect of cadmium on non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce seedlings (*Picea abies* (L.) Karst.) and its ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* (Scop. Ex fr.) Bk & Br.: sulphate reduction, thiols and distribution of the heavy metal. **New Phytologist**, London, v.125, p.873-843, 1993.

GRAZZIOTTI, P.H. et al. Efeito de Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 831-837, 2001.

GRAZZIOTTI, P.H.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Espécies Arbóreas e Ectomicorriza em Relação ao excesso de metais pesados. In: CURI, N.; MARQUES, J.J.; GUILHERME, L.R.J. et al. (eds.). **Tópicos em ciências de solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. p. 55-105.

HARTLEY, J. et al. Toxic interactions of metal ions ( $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  and  $Sb^{-3}$ ) in vitro biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, London, v.137, p. 551-562, 1997.

HOWE, R.; EVANS, R.L.; KETTERIDGE, S.W. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, London, v.135, p. 123-131, 1997.

JONES, D.; MUEHLCHEN, A. Effects of the potentially toxic metals, aluminium, zinc and Koper on ectomycorrhizal fungi. **Jounal Environment Science Health America.**, New York, v. 29, p. 949-966, 1994.

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

LEYVAL, C. et al. Effect of heavy metal pollution on micorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, Florida, v.7, p. 139-153, 1997.

MARTINO, E. et al. Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of zinc íons. **Mycologist Research**, Cambridge, v.104, p. 338-344, 2000.

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.

MEDVE, R.J.; SAYRE, W.G. Heavy metals in red pines, basidiomycete sporocarps and soils on bituminous stripmine spoils. **Journal Pennsylvania Academic Science**, New York, v. 68, p.131-135,1994.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002. 626p.

PETERSON, R.L.; BONFANTE, P. Comparative struture of vesicular-arbuscular mycorrhizas e ectomycorrhizas. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 1, n. 159, p.79-88, 1994.

RÜHLING, A.; SÖDERSTROM, B. Changes in fruibody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. **Water Air Poll**, Stanford, v. 49, p. 375-387, 1990.

SAIZ-JIMINEZ, C.; SHAFIZADEH, F. Iron end copper binding by fungal phenolic polymers: na electron spin resonance study. **Currente Microbiology**, Cambridge, v.10, p 281-286, 1984.

TAM, P.C.F. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. **Mycorrhiza**, Florida, v.5, p. 181-187, 1995.

ZUZINO, H.; MARTIN, J.P. Metal binding by organic macromolecules in soil. I. Hypothesis interpreting the role of soil organic matter in the translocation of metal ions from rocks to biological systems. **Soil Science**, Baltimore, v.123, p. 65-76, 1977.

### CAPÍTULO III: CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS ENTRE UM ISOLADO FÚNGICO E ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS

#### RESUMO

As espécies florestais nativas podem apresentar grande potencial na recuperação de solos degradados. Os fungos ectomicorrízicos podem auxiliar o estabelecimento de plantas nesses ambientes impactado. Contudo pouca ênfase tem se dado aos estudos relacionados à formação da simbiose micorrízica em espécies florestais do Estado do Rio Grande do sul. O trabalho objetivou a observação da formação de ectomicorizas em plântulas de *Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan (angico-vermelho-vermelho), *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (canafístula), *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macb. (grápia) e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong timbaúva. O experimento consistiu da inoculação in vitro do fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 em plântulas das espécies arbóreas citadas. O fungo e as plantas foram cultivados em meio MNM sólido contido em erlenmeyer de 250 mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema monofatorial (1 x 2), sendo a espécie de planta nativa, inoculado ou não com o fungo ectomicorrízico, com sete repetições. Após 35 dias as plantas foram coletadas e avaliadas quanto à associação ectomicorrízica, comprimento radicular, altura de plântula e massa fresca radicular. Os resultados mostram colonização ectomicorrízica nas plântulas de angico-vermelho, canafístula e timbaúva e indícios de colonização nas plântulas de grápia. A inoculação do fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116 reduziu a altura das plântulas de angico-vermelho e canafístula. O comprimento radicular foi reduzido nas plântulas de angico-vermelho, canafístula e timbaúva quando inoculadas com o fungo ectomicorrízico. Conclui-se que as plântulas de angico-vermelho, canafístula e timbaúva formam associação com fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116. O fungo UFSC-Pt116 não demonstrou efeito positivo para as plântulas de angico-vermelho, canafístula e timbaúva no comprimento radicular, altura de plântula e massa fresca radicular.

Palavras-Chave: ectomicorriza, angico-vermelho, canafístula, grápia, timbaúva.

## 1 INTRODUÇÃO

A revegetação de áreas degradadas ou contaminadas por espécies florestais nativas do estado do Rio Grande do Sul vem sendo dificultada devido ao lento crescimento dessas plantas. Estas plantas, por serem adaptadas às condições ambientais poderão apresentar vantagens ecológicas em relação às espécies exóticas, como pínus e eucalipto. Os fungos ectomicorrízicos destacam-se por auxiliar no estabelecimento de plantas em áreas de difícil adaptação. Ao se associarem com as raízes das plantas, desenvolvem estruturas muito hábeis na absorção de água e nutrientes, os quais são posteriormente transferidos às plantas (SMITH & READ, 1997; SILVA, 2002; SILVA et al., 2003a; SILVA et al., 2003b; ANDREAZZA et al., 2004; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, tornan-se necessário estudos relacionados ao estabelecimento e crescimento das plantas nativas, maximizando a característica de serem adaptadas às condições ambientais do Rio Grande do Sul.

O angico-vermelho é uma árvore da família Fabaceae. Possui madeira pesada, elástica, muito durável e resistente à umidade. A casca é rica em tanino, sendo aproveitada nas indústrias de curtume (REITZ et al., 1988). Segundo Backes & Irgang (2002), é uma espécie ideal para recuperação de áreas degradadas de preservação permanente e usada na construção civil e carpintaria.

A canafístula é uma espécie arbórea também pertencente à família Fabaceae, utilizada com sucesso em projetos paisagísticos. É uma espécie pioneira, de crescimento rápido, ótima para reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992). Em função da sua qualidade é indicada para produção de madeira no Centro-Sul do Brasil (CARVALHO, 1998). A madeira pode ser utilizada na construção civil, indústria de móveis, construção naval, marcenaria e carpintaria. É viável para produção de papel e apresenta tanino na casca com teores de 6 a 8% (REITZ et al., 1988).

A grápia também pertence à família Fabaceae, apresenta uma madeira de lei, sem falhas ou cavidades, dura, pesada e muito durável (MATTOS, 2002). É uma planta florestal nativa que apresenta ampla distribuição geográfica no território brasileiro.

A timbaúva também é uma leguminosa, cuja distribuição natural ocorre em todos os países da América do Sul. É ecologicamente importante para a recuperação de áreas degradadas sendo uma espécie de rápido crescimento em formações secundárias (BACKES & IRGANG, 2002). Esta espécie é muito utilizada para carpintaria civil e como planta

ornamental (REITZ et al., 1988).

Apesar da grande importância ecológica e econômica proporcionada por essas espécies, poucos estudos têm sido desenvolvidos devido ao lento crescimento dessas plantas, quando comparado às espécies exóticas, como pinus e eucalipto. A associação dessas plantas com fungos de solo poderá ser uma alternativa para acelerar o crescimento no viveiro ou em condições de campo. As micorrizas são definidas como uma simbiose especializada entre raízes e alguns fungos de solo (FRANK, 1885), que podem melhorar a absorção de nutrientes e água pela planta, como também, promover a proteção contra patógenos.

As ectomicorrizas são um tipo particular de micorriza, na qual a estrutura fúngica das mesmas se desenvolve na raiz e nos espaços intercelulares do córtex, sem que ocorra penetração celular (PETERSON & BONFANTE, 1994). A associação com fungos ectomicorrízicos é caracterizada por uma alteração no sistema radicular da planta. A hifa do fungo micorrízico serve como uma extensão do sistema radicular e é um órgão fisiológica e geometricamente mais eficiente para a absorção que as próprias raízes (TRAPPE, 1981). Em espécies florestais como o *Eucalyptus grandis*, foi observado aumento na produção de massa seca da parte aérea e da altura de plantas quando colonizadas por fungo ectomicorrízico (SILVA, 2002; SILVA et al., 2003a; SILVA et al., 2003b). Em *Pinus elliottii* foi observado que plantas inoculadas com fungo ectomicorrízico também apresentaram maior altura e massa seca da parte aérea (SILVA et al., 2003c). Trabalhos a campo também têm demonstrado efeito positivo dos fungos ectomicorrízicos. Kueh (1994) encontrou maior desenvolvimento e porcentagem de mudas de *Pinus* sp. sobreviventes no campo. Andreatta et al. (2004) observou melhoria na estabilidade de mudas de eucalipto no campo em condições de solo em processo de arenização. Essa associação poderá contribuir também, de maneira eficiente, para o crescimento das plantas florestais nativas.

A resposta na planta se deve ao estabelecimento da simbiose ocorrer por um processo complexo que envolve complexação morfogenética, bioquímica, fisiológica e mudanças moleculares (HILBERT et al., 1991; KASUYA & IGARASHI, 1996; COSTA et al., 2002; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Desse modo, isolados do mesmo gênero podem apresentar rotas, estágios e tempos de colonização diferentes, como podem ocorrer com espécies de hospedeiros diferentes. Como observado por Malajczuk et al. (1990), na qual dois isolados de *Pisolithus tinctorius*, embora tenha iniciado o contato com as raízes do hospedeiro (*Eucalyptus urophylla* S.T. Blake) ao mesmo tempo, apresentaram tempos de colonização diferente.

Dessa forma, parece ocorrer especificidade entre isolados e hospedeiros. Essa

especificidade tem, em alguns casos, dificultado a ocorrência da associação simbiótica de fungos ectomicorrízicos com certas espécies florestais. Voigt et al., (2000), observaram que o fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh95) não colonizou plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden, e apresentou alta especificidade a *Pinus taeda* (VOIGT, 1996). Alguns isolados fúngicos podem apresentar especificidade mesmo em relação a plantas do mesmo gênero, como observado por Oliveira et al. (1994), para espécies do gênero *Eucalyptus*.

Apesar do grande potencial das plantas nativas, poucos são os estudos mostrando a formação da simbiose micorrízica em espécies florestais do Rio Grande do Sul. O trabalho teve o objetivo de avaliar a capacidade de formação de ectomicorrizas de plântulas de angico-vermelho, canafístula, grápia e timbaúva inoculadas com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* sob condições *in vitro*.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Espécies nativas estudadas e origem das sementes

As espécies nativas estudadas foram: angico-vermelho (*Parapiptadenia rígida* (Benth) Brenan), canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), grápia (*Apuleia Ieiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr.) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong).

As sementes foram doadas pelo Centro de Pesquisa de Recursos Florestais (FEPAGRO – FLORESTA), Santa Maria-RS. As sementes de canafístula foram coletadas no próprio Centro de Pesquisa, as de angico-vermelho, grápia e timbaúva em área de preservação permanente de propriedades rurais do distrito municipal de Boca do Monte, Santa Maria, RS.

### 2.2 Fungo ectomicorrízico

O experimento consistiu da inoculação in vitro do fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 em plântulas de angico-vermelho, canafístula, grápia e timbaúva. O fungo foi cedido pela Universidade Federal de Santa Catarina e cultivado em placa de Petri, em incubadora microbiológica à 28 °C, em meio de cultura sólido MNM - Merlin Norkrans Modificado (MARX, 1969) durante 20 dias, sendo posteriormente repicado para erlenmeyer de 250 mL, contendo 60 mL do meio de cultura MNM sólido.

### 2.3 Preparo das sementes

As sementes de angico-vermelho, grápia e timbaúva foram esterilizadas pela imersão em hipoclorito de sódio 10 % por 30 min. e lavadas em água esterilizada, por três vezes consecutivas. Posteriormente, as sementes foram novamente esterilizadas, em álcool a 70 % por mais 30 min. As sementes de canafístula foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10 % por 20 min. e lavadas em água esterilizada, por três vezes consecutivas. Posteriormente, as sementes foram desinfetadas, em álcool 70% por 20 min. Após a esterilização em álcool 70%,

as sementes foram lavadas novamente, em água esterilizada, por três vezes. Para a lavagem das sementes foi utilizado um infusor de chá metálico de Marca Tee-la-Spoon 1 (Tee Gschwendner). Após a esterilização as sementes foram colocadas para germinação.

## **2.4 Germinação das sementes**

Para a germinação, conforme Andrezza (2004) três das sementes previamente esterilizadas foram colocadas em placa de Petri em meio de germinação esterilizado em autoclave. O Meio de germinação continha 500 (M de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3(M de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 7,5g de ágar e 2g de glicose por litro de água, com o pH ajustado para 5,7. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 25°C por 7 dias. Quando as sementes germinaram e atingiram a fase de plântula, foram transferidas para os erlenmeyers com capacidade de 250 mL, com 60 mL de meio MNM sólido. Após a solidificação do meio, o frasco foi fechado com papel alumínio e plástico de PVC transparente, para esterilização em autoclave a 1 atm., durante 20min. Após a autoclavagem, os erlenmeyers estavam prontos para a inoculação das plântulas com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116.

## **2.5 Procedimento experimental**

Três discos de 10 mm de diâmetro foram transferidos para os erlenmeyer de 250mL contendo o meio MNM sólido. Esses erlenmeyer foram incubados em estufa a 28°C, durante 30 dias para o crescimento do micélio fúngico. Após a preparação das sementes, duas sementes pré-germinadas foram adicionadas em cada erlenmeyer. Os erlenmeyers foram mantidos em incubadora com fotoperíodo de 12 horas a 24±1°C, durante 35 dias.

Durante a condução do experimento, foi realizado rodízio dos erlenmeyers, duas vezes por semana, atendendo às exigências do delineamento experimental, cujo objetivo foi eliminar possíveis diferenças quanto à incidência de luz, temperatura e sombreamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema monofatorial (2 x 4 x 7), sendo dois tratamentos com e sem fungo, em quatro espécies vegetais, com sete repetições.

## 2.6 Avaliação dos resultados

Ao término do experimento, as plântulas das quatro espécies foram avaliadas quanto a sua associação micorrízica, comprimento da raiz principal, altura de plântula e massa radicular fresca. A associação micorrízica foi avaliada pela identificação visual do sistema radicular, procurando-se detectar alteração na morfologia externa da raiz, que possivelmente fossem provocadas por fungos ectomicorrízicos, conforme Brundrett et al. (1996). Mediante cortes histológicos transversais das raízes em lupa, utilizando lâmina de corte de marca Gillete®, observou-se em microscópio óptico a morfologia interna, visualizando a presença de manto fúngico e rede de Hartig (BRUNDRETT et al., 1996).

Para medir a altura e o comprimento da raiz principal da plântula a parte aérea foi separada do sistema radicular. A altura de plântula foi medida utilizando-se uma régua graduada de 20 cm de comprimento. Essa variável foi obtida pela distância do colo da planta até a extremidade das últimas axilas foliares. O comprimento da raiz principal foi determinado com régua de 20cm, medindo a distância do colo da planta ao ápice da raiz principal.

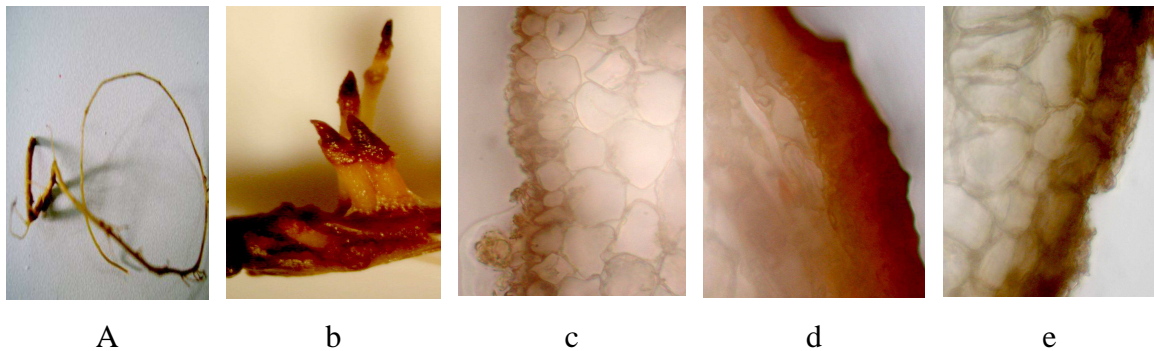
Na determinação da massa fresca radicular, as raízes foram lavadas em água para retirada de resíduos de meio de cultura e fungos ectomicorrízicos, secas em papel mata-borrão e então determinado à massa verde radicular em balança de precisão com quatro casas decimais. As raízes foram conservadas em solução de álcool 50% para a realização da análise da associação ectomicorrízica.

## 2.7 Análise estatística

Os resultados de altura de plântula, comprimento da raiz principal e massa fresca radicular foram submetidos à análise de variância e quando da significância dos efeitos apontados pela análise, comparou-se às médias pelo teste de Tukey, tomando como base os níveis de significância maiores que 95 % ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

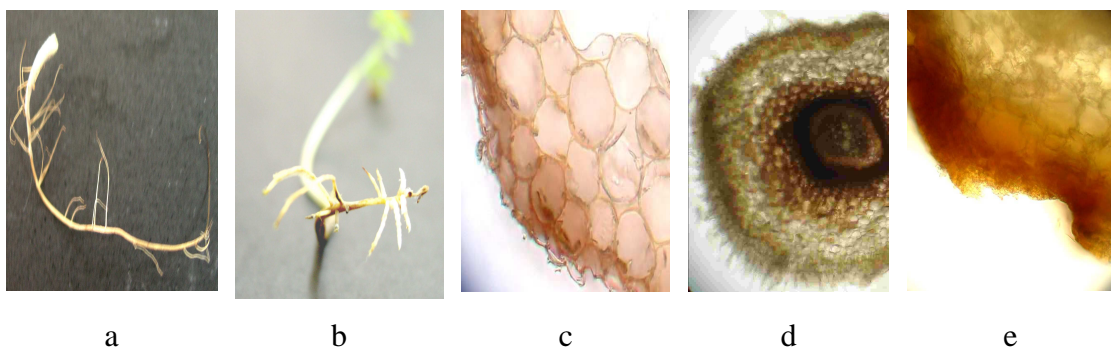
A visualização das raízes de angico-vermelho mostra alterações em sua morfologia externa quando associada ao fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116 (Figura 8). Essas alterações indicam a presença de estruturas como o manto fúngico (BRUNDRETT et al., 1996). Internamente (Figura 9 d, e), as raízes de angico-vermelho também mostraram modificação em sua estrutura em relação ao controle sem fungo ectomicorrízico (Figura 8 c). Esta modificação pode ser observada pela presença da estrutura fúngica denominada rede de Hartig, que é responsável pelas trocas de elementos, nutrientes e carboidratos, entre fungo e o sistema radicular das plantas (BRUNDRETT et al, 1996; SMITH & READ, 1997). A presença dessas estruturas fúngicas associada ao sistema radicular indicam a capacidade da planta em formar associação ectomicorrízica com o fungo inoculado. O manto fúngico é uma estrutura composta por hifas, responsável pelo armazenamento temporário de elementos nutritivos absorvidos pelo fungo (SMITH & READ, 1997).



**Figura 8** - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de *Parapiptadenia rigida* sem colonização micorrízica; morfologia externa (b) e interna (d,e) mostrando raízes com colonização micorrízica. Santa Maria, 2006.

As raízes de canafístula do tratamento sem fungo (Figura 9 a, c) apresentaram desenvolvimento normal, enquanto que as raízes inoculadas com o fungo UFSC Pt 116 demonstraram indícios de colonização micorrízica em sua morfologia externa e interna (Figura 9 b, d, e). Em trabalho anterior, Andreazza (2006) não verificou a ocorrência de colonização micorrízica pelo fungo UFSC-Pt116 em plântulas de canafístula. Entretanto, este

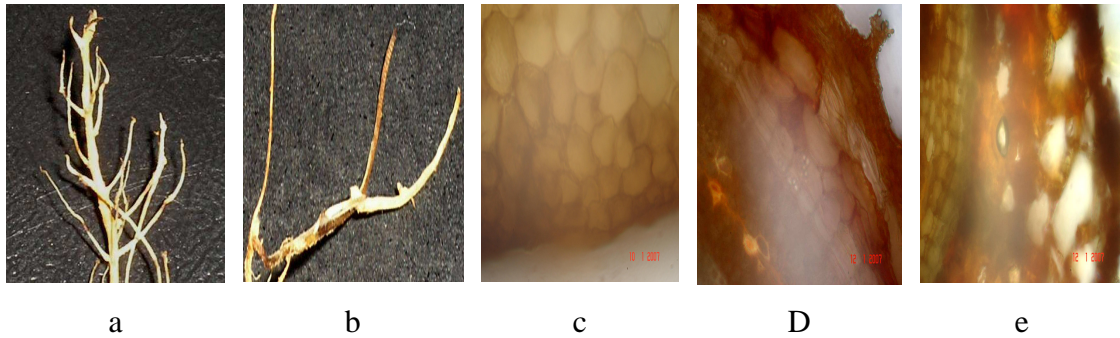
comportamento foi atribuído à dificuldade de contato entre as raízes da plântula e o fungo ectomicorrízico, devido à utilização do papel celofane que separava o meio de cultivo MNM do fungo e da semente, conforme técnica proposta por Chilvers et al. (1986). No entanto, a metodologia adotada neste trabalho foi uma modificação da técnica de Chilvers et al. (1986), na qual não se utilizou o papel celofane. Portanto, as alterações na morfologia externa e interna do sistema radicular da canafístula observadas nesse trabalho, indicam a presença da colonização micorrízica do fungo UFSC-Pt116 em canafístula.



**Figura 9** - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de *Peltophorum dubium* sem colonização micorrízica; morfologia externa (b) e interna (d, e) mostrando raízes com colonização micorrízica. Santa Maria, 2006.

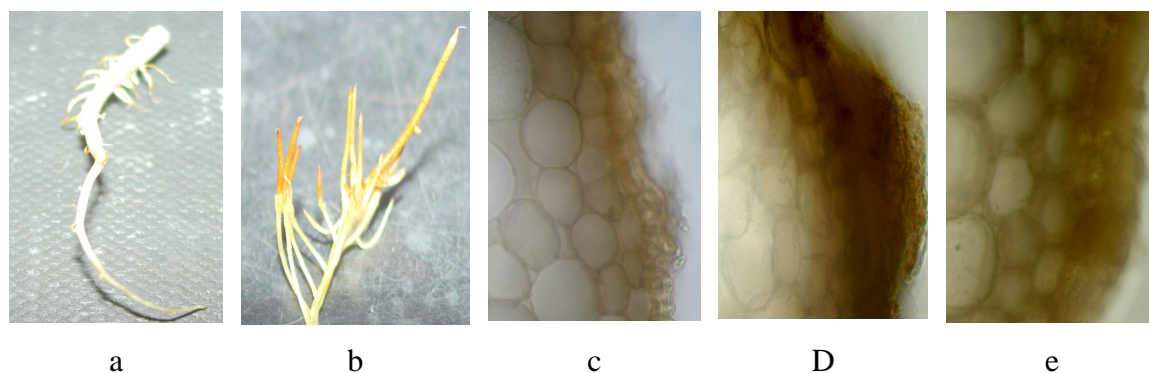
A literatura não apresenta relatos de ocorrência de ectomicorrizas e nem micorrizas arbusculares em grápia em ambiente natural (FRIONI et al., 1999; ZANGARO et al., 2002). Isso pode ser devido a fatores ambientais, como alta fertilidade do solo e pouco inóculo no ambiente (BRUNDRETT et al., 1996; SMITH & READ, 1997), ou à incompatibilidade de fungos ectomicorrízicos e essa espécie vegetal. No entanto, neste trabalho, observou-se que as raízes de grápia apresentavam modificações em sua morfologia interna na presença do fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116 (Figura 10 c, d, e). Essa modificação parecia um início de formação do manto fúngico. Observou-se também, modificação na morfologia externa das raízes submetidas ao fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116 (Figura 10 b), sendo caracterizada pela presença de raízes mais curta e grossa em relação às raízes não colonizadas (Figura 10 a). Conforme Smith & Read (1997), alterações do sistema radicular de plantas submetidas a fungos ectomicorrízicos são comuns, e podem estar indicando a capacidade do fungo de formar simbiose com a planta. Desse modo, verifica-se que as raízes de grápia interagiram

com o fungo micorrízico, sob condições controladas de laboratório. Contudo, não é possível afirmar que as modificações no sistema radicular da grábia são em decorrência da formação da micorriza.



**Figura 10** - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de *Apuleia leiocarpa* não colonizadas; morfologia externa (b) e interna (d, e) mostrando a possível presença da associação micorrízica. Santa Maria, 2006.

A morfologia externa das raízes de timbaúva mostrava um espessamento dos ápices radiculares quando inoculado com o fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116 (Figura 11 b), em relação à raiz sem a inoculação como fungo (Figura 11 a). O espessamento radicular pode ser devido à formação da micorriza que, conforme já foi mencionado, estabelece estruturas ao redor da superfície radicular denominado manto fúngico, o que possibilita observar a associação micorrízica ao olho desprovido de equipamento eletrônico (BRUNDRETT et al., 1996). A observação da morfologia interna confirma essa hipótese, pois também indica alteração interna do sistema radicular das plantas de timbaúva, na qual se observa formação de pequena camada de manto e rede de Hartig (Figura 11 d, e) em comparação com a raiz sem a inoculação (Figura 11 c). Embora não se tenha encontrado associação ectomicorrízica a campo para a timbaúva, as raízes desta planta mostram algum tipo de interação com o fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116, indicando a possibilidade de formar micorriza em condições controladas.



**Figura 11** - Morfologia externa (a) e interna (c) de raízes de *Enterolobium contortisiliquum* não inoculadas; morfologia externa (b) e interna (d,e) indicando raízes com colonização micorrízica. Santa Maria, 2006.

O comprimento da raiz principal das plântulas de angico-vermelho, canafístula e timbaúva foi reduzido em 38, 37 e 23,7 % respectivamente com a presença do fungo UFSC-Pt116 (Tabela 3). Redução do comprimento radicular das plantas tem sido atribuída aos efeitos morfogenéticos proporcionado por fungos ectomicorrízicos quando associados ao sistema radicular e essas alterações incluem deformação das raízes e redução da dominância apical (SMITH & READ, 1997). Esses resultados indicam a possibilidade dessas raízes estarem associadas ao fungo testado. As raízes de grápia não apresentaram diferença significativa em relação ao controle no comprimento da raiz principal, mas apresentaram diferenças na altura de plântula e na massa radicular fresca radicular (Tabela 3).

A massa fresca radicular mostra diferença significativa para as plântulas de angico-vermelho, grápia e timbaúva, entre as plantas inoculadas e controle, sendo reduzida na presença do fungo ectomicorrízico (Tabela 3). Na presença do fungo ectomicorrízico, as raízes podem apresentar pequena redução em sua massa, porém acompanhado de um aumento da área de absorção radicular pela presença das hifas do fungo (SMITH & READ, 1997). Desse modo, a presença do fungo ectomicorrízico não proporciona dano a planta e ainda tende a aumentar a absorção de nutrientes e água. Resultado semelhante foi observado por Andreazza (2006) em plântulas de grápia e mostram que essa espécie florestal pode se associar ao fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116. As plântulas de canafístula não apresentaram diferença estatística na massa fresca radicular entre o tratamento de inoculação e o controle. Esse resultado pode ser devido ao espessamento das raízes quando submetidas a fungos ectomicorrízicos, conforme mostrado por Brundrett et al., (1996). O fungo ectomicorrízico quando presente na raiz da planta pode estar compensando a diminuição do comprimento da

raiz principal, pela presença do manto fúngico. Entretanto, se as condições de crescimento forem satisfatórias para a planta, o fungo poderá estar atuando como parasita, consumindo os carboidratos produzidos pela planta e desse modo, reduzindo o crescimento vegetal (SMITH & READ, 1997).

**Tabela 3** - Comprimento radicular, massa radicular fresca (MRF) e altura da parte aérea de plântulas de grápia, canafístula, angico e timbaúva nos tratamentos sem e com inoculação do fungo ectomicorrízico UFSC Pt 116. UFSM, Santa Maria, 2006.

<b>Planta</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Comprimento Radicular (cm)</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>MRF (mg)</b>
Angico	Sem fungo	11,1* a	6,21 a	31,1 a
	Com fungo	2,69 b	4,16 b	11,0 b
	CV %	12,19	5,49	0,70
Canafístula	Sem fungo	7,4 a	2,89 a	48,4 a
	Com fungo	4,66 b	2,37 b	37,8 a
	CV %	16,25	7,11	3,21
Grápia	Sem fungo	5,24 a	8,71 a	95,4 a
	Com fungo	5,38 a	6,67 b	80,0 b
	CV %	10,14	8,12	0,76
Timbaúva	Sem fungo	7,62 a	11,18 a	111,4 a
	Com fungo	5,81 b	11,16 a	65,9 b
	CV %	3,68	8,48	1,4

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

A altura de plântulas de angico-vermelho, canafístula e grápia foi reduzida significativamente em 33, 18 e 23,4 % respectivamente com a presença do fungo



ectomicorrízico (Tabela 3). A resposta do fungo ectomicorrízico não depende somente da espécie fúngica e planta envolvida, mas também de fatores, como o substrato no qual está sendo estabelecida a associação (BRUNDRETT et al., 1996). Estudos mostram ainda que o efeito das ectomicorrizas sob as plantas tende a diminuir com o aumento do nível de disponibilidade de fósforo (VIEIRA & PERES, 1990). Esse comportamento tem sido atribuído a um provável dreno de fotossintatos do hospedeiro pelo fungo micorrízico (HARLEY, 1978). Esse comportamento foi comprovado por vários autores, os quais indicam que na presença de um substrato com alta disponibilidade de nutrientes, principalmente fósforo, o fungo ectomicorrízico pode atuar como parasita e não como simbiote da planta (VIEIRA & PERES, 1988; SILVA et al., 2003a).

As plântulas de timbaúva inoculadas com o fungo ectomicorrízico não mostraram diferença significativa na altura em relação ao controle (Tabela 3). A igualdade de crescimento entre mudas inoculadas e os controles sem inoculação, na presença de altos níveis de fósforo tem sido relatada (RUEHLE & MARX, 1977; MARX et al., 1985). Contudo, devido à interação existente entre planta, fungo e o ambiente esse comportamento pode não se repetir após o transplante da muda para o campo. É possível que a associação traga vantagens nessa nova condição.

A importância da formação de ectomicorrizas está no aumento da eficiência de absorção de alguns nutrientes. Foram encontradas maiores concentrações de Cu, Mn, Mg, Ca, Fe e Zn nos rizomas e nas frutificações dos fungos do que nos órgãos das plantas sem micorrizas (SMITH & READ, 1997; BELLEI & CARVALHO, 1992). Desse modo, espera-se que as plantas micorrizadas apresentem uma condição nutricional favorável ao seu desenvolvimento, proporcionando maior produtividade.

Além disso, plantas micorrizadas parecem suportar melhor as condições de solo desfavoráveis. Plantas cultivadas em solos de baixa fertilidade, ácidos ou arenosos, quando inoculadas com fungos ectomicorrízicos, apresentaram desenvolvimento superior variando de 1,5 a 3 vezes em relação às plantas sem inoculação (GARBAYE, 1990; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Assim, mesmo em situações desfavoráveis, as plantas teriam melhores condições de se estabelecerem quando inoculadas com fungos ectomicorrízicos. No entanto, torna-se necessário à seleção de fungos que colonizem plantas nativas do Rio Grande do Sul e que, ao mesmo tempo, sejam resistentes a solo contaminado por cobre.

## 4 CONCLUSÕES

As raízes das plântulas de *Parapiptadenia rígida*, *Peltophorum dubium*, e *Enterolobium contortisiliquum* formam micorriza com o fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116, enquanto que não foi possível definir esta associação com *Apuleia Ieiocarpa*, em cultivo in vitro.

A presença do fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 reduziu o comprimento da raiz principal, altura e massa fresca radicular de plântulas de *Parapiptadenia rígida*, *Peltophorum dubium*, *Apuleia Ieiocarpa* e *Enterolobium contortisiliquum*.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREAZZA, R. et al. Espécies de *Pisolithus* sp. na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria v. 14, p. 51-6, 2004.

ANDREAZZA, R. Associação de fungos ectomicorrízicos com espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul, RS. 2006. 73f. Dissertação (**Mestrado em Ciência do Solo**) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

BACKES, P.; IRGANG, B, **Árvores do Sul** - Guia de Identificação e Interesse Ecológico. 2 ed.. Porto Alegre: Pallotti - Instituto Souza Cruz, 2002, 326p.

BELLEI, M.; CARVALHO, M. S. Ectomicorrizas. In: Cardos, E. J. B. N. Tsai, S. M.; Neves M. C. P. (ods) **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p 297-318.

BRUNDRETT, M. et al **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400 p.

CARVALHO, P.E.R. Espécies nativas para fins produtivos. In: CARVALHO, P.E.R.(ed.) **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: EMBRAPA: CNPF, 1998. p.103-125.

CHILVERS, G.A.; DOUGLAS, P.A.; LAPEYRIE, F.F. A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. **New Phytologist**, Oxford, v. 103, p. 397-402, 1986.

COSTA, M. D. et al. Physiology and genetics of ectomycorrhiza formation in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. In: ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N.F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (eds) **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p.143-193. v. 2.

FERREIRA, D.F. [online]. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Homepage: <http://UFLA/DEX/SISVAR>. 2006. 145p.

FRANK, B. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung geiwsser baume durch unterirdische Pilse. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v. 3, p. 128-145, 1885.

FRIONI, L.; MINASIAN, H.; VOLFOVICZ, R. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. **Forest Ecology Management**, Amsterdam, v. 115, p. 41-47, 1999.

GARBAYE, J. Utilization des mycorrhizes en sylviculture. In: STRULLU, D. G. (ed.) **Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées**. Paris: Lavoisier, 1990, p.197-205.

HARLEY, J.L. Ectomycorrhizas as nutrient absorbing organs. **Process Research Society**, London, v. 203, p. 1-21, 1978.

HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhizal development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 977-984, 1991.

KASUYA, M. C. M.; IGARASHI, T. In vitro ectomycorrhizal formation in *Picea glehnii* seedlings. **Mycorrhiza**, Berlin: Heidelberg, v. 6, n. 5, p. 245-253, 1996..

KUEK, C. Issues concerning the production and use of inoculum of ectomycorrhizal fungi in increasing the economic productivity of plantations. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.159, n.1, p. 221-230, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

MALAJCZUK, N. ; LAPEYRIE, F. ; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. **New Phytologist.**, Oxford, v. 114, p. 627-631, 1990.

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.

MARX, D.H. ; HEDIN, A. ; TOE IV, S.F.P. Field performance of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* seedlings with specific ectomycorrhizae and fertilizer after three years on a savanna site in Liberia. **Forest Ecology Management**, Amsterdam, v. 13, p.1-25, 1985.

MATTOS, R.B. Características qualitativas e possibilidade de ganho de fuste em espécies euxilóforas nativas da região central do Rio Grande do Sul. 2002. 91f. Dissertação (**Mestrado em Engenharia Florestal**) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

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

OLIVEIRA, V.L. et al. Spécificité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis d'Eucalyptus viminalis Labill et E. dunnii Maiden. **Agronomie**, v.14, p.57-62, 1994.

PETERSON, R.L. & BONFANTE, P. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas e ectomycorrhizas. **Plant and Soil**. Dordrecht, v. 1, n. 159, p.79-88, 1994.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira de Santa Catarina**. Itajai: Herbário Borba Rodrigues, 1988. 525 p.

RUEHLE, J.L.; MARX, D.H. **Developing ectomycorrhizae on containerized pine seedlings**. New York: USDA Forest Service Research, 1977. 242 p.

SILVA, R.F. População de fungos micorrízicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de Eucalyptus grandis e Pinus elliottii em solo arenoso. 2002.105f. Dissertação (**Mestrado em Agronomia**) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

SILVA, R.F. ; ANTONIOLLI, Z.I. ; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de Eucalyptus grandis W. Hill ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, p. 33-42, 2003a.

SILVA, R.F. et al. Fungos ectomicorrízicos no desenvolvimento de mudas de Eucalyptus grandis Hill ex. Maiden. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.19, p. 9-17, 2003b.

SILVA, R.F. et al. Produção de mudas de Pinus elliottii Engelm. micorrizadas em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.2, p.57-65, 2003c.

SMITH, S. ; READ, D. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1997. 605p.

TRAPPE, J.M. Mycorrhizae and productivity of arid and semi-arid rangelands. In: MANASSAH, J.T. & BRISHEY, E.J. (eds.) **Advances in food producing systems for arid and semi-arid lands**. New York: Academic press. p. 581-599, 1981.

VIEIRA, R.F.; PERES, J.R. Determinação do teor de fósforo no solo para máxima eficiência da associação ectomicorrízica em Eucaliptus grandis. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 12, p. 237-241, 1988.

VIEIRA, R.F.; PERES, J.R. Fungos ectomicorrízicos para Pinus spp. cultivados em solos sob vegetação de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 14, p. 33-39, 1990.

VOIGT, E.L. Compatibilidade de isolados fúngicos ectomicorrízicos provenientes de Eucalyptus e de Pinus em relação a Eucalyptus dunnii Maiden in vitro. 1996. 33f. Monografia (**Ciências Biológicas**) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

VOIGT, E.L.; OLIVEIRA, V.L.; RANDI, A.M. Mycorrhizal colonization and compounds accumulation on roots of Eucalyptus dunnii Maiden inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p. 1905-1910, 2000.

ZANGARO, W. et al. E.M. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Ibagi, Paraná. **Revista Cerne**, Lavras, v. 8, p. 77-87, 2002.

**CAPÍTULO IV: ANÁLISE DE POLIMORFISMO DA REGIÃO DO  
ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS) DO FUNGO  
ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) Cunn.  
UFSC-Pt116**

**RESUMO**

O gene que codifica para a síntese do ácido ribonucléico ribossômico (rRNA) é utilizado como uma ferramenta importante para caracterização de polimorfismo entre os fungos. Nos eucariotos existem muitas cópias desse gene que são arranjadas por espaços não codificados. Estas cópias são altamente conservadas entre espécies de fungos. O objetivo deste trabalho foi estudar a região do Espaço Interno Transcrito (ITS) e analisar as diferenças no polimorfismo da seqüência dessa região no fungo *Pisolithus microcarpus*, UFSC-Pt116, com seqüências dos isolados de *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon* e *Suillus* do GenBank. O DNA do isolado de *Pisolithus* UFSC Pt 116 foi extraído utilizando-se a técnica do CTAB. A partir do DNA foram realizadas reações de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS1 e ITS4, cujo produto amplificado foi purificado e seqüenciado. A região do ITS do fungo mostrou uma banda simples de aproximadamente 650 pares de base. Na análise da seqüência dessa região em comparação com algumas depositadas no GenBank, observou-se a formação de agrupamento com o gênero *Pisolithus*. Os resultados mostraram que esta técnica favorece a identificação de espécies de *Pisolithus*. Foi confirmada a identificação morfológica do isolado como pertencente ao gênero *Pisolithus*. Contudo, com os resultados moleculares não foi possível confirmar a espécie do fungo, devido ao reduzido número de seqüências de organismos classificados como *P. microcarpus* no GenBank

**Palavras chave:** ectomicorriza, análise seqüencial, análise molecular.

## 1 INTRODUÇÃO

Os métodos usuais de identificação de espécies de fungos ectomicorrízicos (fECMs) são baseados em critérios morfológicos, observando-se as características dos carpóforos e dos critérios das chaves de classificação conforme BRUNDRETT et al., (1996). A morfologia é uma característica importante para a identificação, e em muitos casos, pode proporcionar uma rápida e confiável caracterização. As técnicas mais avançadas de identificação de espécies de fungos ectomicorrízicos envolvem a determinação da composição e seqüência do material genético. O uso de técnicas moleculares, por meio da análise de DNA, possui a vantagem de ser sensível, além de não estar sujeito a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (MARTIN, 2007).

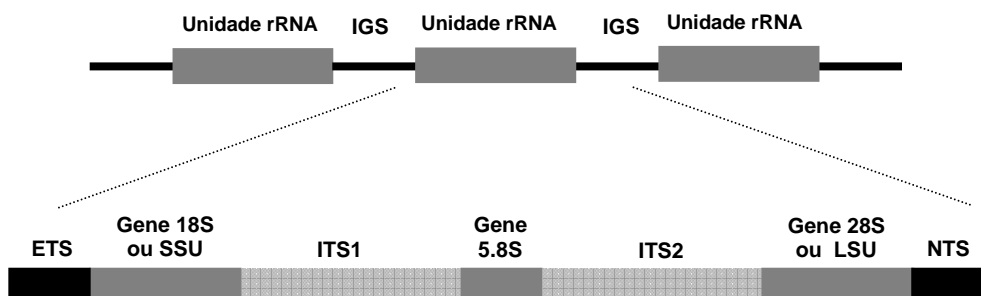
O genoma nuclear possui vasta complexidade e muitas regiões têm se tornado úteis para inferir relações filogenéticas. Em microrganismos, a diversidade e as relações filogenéticas podem ser determinadas através da análise do ácido desoxirribonucléico (DNA). Em organismo eucarióticos, como fungos micorrízicos, as relações filogenéticas e a estrutura genética de populações são freqüentemente baseadas na similaridade da molécula de RNA ribossomal (rRNA) através do seqüenciamento dos genes que a codificam.

A utilização da molécula de DNA como fonte básica da variação tem sido utilizada na resolução de questões taxonômicas e filogenéticas por meio de técnicas como RAPD – Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (WILLIAMS, 1990), RFLPs – Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (BOTSTEIN et al., 1980), AFLPs – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (VOS et al., 1995), STR – seqüência curtas repetidas em microssatélites (LITT & LUTY, 1989), DGGE – eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (ROSADO & DUARTE, 2002), PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase (MULLIS & FALOONA, 1987) com posterior seqüenciamento de bases da fita de DNA e a recente técnica de Piroseqüenciamento. A técnica mais utilizada para a identificação e caracterização de fungos ectomicorrízicos é a amplificação de rRNA por PCR. Essa técnica permite a amplificação de regiões específicas do genoma, como o Espaço Interno Transcrito (ITS), localizado entre regiões altamente conservadas dos genes 18S e 28S. A seqüência do ITS é altamente conservada na espécie, mas é variável entre espécies, sendo muito utilizada para taxonomia de fungos (BRUNS et al., 1991; ANTONIOLLI et al., 1998; ANTONIOLLI et al., 2000; GOMES et al., 2002).



Conforme a classe taxonômica, várias seqüências de regiões específicas do DNA têm sido utilizadas para identificação de microrganismos, de acordo com o grau de conservacionismo. Com a utilização de técnicas moleculares, diversos autores mostraram ser possível a identificação de organismos mantidos em meio de cultura, em raízes, ou por meio da análise direta do solo (BONITO et al., 1995). As relações filogenéticas de organismos eucarióticos podem ser inferidas pela análise da seqüência dos genes que codificam a molécula de rRNA. As vantagens do uso do rRNA em estudos filogenéticos são que todos as células possuem rRNA, estas não precisam ser cultivadas em laboratório e os genes codificadores apresentam poucas modificações ao longo dos anos (TORTORA et al., 2000).

Os genes que originam a molécula de rRNA fazem parte do chamado DNA repetitivo. O rRNA é uma seqüência de bases organizada em regiões. Cada unidade de rRNA é composto por uma região promotora líder chamada Espaço Interno Transcrito (ITS), uma região codificadora de rRNA, a sub-unidade menor do rRNA ou gene 18S, um espaço interno não codificante (ITS1), uma região codificante do rRNA de nome 5.8S, outro espaço não codificante (ITS2), uma região codificadora a subunidade maior do rRNA ou gene 28S, e por fim, um segmento intergênico espaçador não transcrito (NTS) ou espaço intergênico (IGS). A seqüência de DNA que agrupa as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 é chamada de região ITS (Figura 12) (HILLIS & DIXON, 1991, MARTIN & RYGIEWICZ., 2005).



**Figura 12** – Esquema de uma seqüência do DNA mostrando a estrutura do gene do rRNA das células de eucariotos. Espaço intergênico (IGS), subunidade pequena (SSU) do rRNA; subunidade maior (LSU) do rRNA, espaço interno transcrito (ITS1 e ITS2), espaço não transcrito (NTS) e espaço interno transcrito (ITS).

As regiões que codificam para rRNA, isto é, os genes 18S, 5.8S e 28S, não são úteis em termos de polimorfismos em nível intraespecífico, pois essas regiões evoluem muito

lentamente na seqüência de bases e quase nada em comprimento, sendo, portanto, particularmente úteis para análise em nível de família e classes taxonômicas mais elevadas. As regiões ITS1 e ITS2, por não serem codificadas, podem acumular mutações ao longo do tempo, apresentando, assim, um nível intermediário de variação, isto é o que torna essas seqüências apropriadas para identificação de organismos em nível de gênero e/ou espécie. A heterogeneidade apresentada pela região ITS pode ser devido a polimorfismos de tamanho, inserções e deleções *indels* e/ou mutações na seqüência de bases (DAVID et al., 1992).

O uso da técnica de PCR, associada ao seqüenciamento, tornou-se de grande utilidade para inferir relações filogenéticas, determinar a diversidade de microrganismos e estudar os efeitos das modificações ambientais sobre os organismos. Estes estudos possibilitam a obtenção de seqüências de nucleotídeos de uma região específica do DNA, podendo esta ser alinhada com seqüências de táxons similares ou diferentes em softwares especializados para reconstrução de árvores filogenéticas (NILSSON et al., 2006; GUIDOT et al., 1999; ANDERSON & PARKIN, 2006).

O estudo do polimorfismo da região ITS para fungos ectomicorrízicos tem sido determinado para muitas espécies. A análise da região ITS foi eficaz para identificação de 26 isolados, de 8 gêneros e 19 espécies de ectomicorrizas em Viçosa-Brasil, entre os quais estão, *Suillus brevipes* (Peck) Kuntze, *Hebeloma cylindrosporum* Rogmanesi, *Cenococcum geophilum* Fr. e *Scleroderma* sp. (GOMES et al., 2002). Em florestas de pinus e eucalipto, na Tailândia, foram identificadas algumas espécies de fungos, como *Pisolithus albus* e outras ainda não relatadas na literatura (KANCHANAPRAYUDH et al., 2003). Através do sequenciamento da região ITS, descobriu-se um novo fungo micorrízico associado as floresta nativas de *Vateria indica* na Índia (REDDY et al., 2005) e uma nova espécie associada a eucalipto, no Brasil, com resultados promissores no estabelecimento dessa espécie (LUPATINI et al., 2007- não publicado). O uso da região ITS, também pode ser analisada para se conhecer as relações filogeográficas entre fungos, como mostram Martin et al. (2002), que estudaram 102 isolados de várias localidades geográficas do mundo, onde encontrou-se polimorfismo com oito gêneros, entre os quais estão, o *Suillus brevipes* (Peck) Kuntze, *Hebeloma cylindrosporum* Rogmanesi, *Cenococcum geophilum* Fr. e *Scleroderma* sp.

Além de medir as relações filogenéticas, o seqüenciamento da região ITS permite o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores específicos para diferenciação e detecção de fungos micorrízicos específicos (MARTIN & RYGIWICZ., 2005). A exemplo disto, a região ITS do fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC – Pt116 foi escolhida para ser estudada e comparada com outras seqüências oriundas do GenBank, sediado no National Center for

Information (NCBI). Este trabalho teve por objetivo caracterizar e analisar a região do ITS do DNA do isolado do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* UFSC – Pt116, oriundo de floresta de *Eucalyptus dunii* W. Hill ex Maiden.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Manutenção do isolado

O fungo foi multiplicado no Laboratório de Microbiologia do Solo Prof. Marcos Rubens Fries, Universidade Federal de Santa Maria, RS. O isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC–Pt116 foi cedido pela Prof. Vetúria Lopes de Oliveira, da coleção de culturas de Fungos ectomicorrízicos, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

O isolado foi mantido em meio de cultura sólido Melin-Norkans Modificado - MNM (MARX, 1969), em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, em incubadora a 25°C, por 15 dias. Em seguida, foram feitas suspensões micelianas em 25 mL de MNM líquido em erlenmeyers de 250 mL, a partir de discos de 8 mm de diâmetro obtidos das culturas em placa. O material foi incubado a 25°C por 30 dias.

### 2.2 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada conforme Gardens & Bruns (1993), sendo o DNA extraído a partir do micélio produzido em meio líquido MNM. As suspensões micelianas, após serem retiradas do meio líquido, foram secas em papel toalha e submetidas à maceração com nitrogênio líquido até atingirem aparência de pó. Neste estágio, foram adicionados 600 µL de tampão CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), 2% (1,4 M de NaCl, 0,2 M de EDTA, 2% de CTAB e 0,1 M de Tris-HCl) e as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 1 hora. Em seguida, foram adicionadas às amostras 600 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), para promover a separação do DNA do resíduo. As amostras foram novamente submetidas à homogeneização em misturador por 5 min e centrifugadas a 18894 g por 10 min a 15°C, em centrífuga Sigma Laboratory Centrifuge 4K15. Após a centrifugação das amostras, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionaram-se novamente 600 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e foram centrifugadas a 18894 g por 10 min a 15°C. O sobrenadante foi, então, retirado e adicionado a um novo tubo

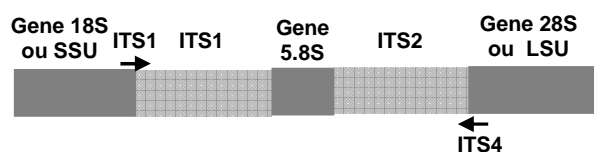
contendo igual volume de isopropanol, para precipitação dos ácidos nucleicos e os tubos permaneceram em temperatura ambiente por 5 min. Após este período as mesmas foram centrifugadas a 18894 g por 10 min. Após este processo, descartou-se o líquido sobrenadante com a inversão do tubo por 5 min para retirar o isopropanol. Adicionou-se 100 µL de etanol gelado 70% (para retirar impurezas presentes na amostra) e as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 5 min. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 18894 g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se o restante do etanol evaporar por 1 hora. O *pellet* foi ressuspensão em 50 µL de água ultrapura e as amostras foram armazenadas a -20°C.

Posterior a extração do DNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com RNase A (10 mg/mL). Adicionaram-se às amostras 2% do volume da amostra de RNase A. As mesmas permaneceram em banho - maria a 37°C por 30 min. Em seguida o DNA foi visualizado em gel de agarose 1,5%. O gel de agarose consiste de 100 mL de solução TBE 1X (Tris-borato-EDTA) (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,0) e 1,5 g de agarose. Esta mistura foi dissolvida em forno de microondas. Após esfriar, adicionou-se 0,5 µL de brometo de etídeo para promover a visualização da presença do DNA genômico.

O gel foi submetido à eletroforese em voltagem de 60 mV por duas horas. Em seguida, foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com câmara Kodak ®.

### 2.3 Reação da Polimerase em Cadeia

As amostras de DNA genômico foram submetidas à PCR para a amplificação da região ITS usando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3' - Forward) e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' - Reverse) (Figura 13) (WHITE et al., 1990).



**Figura 13** - Posição dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 utilizados para amplificar a região ITS do rRNA.

Na reação de PCR utilizou-se a seguinte solução: 1,0 µL de DNA; 2,5 µL de tampão 10X; 3,0 µL de DNTP's (estoque com 1,5 mM); 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (20 mM); 3,0 µL dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (25 pmoles); 0,5 unidades da enzima Taq polimerase (5 unidades/µL); 10,5 µL de água ultrapura para completar o volume da reação para 25 µL.

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: 94 °C por 2 min, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 30 s e 72°C por 35 s e com uma extensão final de 72 °C por 10 min e mantidas a -4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído. A reação de PCR foi realizada em termociclador marca PTC – 100 da MJ Research, Inc. O DNA do isolado foi amplificado em mais de 10 repetições com as mesmas condições para garantir a reprodutividade dos resultados. Os fragmentos de DNA gerados pela PCR foram separados por eletroforese (1,5% gel de agarose) por 2 horas a 60 mV em TBE 1X e seguidos os passos para visualização conforme feito na etapa da extração do DNA.

## **2.4 Purificação e seqüenciamento do DNA**

O produto da PCR foi submetido à purificação adicionado-se 1 volume de polietileno glicol 8000 13% (PEG 8000) (PEG 13% e 1,6M de NaCl). Após esse período, as amostras foram deixadas 16 horas em geladeira e centrifugadas a 18894g por 15 minutos. A solução PEG 13% foi, então, descartada e foram acrescentadas 200 µL de álcool 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 18894g durante 10 minutos. Após esta etapa, o álcool foi descartado, e deixado evaporar por 1 hora. O DNA foi ressuspensão em 8 µL de água ultrapura.

Para o seqüenciamento do DNA, foi utilizado o aparelho Mega BACE 500, desenvolvido pela Amersham Biosciences. O processo de seqüenciamento foi realizado no LabDros - Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal da Santa Maria.

## **2.5 Análise da seqüência do DNA**

Após o seqüenciamento, a seqüência foi editada no aplicativo SeqMan do software DNASTAR (LASERGENE, 1994). Posteriormente a obtenção da seqüência consenso, foi

construída uma árvore filogenética (cladograma) com seqüências de fungos obtidas no GenBank (ALTSCHUL et al., 1990). Para construção e comparação da árvore filogenética, as seqüências do GenBank que apresentaram os dez maiores *scores* foram selecionadas. Desse modo, escolheu-se arbitrariamente, seqüências de 25 isolados de fungos ectomicorrízicos, pertencente aos gêneros *Pisolithus*, *Suillus*, *Scleroderma*, *Rizopogon* (Tabela 4). A seqüência obtida neste trabalho também foi adicionada ao banco GenBank, onde recebeu o número de entrada (lócus).

**Tabela 4** - Lista de fungos ectomicorrízicos do GenBank utilizados para comparação da seqüência ITS com o fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116.

<b>Isolado</b>	<b>Número de acesso*</b>	<b>Referência</b>
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374701	MARTIN (2002)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374704	MARTIN (2002)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374699	MARTIN (2002)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374695	MARTIN (2002)
<i>Pisolithus microcarpus</i>	AM084706	ANDERSON (2007)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF270778	ANDERSON (2001)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374696	MARTIN (2002)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374681	MARTIN (2002)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374680	MARTIN (2002)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374720	MARTIN (2002)
<i>Scleroderma bovista</i>	AB211267	NARA, K., 2006
<i>Scleroderma bovista</i>	AB099901	KANCHANAPRAYUDH (2003)
<i>Scleroderma citrinum</i>	AY935514	RUIZ-DIEZ (2006)
Uncultured Sclerodermataceae	AM087282	FONS (2005)
<i>Scleroderma cepa</i>	DQ453694	FRANK (2006)
<i>Rhizopogon roseolus</i>	AJ810072	MARTIN (2004)
<i>Rhizopogon roseolus</i>	AJ810073	MARTIN (2004)
<i>Rhizopogon vulgaris</i>	DQ822823	PEAY (2007)
<i>Rhizopogon salebrosus</i>	DQ822822	PEAY (2007)
Uncultured Suillus	EF619770	PARRENT (2007)
<i>Suillus tomentosus</i>	EF458018	BALOGH (2007)
<i>Suillus brevipes</i>	DQ822826	PEAY (2007)
<i>Suillus luteus</i>	DQ658862	NYGREN (2007)
<i>Suillus luteus</i>	DQ658861	NYGREN (2007)

\* Número de acesso ao GenBank.

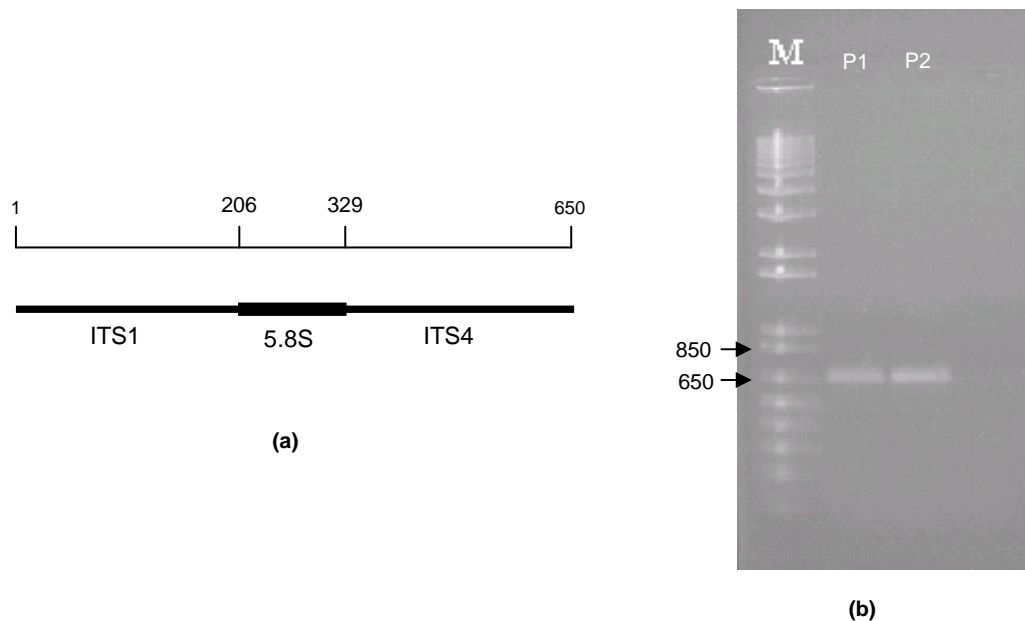
Essas seqüências foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e as relações filogenéticas foram conduzidas utilizando o método vizinho mais próximo com *bootstrap* valor 1000 pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2006).

Para a construção do cladograma, a seqüência obtida foi submetida ao alinhamento pelo programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (PÍPOLO & GARCIA, 2006), por meio do algoritmo Megablast, o qual busca e alinha seqüências similares a seqüência consultada, além de fornecer pontuação de alinhamento, os quais medem o número ou proporção de resíduos que pareiam por apresentarem identidade em suas características.



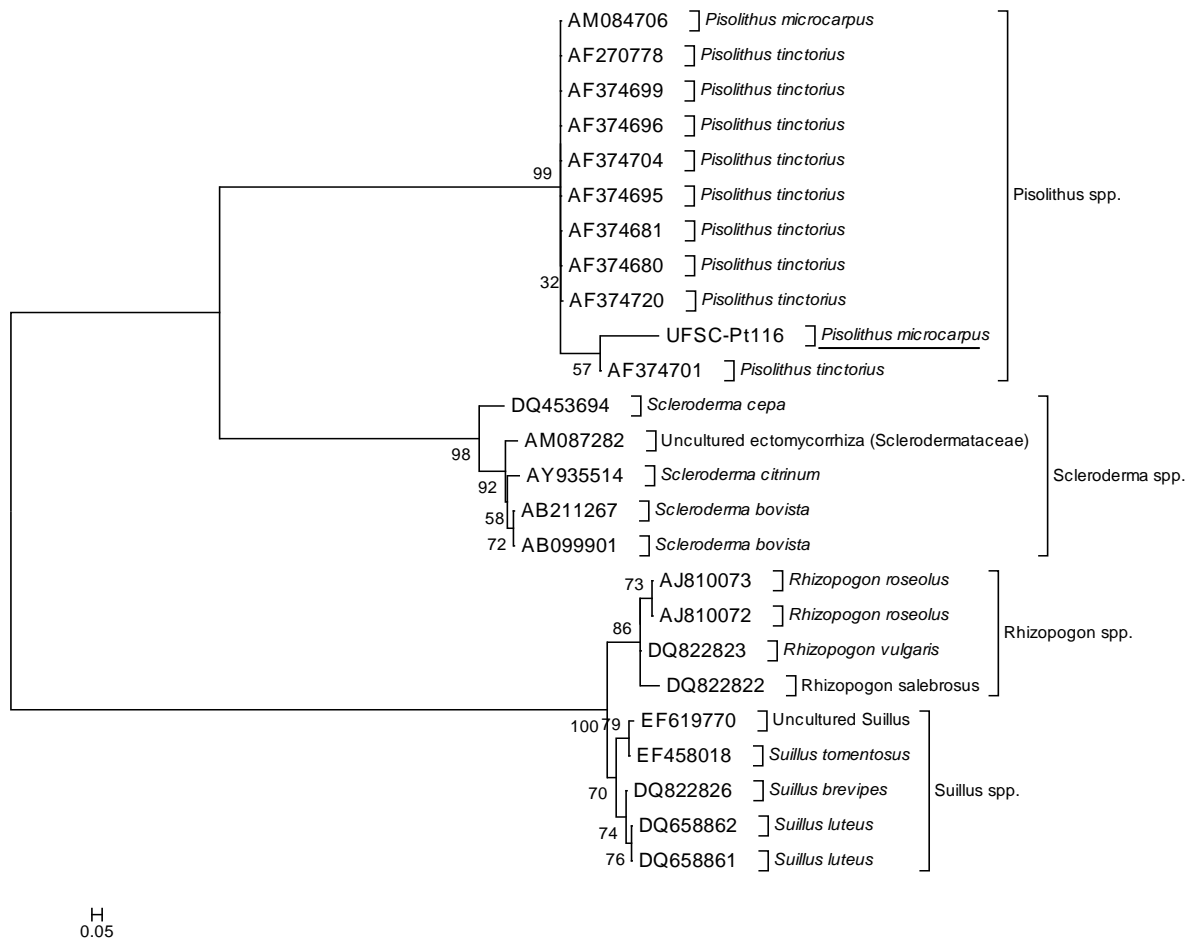
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A visualização do gel de agarose sob luz UV mostrou que o fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 apresenta a região ITS com aproximadamente 650 pares de bases (Figura 14).



**Figura 14** - Região ITS amplificada do fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 e o número de bases encontradas (a). Foto do produto da PCR em gel de agarose (b). Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco (M) indicando amostras da amplificação da região ITS via PCR (P1 e P2).

De acordo com o alinhamento realizado pelo programa Blast, as seqüências mais similares com a seqüência do isolado em estudo pertenciam a nove isolados de *P. tinctorius* e um de *P. microcarpus* (Figura 15). Quando as seqüências foram submetidas à análise de filogenia pelo método de ligação simples (vizinho mais próximo), o isolado *P. microcarpus* UFSC-Pt116 foi claramente agrupado com os fungos do mesmo gênero. De acordo com a árvore filogenética e com observações feitas por meio do alinhamento das seqüências, nota-se, entre os fungos do gênero *Pisolithus*, maior similaridade na seqüência de nucleotídeos com o fungo AF374701.



**Figura 15** - Cladograma baseado na análise de grupamento pelo método de ligação simples (vizinho mais próximo) da região ITS com base em 1000 réplicas de *bootstrap*. Os números das ramificações representam o valor do *bootstrap*. Os Fungos de gênero *Suillus* spp., *Rhizopogon* spp. e *Scleroderma* spp. foram adicionados como “outgroup”.

No GenBank foi encontrada somente duas seqüências de nucleotídeos da região ITS referentes a espécie *P. microcarpus* (AM084706 e AF440867). Embora, haja três bancos de dados de nucleotídeos, como o EMBL-Bank, sediado no European Bioinformatics Institute (EBI), o DDBJ, no Center for Information Biology (CIB) e o próprio GenBank, no NCBI, eles trocam de informações diariamente e fazem parte da *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*. Portanto, são poucas as seqüências de *P. microcarpus* disponíveis para comparações. Ainda, por apresentar seqüência com maior escore, somente à seqüência AM084706 foi utilizada para comparação com o isolado UFSC Pt116.

Quando analisada a seqüência obtida com as depositadas no GenBank, observou-se a formação de grupos em quatro níveis, sendo um grupamento dos isolados da espécie

*Pisolithus* spp. com uma similaridade mínima de 99%, um grupamento referente a isolados da espécie *Scleroderma* spp. com similaridade mínima de 98%, um grupamento com isolados de *Rhizopogon* spp. com similaridade mínima de 86% e outro com isolados de *Suillus* spp. com similaridade mínima de 70%. A seqüência do isolado *Pisolithus* UFSC-Pt116 formou grupamento com as seqüências de isolados de *Pisolithus* spp. É importante salientar que houve formação de grupamentos distintos dos grupos para *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon* e *Suillus* (Figura 4). O agrupamento do isolado da espécie *P. microcarpus* quando comparados com o isolado em estudo, apresentou menor escore ou número de “gaps”.

Contudo, verificou-se que os fungos que formaram o agrupamento com o isolado em estudo foram os que apresentaram maior escore no alinhamento pelo BLAST, mostrando uma grande relação filogenética do fungo estudado com fungos da espécie *P. tinctorius* (Figura 4). Os altos valores de bootstrap mostrados nos “midpoint rooting” (ponto que distância as taxas na árvore) revela grande consistência nos dados, pois valores de Bootstraps acima de 95 representam correta construção na topologia dos ramos (TAMURA et al., 2006).

O alinhamento do gene 5.8S entre os isolados mostrou que essa região não variou em tamanho, nem mesmo entre os gêneros, mas sim houve variações na seqüência de nucleotídeos. Essa pequena variação da região ITS entre os fungos era esperada, pois de acordo com Bruns et al. (1991), Gomes et al. (2002) e Martin & Rygielwicz (2005), a região 5.8S é melhor utilizada quando a intenção for separar níveis taxonômicos ao nível de espécie, pois embora o ITS seja altamente conservado na espécie, ele é variável entre espécies.

Os resultados mostrados neste trabalho indicam grande variação interespecífica e pouca variação intraespecífica na região ITS dos fungos analisados, o que permitiu ao programa efetuar o agrupamento dos fungos em gênero. Essa variação representa modificações graduais que ocorrem ao longo das gerações e que incluem a formação de raças e novas espécies.

Por meio do alinhamento das seqüências também pode ser observada a diferença existente entre o isolado estudado e outro fungo micorrízico da mesma espécie encontrado no GenBank. As diferenças pontuais (indels ou mutações) encontradas nos isolados podem ser devidas ao fato desses fungos estarem submetidos a ambientes diferentes, ou devido a existência de apenas duas seqüências de organismos classificados como *Pisolithus microcarpus* no GenBank, dos quais, um deles estava entre os fungos mais similares ao isolado UFSC-Pt116 e a outra não apresentou similaridade entre as 25 primeiras mostradas no BLAST. Os resultados moleculares não puderam confirmar a espécie a qual o fungo pertence.

## 5. CONCLUSÕES

Pela análise da região do espaço interno transcrito, o isolado UFSC-Pt116 pertence ao gênero *Pisolithus*.

Os resultados moleculares de DNA não permitiram confirmar a espécie do fungo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 26, p. 3389-3402, 1997.

ANDERSON, I. C. E.; PARKIN, P.I. Detection of soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. **Journal of Microbiological methods**, Elsevier, v. 68, p. 248-253, 2006.

ANTONIOLLI, Z. I. et al. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 6, p. 708-715, 2000.

ANTONIOLLI, Z. I. et al. Assessment of variation in sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* from a pasture community. In **Second International Conference on Mycorrhiza**. Uppsala, 1998.

BONITO, R. DI; ELLIOT, M.L.; DES JARDIN, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2809-2810, 1995.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p.314-331, 1980.

BRUNDRETT, M. et al. **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400 p.

BRUNS, T.; WHITE, T.; TAYLOR, J. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecological Systematic**, Palo Alto, v. 22, p. 525-564, 1991.

DAVID, M. et al **Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference**. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 1, n. 4, p. 411-453, 1992.

GARDENS, M.; BRUNS, JD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mucorrhizal and rusts. **Molecular Ecology**, Blackwell, v. 2, p.113-118, 1993.

GOMES, E. A. et al. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 477- 483, 2002.

GUIDOT, A. et al. The nuclear Ribosomal DNA Intergenic Spacer as a Target Sequence To Study Intraspecific Diversity of the Ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on Pinus root systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 903-909, 1999.

HILLIS, D. M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v.66, n. 4, p. 411-453, 1991.

KANCHANAPRAYUDH, J. et al. Molecular phylogeny of ectomycorrhizal *Pisolithus* fungi associated with pine, dipterocarp, and eucalyptus trees in Thailand. **Mycoscience**, New York, v. 44, p. 287-294, 2003.

LASERGENE. **User's guide: A manual for the Lasergene System**. Biocomputing software for windows. 1994. 253 p.

LITT, M. & LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.44, p.398-401, 1989.

LUPATINI, M. et al. Mycorrhizal morphotyping and molecular characterization of *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira, an ectomycorrhizal fungus from *Eucalyptus*. (Não publicado)

MARTIN, F.; DÍEZ J.; DELL, B.; DELARUELLE, C. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. **New Phytologist**, Oregon, v. 153, p. 345-357., 2002.

MARTIN, K. J. Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. **Soil Science Society America Journal**, Stanford, v. 71, n. 2, p. 601-610, 2007.

MARTIN, K.J.; F.; RYGIEWICZ, P.T.. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, Brescia, v. 5, p. 1-11, 2005.

MARX, D. H. The influence of ectotropic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to roots pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathologist**, New York v. 59, p. 153-163, 1969.

MELLO, A. H. DE et al. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, p. 293-301, 2006

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Francisco v.55, p.335-350,1987.

NILSON, R.H., LARSSON, K., LARSSON, E. E KÖLJALG, U. Fruiting body-guide molecular identification of root-tip mantle mycelia provides strong indications of ectomycorrhizal associations in two species of *Sistotrema* (Basidiomycota). **Mycological Research**, Cambridge, p. 1426-1432, 2006.

PÍPOLO, V. C.; GARCIA, J.E. **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. Cascavel: COODETEC – Cooperativa Central de pesquisa agrícola, 2006. 392p.

REDDY, MS.; NATARAJAN, K.; SENTHILARASU, G. *Pisolithus indicus*, a new species of ectomycorrhizal fungus associated with Dipterocarps in India. **Mycologia**, Stanford, v. 97, n.4, p.838-843, 2005.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturante (DGGE) em gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; VALOIS, A.C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002, p. 97-128.

TAMURA, K.; KUMAR, S.; NEI, M. Mega: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p.150-163, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.23, p.4407-4414, 1995.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. e White, T.J. (eds). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990.

## **CAPÍTULO V: COMPORTAMENTO DE CANAFÍSTULA, CEDRO, ANGICO-VERMELHO E TIMBAÚVA A SOLO CONTAMINADO DE COBRE**

### **RESUMO**

A contaminação do solo por cobre tem contribuído negativamente para o estabelecimento de plantas em áreas de mineração e áreas vinícolas em várias regiões do Estado do Rio Grande do Sul. As espécies florestais nativas podem ser uma alternativa na revegetação de áreas contaminadas. O objetivo do trabalho foi avaliar a tolerância de quatro espécies florestais nativas ao excesso de cobre no solo. As espécies nativas utilizadas no trabalho foram a canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), o cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), o angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan) e a timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong). As unidades experimentais foram vasos com capacidade de 500 mL de volume, contendo 500 g de um Argissolo Vermelho-amarelo distrófico típico. Desenvolveu-se um experimento para cada espécie florestal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema (1 x 5) sendo a espécie florestal nativa e cinco doses de cobre aplicado na forma de uma solução de sulfato de cobre [x (nível natural do solo), x + 64, x + 128, x + 192 e x + 256 mg kg<sup>-1</sup> de cobre], com seis repetições. Foram avaliados os seguintes parâmetros: massa seca da parte aérea, comprimento radicular, área superficial específica radicular, teor de cobre na raiz e parte aérea da planta. Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando da significância dos efeitos apontados pela análise de variância, os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de regressão. Mudanças de cedro pode acumular cobre tanto na parte aérea como radicular da planta. Mudanças de timbaúva acumularam cobre na raiz da planta, não translocando para a parte aérea. O angico-vermelho pode ser considerado uma planta exclusiva de cobre. As espécies canafístula, angico-vermelho e timbaúva apresentam maior tolerância a solo contaminado por cobre, seguido pelo cedro.

Palavras-chave: Metal pesado, plantas nativas, tolerância



## 1 INTRODUÇÃO

O cobre é um micronutriente essencial ao desenvolvimento das plantas. Sua função biológica é de doar e receber elétrons, assumindo facilmente as forma de  $\text{Cu}^+$  (reduzido) e  $\text{Cu}^{++}$  (oxidado), agindo no transporte de elétrons usados pelas metalo enzimas como citocromo *c* oxidase, lisil oxidase ou superóxido dismutase (SOLIOZ & STOYANOV, 2003; PEDLER & PARKER, 2002). Portanto, toda espécie vegetal necessita de cobre para realizar suas funções vitais básicas, como a produção de energia ao nível de cadeia respiratória, ou para detoxificação das formas tóxicas de oxigênio. Contudo, a contaminação do solo por cobre tem contribuído negativamente para o estabelecimento de plantas em áreas de mineração e áreas vinícolas do sul do Brasil.

A matéria orgânica e os óxidos de manganês são os componentes que retêm a maior quantidade e mais fortemente o cobre não disponível do solo (McLAREN & CRAWFORD, 1973a; 1973b). A concentração de cobre na solução do solo é controlada pelo equilíbrio químico, envolvendo a formação de complexo de esfera interna com a fração orgânica do solo (McLAREN & CRAWFORD, 1973a). A especificidade de adsorção do cobre ao solo é o processo mais importante no controle da concentração de cobre na solução do solo (McLAREN & CRAWFORD, 1973b). Isto se deve ao fato de o cobre estar na solução do solo na forma iônica e complexada, nos sítios de troca normal do solo, nos sítios de troca específica, oclusos nos óxidos do solo, nos resíduos biológicos e organismos vivos do mesmo (McLAREN & CRAWFORD, 1973a; 1973b). Também o íon  $\text{Cu}^{2+}$  pode formar ligação de complexo de esfera interna com os óxidos do solo, ficando indisponível aos organismos vivos (PEDLER & PARKER, 2002). Desse modo, o maior parte do cobre está adsorvido às partículas do solo com diferentes forças de ligação, ficando uma pequena quantidade disponível na solução do solo. No entanto, o cobre adsorvido nas partículas do solo pode funcionar como um compartimento de reserva, repondo esse elemento para formas mais disponíveis.

O pH apresenta um considerável efeito nas quantidades de cobre adsorvido pelos solos (McLAREN & CRAWFORD, 1973b). O pH do meio pode influenciar na formação de complexos do Cu com substâncias húmicas, diminuindo a toxicidade de cobre do solo aos organismos. Os micronutrientes em geral, inclusive o cobre, são mais solúveis ou disponíveis em pH mais ácido e sua solubilidade no solo diminui, quando é aumentado o pH (McBRIDE,

1994; MEURER, 2004; 2006). Alguns autores afirmam que o pH é o ponto chave que altera a variabilidade da especiação química dos metais no meio (TWISS et al., 2001).

A acumulação de cobre, nos solos das regiões vinícolas, ocorre nas primeiras camadas do solo em função da interação que esse metal apresenta com as frações de matéria orgânica e argila (EPSTEIN & BASSEI, 2001). Contudo, a camada superior do solo também é a camada em que se localiza a maior parte do sistema radicular das plantas, chamada de rizosfera. As plantas podem sofrer um efeito deletério em seu crescimento quando cultivadas em ambiente com excesso de metais (PAIVA et al., 2003). Esse efeito pode estar relacionado à indução, pelos metais, de distúrbios fisiológicos e nutricionais (MARSHNER, 1995; SOARES, 1999; PAIVA et al., 2000; PAIVA et al., 2001). Desse modo, plantas pouco resistentes ao excesso de cobre apresentariam dificuldades em se estabelecer nessas áreas. Necessita-se, portanto, de estudos que selecionem espécies de plantas para a revegetação de solos contaminados com metais, entre eles o cobre. A seleção de espécies florestais tolerantes a solo contaminado por cobre pode ser uma alternativa para o restabelecimento vegetal em áreas, onde naturalmente as plantas não se estabeleceriam devido ao potencial contaminante presente.

A revegetação de áreas contaminadas por metais é lenta e envolve o desenvolvimento de tecnologias apropriadas que vêm sendo empregadas na recuperação destas áreas, como a fitorremediação. Conforme O'LEARY (1994), as plantas podem ser consideradas exclusoras, indicadoras ou acumuladoras de metais. Nas exclusoras, a concentração interna do metal é mantida constante até que seja atingido o nível crítico do metal no solo, sendo recomendadas para fitoestabilização do contaminante. Nas indicadoras, a concentração interna do metal reflete a concentração externa do metal. Nas plantas acumuladoras, a concentração no tecido da planta é superior à do solo, permitindo serem utilizadas para fitoextração dos contaminantes. A fitorremediação utiliza, portanto, plantas adaptadas a excesso de metais para filtrar ou absorver esses elementos do solo (CHANDHMY et al., 1998). Segundo Khan (2001), esta tecnologia vem sendo muito usada no processo de descontaminação do solo devido à ação menos destrutiva para a fauna edáfica, mas tem como fator limitante a pequena quantidade de plantas adaptadas para crescer em ambiente contaminado e pobre em nutriente.

A escolha adequada de espécies utilizadas em processos de revegetação é muito importante, devido à necessidade de adaptação aos fatores limitantes de crescimento da planta, principalmente quando relacionados a solos degradados (PRALON & MARTINS, 2001). Em 20 anos de pesquisa, Carvalho (1998), indica as espécies madeireiras nativas não leguminosas do Sul do Brasil, como sendo uma alternativa para o reflorestamento, como o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), pau-marfim (*Balfourodendron*

*riedelianum* (Engl.) Engl.), a canjerana (*Cabrelea canjerana* (Vell.) Mart.), pau-ferro (*Myracrodruon balansae* (Engl.) Santin), pessegueiro-bravo (*Prunus myrtifolia* (L.) Urb). Entre as espécies florestais nativas leguminosas o autor cita o angico-vermelho-vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan, angico-branco (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina*), angico-cascudo (*Anadenanthera peregrina* (Well.) Brenan var. *falcata*), timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong), a bracatinga (*Mimosa scrabella* Benth.), canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e guapuruvú (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake). Outras espécies florestais importantes pela sua adaptação às condições ambientais do Rio Grande do Sul podem ser encontradas no Inventário Florestal Contínuo/RS (RIO GRANDE DO SUL, 2002).

As plantas nativas podem ser uma alternativa na revegetação de áreas degradadas. A canafístula é uma leguminosa (Fabaceae) de ampla e expressiva dispersão, muito freqüente nas matas da bacia do rio Paraná, considerada uma excelente espécie para recuperar áreas degradadas. O cedro pertence à família Meliaceae encontrado em todo Brasil, recomendada como espécie ornamental com grande importância ecológica, sendo utilizada na recuperação de áreas degradadas, pois cresce em vegetação inicialmente secundária. O angico-vermelho é uma leguminosa encontrada do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul, ideal para recuperação de áreas degradadas de preservação permanente e a timbaúva também é uma leguminosa com distribuição natural em todos os países da América do Sul, sendo considerada ecologicamente importante para a recuperação de áreas degradadas, pois apresenta rápido crescimento em formações secundárias (BACKES & IRGANG, 2002). Porém, pouco se sabe sobre o comportamento dessas plantas em solo contaminado por cobre.

Deve-se destacar que é grande o potencial de estabelecimento de espécies florestais nativas. Isso decorre do fato de essas plantas estarem adaptadas às condições predominantes de clima e solo. Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento e selecionar dentre quatro espécies florestais nativas as mais tolerantes a solo contaminado com cobre.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Centro de Pesquisas de Recursos Florestais (FEPAGRO – FLORESTA) de Santa Maria, RS, no período de outubro de 2005 a Março de 2006. O solo utilizado para produção das mudas foi classificado como Argissolo vermelho-amarelo distrófico típico (EMBRAPA, 1999). O solo foi coletado sob campo nativo, na profundidade de 0 – 20 cm. Este foi seco ao ar, destorroado e tamisado em peneira de 4mm. Adicionou-se mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio (relação molar 3/1) em quantidade equivalente a 6,6 toneladas de calcário por hectare, cuja finalidade foi elevar o pH para 5,5. O solo foi incubado por 20 dias com conteúdo de água de aproximadamente 80 % da capacidade de campo, para que o carbonato de cálcio e o carbonato de magnésio pudessem reagir. Aplicou-se o equivalente a 30 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de uréia no momento do plantio. Não foi realizada adubação de base e cobertura para fósforo e potássio, pois o solo apresentou alto teor desses nutrientes. A análise química do dolo revelou pH-água: 5,0, Ca+Mg: 8,4 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup>, H+Al: 5,5 cmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup>, P: 20,8 mg kg<sup>-1</sup>, K: 212 mg kg<sup>-1</sup>, matéria orgânica: 2,5 g kg<sup>-1</sup>, argila: 21 g kg<sup>-1</sup> e cobre extraído por HCl: 0,8 mg kg<sup>-1</sup>.

### 2.2 Essências florestais

As espécies arbóreas utilizadas no trabalho foram a canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), o cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), o angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan) e a timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong). As sementes foram doadas pelo Centro de Pesquisa de Recursos Florestais (FEPAGRO – FLORESTA), Santa Maria-RS. As sementes de canafístula foram coletadas no próprio Centro de Pesquisa, as de angico, grápia e timbaúva em área de preservação permanente de propriedades rurais do distrito municipal de Boca do Monte, Santa Maria, RS, no ano de 2005. As mudas foram inicialmente produzidas em areia lavada e quando apresentaram um par de folhas definitivas, foi transplantada uma muda por vaso de cultivo.

### **2.3 Delineamento experimental**

Foi desenvolvido um experimento para cada espécie florestal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema (1 x 5) sendo a espécie florestal nativas e cinco doses de cobre [x (nível natural do solo), x + 64, x + 128, x + 192 e x + 256 mg kg<sup>-1</sup> de cobre], com seis repetições. O cobre foi aplicado como solução de sulfato de cobre, de forma suplementar, em cada unidade experimental. No total, foram 120 unidades experimentais. Como unidade experimental foram utilizados vasos com capacidade de 500 mL de volume, contendo 500 g de solo.

### **2.4 Condução do experimento**

O experimento teve duração de seis meses, sendo o transplante das mudas realizado no dia 01/10/2005 e colhido no dia 31/03/2006. Durante o experimento, foram realizadas irrigações diárias, por pesagem de cada vaso. Adicionaram-se 150 ml de água destilada, correspondente a 15% do peso do solo seco, o que correspondia a aproximadamente a 80 % da capacidade de campo. A irrigação foi realizada pesando-se todos os vasos e completando a diferença do peso com água até 650 g.

O rodízio dos vasos foi realizado semanalmente, atendendo às exigências do delineamento, com o objetivo de eliminar possíveis diferenças quanto à incidência de luz solar, temperatura e sombreamento.

### **2.5 Parâmetros analisados**

Avaliou-se a altura de planta, massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento radicular (CR), área superficial específica radicular (ASE), conforme Tennant (1975), teor de cobre na raiz e parte aérea da planta (SILVA, 1999).

### 2.5.1 Altura de planta

A altura de planta foi medida utilizando-se uma régua graduada de 50 cm de comprimento. Para evitar a interferência da irregularidade da superfície do solo contido nos potes, colocou-se uma pequena lâmina de isopor no ponto zero da régua formando um ângulo de 90°.

### 2.5.2 Massa seca da parte aérea e do sistema radicular

As plantas foram cortadas rente ao solo, separando-se a parte aérea do sistema radicular. As raízes foram separadas do solo e lavadas com água destilada. Em seguida, a parte aérea das plantas e as raízes foram colocadas em sacos de papel, identificadas e secas em estufa a 65°C, onde permaneceram até atingirem o peso constante. Após pesou-se em balança digital com três casa decimais, obtendo-se a massa seca da parte aérea. A massa seca radicular foi utilizada para determinação de cobre na raiz.

### 2.5.3 Comprimento radicular

Na análise do comprimento radicular, separou-se uma amostra de 0,2 g de raízes cortadas em 1cm e distribuiu-se em uma placa quadriculada de 1cm x 1cm e, em seguida, contou-se o número de intersecções das raízes com as linhas da placa. O comprimento radicular foi estimado seguindo-se o método de Tennant (1975), conforme a fórmula abaixo.

$$L = N^{\circ} \text{ intersecções} \times Fc$$

Sendo,

L: Comprimento radicular

Fc: Fator de correção, que foi de 0,7857, porque usou-se quadrícula de 1cm x 1cm.

### 2.5.4 Área superficial específica radicular

A área superficial específica do sistema radicular foi estimada segundo Tennant (1975), conforme a fórmula abaixo.

$$S = 2\pi \times R \times L$$

sendo,

S: Área Superficial Específica

L: Comprimento Radicular

R: Raio

Para o cálculo do raio, utilizou-se a fórmula:

$$R = \sqrt{\frac{V}{L \cdot \pi}}$$

sendo, V = Volume da massa verde do sistema radicular.

### 2.5.5 Análise química

O material utilizado para esta análise foi a massa seca da parte aérea e massa seca radicular. Estas foram moídas separadamente em moinho tipo faca, passada em peneira de 2 mm e então submetida à análise química para determinar as concentrações de cobre (Cu). Na análise de Cu empregou-se a digestão por via úmida com solução Nitro-perclórica (HNO<sub>3</sub> + HClO<sub>4</sub>) na proporção 3:1, segundo metodologia descrita pela Silva (1999). As concentrações de Cu foram determinadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica.

### 2.6 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada por meio da análise de variância e quando da significância dos efeitos apontados pela análise de variância, os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de regressão pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2006), tomando como base os níveis de significância maiores que 95% (p < 0,05).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na comparação das médias de massa seca da parte aérea, observa-se que a canafístula, o cedro e a timbaúva apresentam diferença significativa com aplicação das doses de cobre (Tabela 1). A melhor dose para a canafístula foi quando se aplicou 192 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, para o cedro 128 mgkg<sup>-1</sup> não diferindo do controle e para a timbaúva foi até a dose de 192 mgkg<sup>-1</sup>, também não apresentando diferença em relação ao controle. A dose mais alta 256 mgkg<sup>-1</sup> proporcionou decréscimo na massa seca da parte aérea dessas plantas. O angico não mostrou diferença na massa seca da parte aérea nas doses de cobre testadas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Massa seca da parte aérea (g) de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), cedro (*Cedrela fissilis*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) nas diferentes doses de cobre. Santa Maria, 2006.

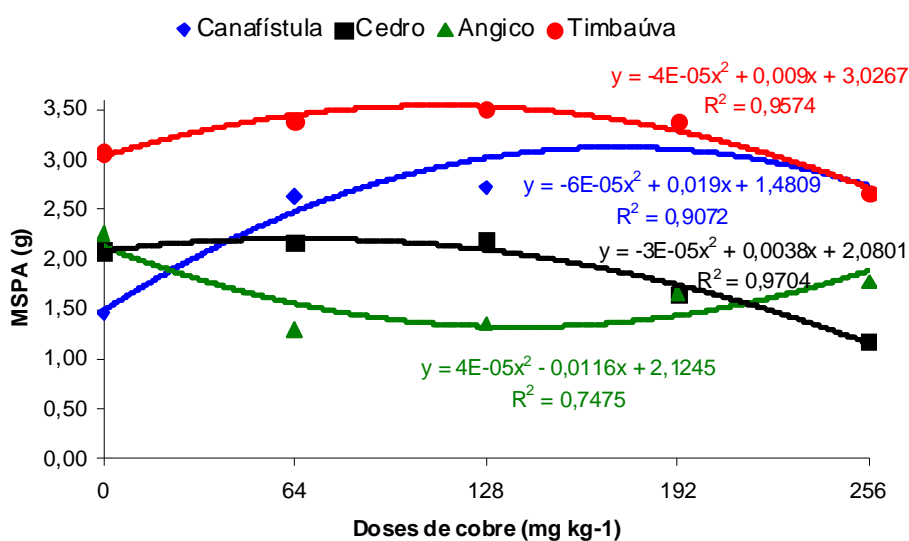
Dose Cobre mg kg <sup>-1</sup>	Canafístula	Cedro	Angico	Timbaúva
	----- MSPA (g) -----			
0	1,24* c	2,08 ab	1,93 a	3,07 ab
64	2,63 b	1,99 ab	1,30 a	3,37 a
128	2,71 ab	2,19 a	1,35 a	3,50 a
192	3,33 a	1,64 ab	1,66 a	3,38 a
256	2,66 b	1,18 b	1,77 a	2,66 b
CV %	5,28	10,7	7,94	5,11

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05).

Entretanto, na análise de regressão para massa seca da parte aérea observou-se redução na produção do cedro a partir da dose de 63,3 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. Já na timbaúva essa redução se deu a partir da dose de 112,5 mg kg<sup>-1</sup> de cobre (Figura 16). Esses resultados indicam que a timbaúva, além de produzir mais massa seca que o cedro, tolera níveis mais altos de contaminação por cobre. A massa seca da parte aérea do angico-vermelho aumentou com adição de cobre superior a 145 mg kg<sup>-1</sup>. A canafístula reduziu sua produção de massa seca a partir de 158,33 mg kg<sup>-1</sup> de cobre (Figura 16). Plantas de aveia têm apresentado crescimento fraco, clorose e morte, inviabilizando a produção e o manejo de cobertura verde em áreas com



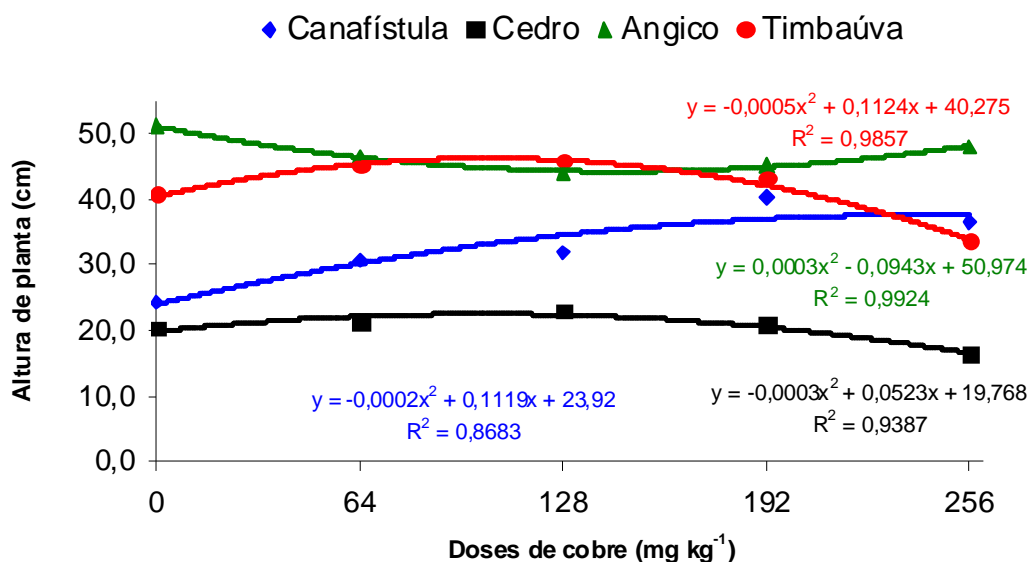
alta concentração de cobre (SANTOS et al., 2004). Fernandes & Henriques (1991) relataram que alta concentração de cobre na solução do solo, pode proporcionar alterações nos tecidos vegetais, em nível bioquímico e fisiológico, os quais podem resultar em perdas consideráveis do potencial produtivo das plantas. Tem-se detectado alteração na atividade da enzima nitrato redutase em plantas expostas ao excesso de cobre, reduzindo o N total na planta e o tamanho da planta devido à redução na produção de clorofila (LUNA et al., 1997).



**Figura 16** - Massa seca da parte aérea (MSPA) de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), cedro (*Cedrela fissilis*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.

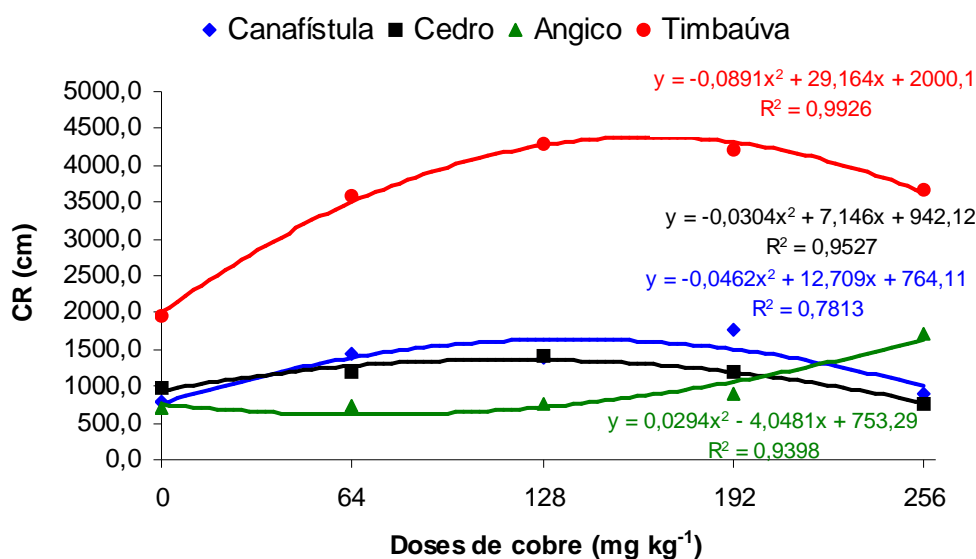
A análise de regressão para altura de planta mostra que as mudas de cedro reduziram seu crescimento a partir da dose de 87,17 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, enquanto que na timbaúva o efeito negativo somente foi observado a partir de 112,4 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. O angico-vermelho apresenta decréscimo em seu crescimento nas doses iniciais de cobre, aumentando a partir de 157,16 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, enquanto que a canafístula apresenta aumento em seu crescimento nas doses analisadas (Figura 17). Marques et al. (2000) verificaram que entre 20 espécies arbóreas, plantas de *Cedrella fissilis* destacaram-se por terem seu crescimento pouco influenciado em solo contaminado por cobre e outros metais como zinco, chumbo e cádmio. Os resultados do presente trabalho concordam com os de Marques et al. (2000), pois somente

na dose mais alta o cedro apresentou influência da dose de cobre, mostrando redução de 20 % na altura de planta em relação ao controle.



**Figura 17** - Altura de mudas de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), cedro (*Cedrela fissilis*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.

O comprimento radicular de canafístula, cedro e timbaúva foram inicialmente beneficiados pelas doses de cobre aplicado (Figura 18). No entanto, a partir da dose 137,54 mg kg<sup>-1</sup> de cobre para a canafístula, 112,5 mg kg<sup>-1</sup> de cobre para o cedro e 166,36 mg kg<sup>-1</sup> de cobre para timbaúva o comprimento radicular tende a reduzir. Adalsteinsson et al. (1997) observaram efeito deletério na estrutura e funções das raízes de *Betula pendula* com o excesso de cobre. Estes resultados corroboram com os de Graziotti (1999), que verificou que o excesso de metais reduz o crescimento de raízes absorventes, podendo causar necrose nessas raízes. Soares et al. (1999), verificaram que a adição de 192 μmol L<sup>-1</sup> de cobre, reduziu em 95 % a matéria seca de raízes de duas espécies de eucalipto. Embora haja redução nesse parâmetro, as mudas de timbaúva apresentaram maior comprimento radicular em relação à canafístula, ao cedro e também, em relação ao controle, mesmo na dose mais alta de cobre.



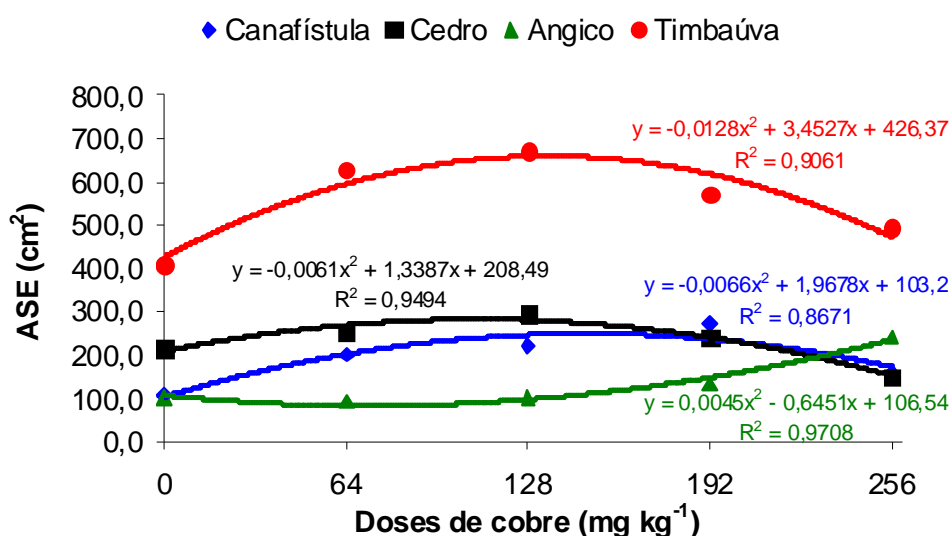
**Figura 18** - Comprimento radicular (CR) de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), cedro (*Cedrela fissilis*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.

Observou-se que o comprimento radicular do angico-vermelho apresentou inicialmente um decréscimo, aumentando a partir da dose de 68,84 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. Esse resultado indica que o sistema radicular dessa espécie de planta apresenta mecanismos para exclusão ou compartimentalização do cobre reduzindo, assim, o potencial tóxico desse elemento.

A rizosfera é considerada um ambiente diferenciado no solo, pois as plantas modificam o ambiente em vários aspectos relacionados a concentrações de nutrientes, pH, temperatura e exsudatos radiculares, como ácidos orgânicos de baixo peso molecular (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Além disso, os organismos que estão localizados na região da rizosfera podem melhorar ou aumentar a absorção de metais pesados, como o Cu e Zn que estão poluindo o solo, removendo esses metais da solução do solo (CHEN et al., 2005). Desse modo, tornam-se necessários estudos, para esclarecer os mecanismos que permitem as plantas de angico-vermelho aumentar seu sistema radicular em doses mais elevadas de cobre.

A canafístula, o cedro e a timbaúva mostraram inicialmente um aumento na área superficial específica radicular, sendo posteriormente reduzida (Figura 19). A área superficial específica da canafístula reduz a partir da dose de 149,07 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. No cedro foi

reduzida quando se aplicou  $109,73 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre e na timbaúva  $135,26 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre (Figura 19). Esses resultados mostram que o sistema radicular do cedro é mais sensível ao excesso de cobre que o sistema radicular da timbaúva e canafístula. Observa-se também, tanto para o cedro como a timbaúva, que a área superficial específica (Figura 19) reduz-se em dose mais baixa de cobre, em relação ao comprimento radicular (Figura 18), indicando desse modo, um provável engrossamento da raiz, o que pode prejudicar a planta na absorção de outros elementos nutritivos.

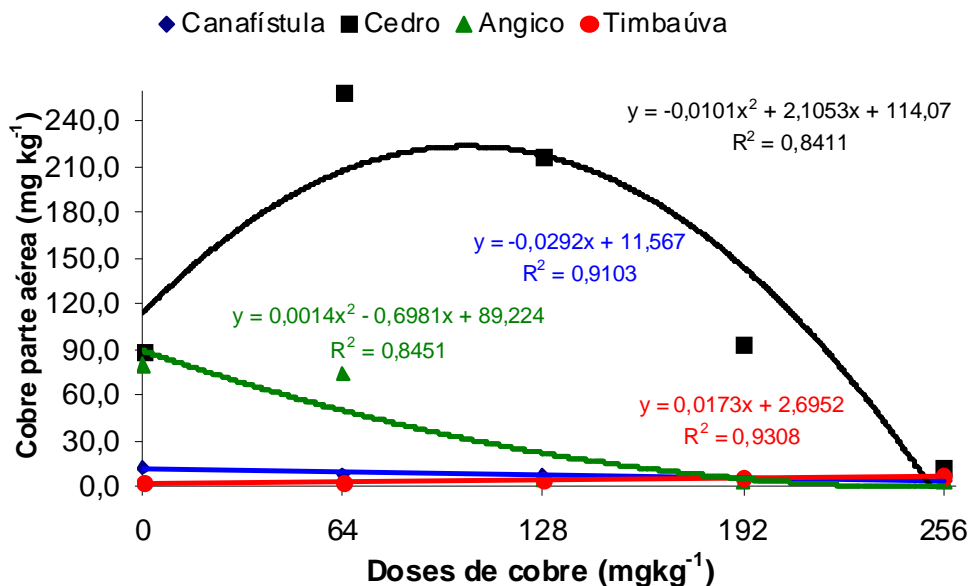


**Figura 19** - Área superficial específica radicular (ASE) de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), cedro (*Cedrela fissilis*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.

As mudas de angico-vermelho aumentam sua área superficial específica a partir da dose de  $71,68 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre. A área superficial específica radicular é um parâmetro de grande importância para obtenção de sistemas radiculares com maior capacidade de absorção de nutrientes. Isso significa que para um mesmo peso de raízes, aquela que apresentar maior área superficial específica, irá possuir maior quantidade de raízes finas (TENNANT, 1975), conseqüentemente terá maior capacidade de absorção de nutrientes. O maior comprimento e área superficial específica radicular das plantas de angico-vermelho, em doses elevadas de cobre, em relação aos demais tratamentos podem condicionar o estabelecimento de espécies

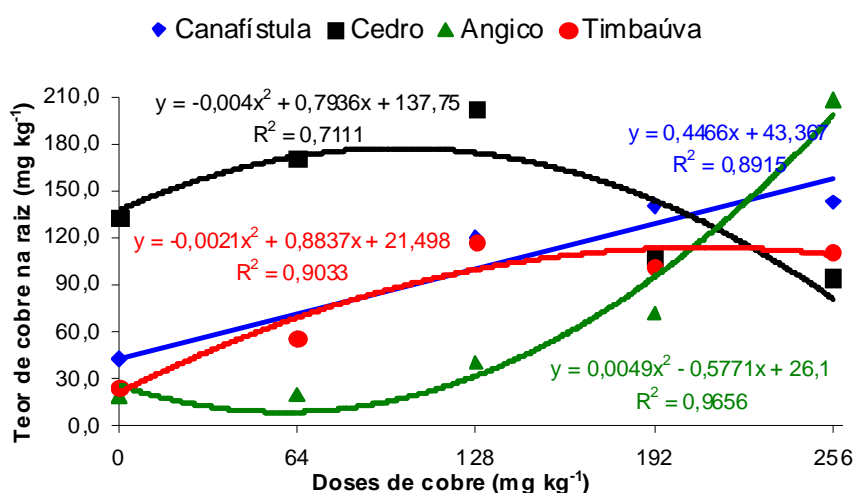
florestais em solos contaminados por cobre. O aumento da área superficial de absorção se traduz em um incremento na área de solo explorado pelas raízes e conseqüentemente, plantas com maior área de absorção.

Mudas de canafístula e timbaúva não alteram o teor de cobre na parte aérea da planta com a aplicação das doses de cobre (Figura 20). Tem-se detectado que em plantas com alta capacidade de extração de metais pesados, como o cobre e zinco, a maior acumulação de cobre é no sistema radicular (CHEN et al., 2005). Desse modo, a planta evita o excesso de cobre nos tecidos da parte aérea. O cedro apresenta inicialmente aumento no teor de cobre, até a dose estimada em 168,12 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, posteriormente ocorre redução nesse parâmetro. Esse aumento inicial indica que o cedro pode ser uma planta acumuladora de cobre até a dose testada. O angico-vermelho apresenta redução até a dose 128 mg kg<sup>-1</sup>, permanecendo baixo nas doses subseqüentes. Isso pode indicar que a canafístula, o angico-vermelho e a timbaúva possuem mecanismos bioquímicos para evitar o acúmulo de cobre na parte aérea da planta, comportando-se como planta excludora de metais (O'LEARY, 1994).



**Figura 20** - Teor de cobre na parte aérea (Cu PA) de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), cedro (*Cedrela fissilis*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) submetidas a doses de cobre. Santa Maria, 2006.

Mudas de cedro e timbaúva apresentam inicialmente aumento no teor de cobre na raiz com as doses de cobre testadas (Figura 21). O cedro acumula cobre até a dose de 170 mg kg<sup>-1</sup>. Nota-se que o cedro além de apresentar aumento no teor de cobre na raiz e parte aérea da planta, também aumenta sua massa seca da parte aérea (Figura 16). A timbaúva seria capaz de acumular cobre até a dose de 182,5 mg kg<sup>-1</sup> em seu sistema radicular evitando que seja translocado à parte aérea da planta, conseguindo manter a mesma massa seca da parte aérea em doses mais elevadas (Figura 16). Para a extração de metais do solo buscam-se plantas com capacidade de absorver contaminantes, acumulando-os na matéria seca. Estas plantas são próprias para fitoextração do elemento contaminante, sendo consideradas plantas com capacidade acumuladora (BAKER, 1981).



**Figura 21** - Teor de cobre na raiz de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*), cedro (*Cedrela fissilis*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) submetidas às doses de cobre. Santa Maria, 2006.

Contudo, as plantas testadas não podem ser consideradas hiperacumuladoras de metais. Plantas hiperacumuladoras são capazes de extrair e acumular mais de 1000 mg de cobre por kg de tecido seco (RASKIN et al., 1994). O cedro e a timbaúva podem então ser considerados plantas extratoras de cobre. Mudas de angico-vermelho inicialmente não alteraram o teor de cobre na raiz, indicando ser uma planta com capacidade de exclusão de

cobre até a dose  $92,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , já a canafístula mostra um comportamento linear em relação o teor de cobre na raiz. Comportamentos lineares podem classificar plantas como indicadoras da contaminação de metal no solo (O'LEARY, 1994).

O uso de plantas para a revegetação de áreas contaminadas depende do objetivo proposto para a recuperação da área. Nesse sentido, para fitoextração de um contaminante são utilizadas plantas extratoras ou acumuladoras de metal, para a fitoestabilização são utilizadas plantas exclusoras de metal. Desse modo, pode-se utilizar o cedro para a fitoextração, o angico-vermelho para fitoestabilização e canafístula como indicadoras da contaminação por cobre. Por apresentar aumento na massa seca da parte aérea, até a dose  $192 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre, a canafístula pode ser indicada para revegetação de solo contaminado por cobre.

A fitorremediação tem muitos problemas, um deles é a pouca eficiência na retirada dos metais pesados do solo. Mas este problema pode ser diminuído quando for utilizado juntamente com outras técnicas como a remediação e simbiose com fungos micorrízicos, podendo ser uma alternativa mais eficaz a médio e longo prazo para a biorremediação *in situ* de locais contaminados com metais pesados, sendo que esta interação de práticas reduz custos extras em comparação com a utilização de somente a remediação química (KHAN et al., 2000).

## 4 CONCLUSÕES

Mudas de cedro podem acumular cobre tanto na parte aérea como radicular da planta e as de timbaúva acumulam cobre na raiz da planta não translocando para a parte aérea.

O angico-vermelho é uma planta exclusora de cobre.

As espécies canafístula, angico-vermelho e timbaúva apresentaram maior tolerância a solo contaminado por cobre.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADALSTEINSSON, S. et al. Monitoring copper-induced changes in fine root geometry of birch (*Betula pendula*) using nutrient film technique, **Physiology Plant**, Rockville, v. 99, p. 379-384, 1997.

BACKES, P. & IRGANG, B. **Árvores do Sul** - Guia de Identificação e Interesse Ecológico, 2. ed. Porto Alegre: Pallotti – Instituto Souza Cruz, 2002. 326p.

BAKER, A.J.M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal Plant Nutrition**, New York, v. 3, p. 643-654, 1981.

CARVALHO, P.E.R. Espécies alternativas para o reflorestamento e o seu futuro industrial nos estados do Sul do Brasil. IV SIMPÓSIO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, I SIMADER – RS, 1. 2008, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria – RS: UFSM, 1998. p.21-28.

CHANDHMY, T. M.; HAYES, W. J.; KHAN, A. G.; KHOO, C. S. Phytoremediation – focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soils. **Australian Journal of Toxicology**, Adelaide, v. 4, p. 37-51, 1998.

CHEN, Y.X. et al. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. **Environment International**. Ottawa, v. 3, p. 861-866, 2005.

EMBRAPA. Centro nacional de pesquisa de solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 1999. 412p.

EPSTEIN, L.; BASSEI, S. Pesticide applications of copper on perennial crops in *California, 1993 to 1998*. **Journal of Environmental Quality**. Stanford, v. 30, p. 1844 – 1847, 2001.

FERNANDES, J. C.; HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiology and structural effects of excess copper in plants. **Botanic Revision**, Bronx, v. 57, p. 246-273, 1991.

FERREIRA, D.F. [online]. Sistemas de análise estatística para dados balanceados. Homepage: <http://UFLA/DEX/SISVAR>. 2006. 145p.

GRAZZIOTTI, P.H. **Comportamento de fungos ectomicorrízicos, Acacia mangium e espécies de Pinus e Eucaliptus em solo contaminado por metais pesados.** 1999. 177f . Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

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

KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S.; HAYES, W.J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**. Ottawa, v.41, p.197-207, 2000.

LUNA, C. M.; CASANO, I. M.; TRIPPI, V. S. Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Triticum aestivum* treated with high levels of copper. **Physiology Plant**, Rockville, v. 101, p. 103-108, 1997.

MARQUES, T.C.L.L.S.M.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Crescimento e teores de metais em mudas de espécies arbóreas tropicais em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 121-132, 2000.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995, 889 p.

McBRIDE, M.B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1994.406p.

McLAREN, R.G.; CRAWFORD, D.V. The fraction of copper in soils. **Journal of Soil Science**. Boston, v.24, n.2, p.173-181, 1973a.

McLAREN, R.G.; CRAWFORD, D.V. The specific adsorption of copper by soils. **Journal of Soil Science**. Boston, v.24, n.4, p.443-452, 1973b.

MEURER, E.J. **Fundamentos de Química do Solo**. 2. ed. Porto Alegre: Gênese. 2004. 290p.

MEURER, E.J. **Fundamentos de Química do Solo**. 3. ed. Porto Alegre: Evangraf, 2006. 285p.

MOREIRA, M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras – MG: Editora UFLA, 2006. 729 p.

O'LEARY, J.W. The agricultural use of native plants on problem soil. In: YEO, A.R.; FOWERS, T.J. eds. **Monographs on Theoretical and applied genetics**, v. 21, p. 127-143, 1994.

PAIVA, H.N. et al. Efeito de Cd, Ni e Zn sobre mudas de Cedro (*Cedrella fissilis Vell.*) e de Ipê Roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v.24,nº 4, p.369-378, 2000.

PAIVA, H.N. et al. Influência de doses crescentes de chumbo sobre o teor e o conteúdo de nutrientes e Pb em mudas de Ipê Roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, p. 151-158, 2003.

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G. & SIQUEIRA, J.O. Efeito da aplicação de Cádmiio sobre o teor de nutrientes em mudas de Cedro (*Cedrella fissilis Vell.*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, p. 153-162, 2001.

PEDLER, J.J.; PARKER, D.R. Copper. In: LAL, R. **Encyclopedia of Soil Science**. Ohio, p.236-239, 2002.

PRALON, A. Z.; MARTINS, M. A. Utilização do resíduo industrial Ferkal na produção de mudas de *Mimosa caelsalpinifolia*, em estéril de extração de argila, inoculadas com fungos micorrízicas arbusculares e rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 55-63. 2001.

RASKIN, I. et al. Bioconcentration of heavy metais by plants. **Corrent Opnion Biotechnology**, Texas, v. 5, p. 285-290, 1994.

RIO GRANDE DO SUL. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria do Meio Ambiente. **Inventário Florestal Contínuo do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SEMA/UFSM, 2002. 704p.

SANTOS, H.P. et al. **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**. Bento Gonçalves, RS: 2004. 10p. (Comunicado Técnico nº49).

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência e Tecnologia, 1999. 370 p.

SOARES, C.R.F.S. **Toxidez de zinco, cobre, cádmio e chumbo para o eucalipto em solução nutritiva**. 1999.132f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

SOLIOZ, M.; STOYANOV, J.V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p. 183-195, 2003.

TENNANT, D. A test of a modified liwe intersect method of estimating root lengh. **Journal Ecology**, Wisconsin, v. 63, p. 995-1001, 1975.

TWISS, M.R. et al. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. **Chemical Speciation and Bioavailability**, Saint Albans, v. 13, n. 1., p.9-24, 2001.

## **CAPÍTULO VI: TOLERÂNCIA DE CANAFÍSTULA INOCULADA COM O FUNGO *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116 A SOLO CONTAMINADO DE COBRE**

### **RESUMO**

A associação de fungos ectomicorrízicos com essências florestais nativas pode ser uma alternativa para revegetação de solos contaminados por metais. O objetivo do trabalho foi determinar o comportamento de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*) inoculadas com fungo ectomicorrízico cultivadas em solo contaminado de cobre. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação pertencente ao Centro de Pesquisa de Recursos Florestais (FEPAGRO – FLORESTA) de Santa Maria, RS. O solo utilizado foi um Argissolo Vermelho-amarelo distrófico. O fungo ectomicorrízico utilizado como inoculante foi o isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), produzido em substrato contendo turfa-vermiculita (3:1). As mudas de canafístula foram desenvolvidas em areia lavada e transplantadas para unidades experimentais quando apresentaram duas folhas definitivas. Como unidade experimental foram utilizados vasos com capacidade de 1 L contendo 1 kg de solo. A inoculação foi realizada no momento do transplante das mudas, sendo adicionado 2 g de inoculante por unidade experimental, imediatamente abaixo do sistema radicular da muda. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema bifatorial (2 x 4), com e sem inoculante do fungo e controle, adição de 150 mg kg<sup>-1</sup>, 300 mg kg<sup>-1</sup> e 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, com sete repetições. Determinou-se altura de planta, diâmetro do colo, massa seca da parte aérea, teor de cobre na planta, porcentagem de colonização micorrízica, área superficial específica radicular e comprimento radicular. O incremento das doses de cobre no solo reduziu o comprimento radicular, área superficial específica radicular, altura e diâmetro das plantas de canafístula. Observou-se resposta significativa das plantas inoculadas com o fungo UFSC-Pt116 no teor de cobre na planta. Mudas de canafístula inoculadas com fungo ectomicorrízico apresentam menor teor de cobre em seu tecido e reduzem a absorção de cobre em dose mais elevada.

**Palavras-chave:** ectomicorriza, *Peltophorum dubium*, metal pesado

## 1 INTRODUÇÃO

A intensa demanda por produtos manufaturados tem contribuído para contaminação do ambiente por metais potencialmente tóxicos. Esses metais podem contaminar os ecossistemas de forma irreversível (LEYVAL et al., 1997), causando redução da atividade microbiana do solo (DIAS JUNIOR et al., 1998) e alterando a composição das espécies de fungos (NORDGREN et al., 1985; RÜHLING & SÖDERSTROM, 1990). Desse modo, quando uma área atinge nível de contaminação elevado poderá ocorrer a morte da vegetação. Nesse sentido, a seleção de organismos tolerantes a esse tipo de ambiente, torna-se necessária, na busca de alternativas para a revegetação dessas áreas.

Embora o cobre seja um elemento essencial às plantas (PEDLER & PARKER, 2002; SOLIOZ & STOYANOV, 2003), áreas contaminadas por esse elemento têm se tornado comuns na região sul do Brasil. A contaminação de áreas por cobre, ocorre devido à mineração desse elemento e em regiões vinícolas, decorrentes da aplicação de fungicidas à base de cobre (GIOVANNINI, 1997). A dificuldade no estabelecimento e desenvolvimento da vegetação nessas áreas implica no estudo de alternativas que envolvam plantas e organismos do solo, que apresentem tolerância ao contaminante.

As essências florestais nativas podem ser uma alternativa para revegetação de áreas contaminadas por cobre. Essas plantas, além de suas características fisiológicas desejáveis, apresentam também, grandes vantagens comerciais quanto à madeira e subprodutos, em relação às comercialmente mais utilizadas como o eucalipto e pinus (SCHROEDER, 1991). A canafístula é uma Fabaceae de ampla e expressiva dispersão, muito freqüente nas matas da bacia do Rio Paraná, indicada para recuperar áreas degradadas (BACKES & IRGANG, 2002). No Rio Grande do Sul, embora as espécies florestais nativas tenham sido estudadas nos últimos anos, principalmente em solos com processo de degradação, poucos estudos têm sido realizados com ênfase na ecologia e associações com outros organismos, como os fungos ectomicorrízicos que podem favorecer o estabelecimento das plantas.

A associação simbiótica de espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul com fungos ectomicorrízicos poderá ser uma alternativa para o estabelecimento de mudas, e para o desenvolvimento de plantas arbóreas em áreas contaminadas por metais no Estado do RS. Os fungos ectomicorrízicos, ao associarem-se com as plantas, desenvolvem estruturas muito eficientes na absorção de água e nutrientes do solo, os quais são posteriormente

transferidos para as plantas (SMITH & READ, 1997; SILVA, 2002; SILVA et al., 2003). Estes fungos destacam-se por interagir com as espécies vegetais formando uma associação simbiótica mutualística, que através da maior absorção de nutrientes e proteção das raízes, contribuem para o desenvolvimento das plantas (PFLEGER et al., 1994; PEROTTO & BONFANTE, 1997). Estes fungos conferem às plantas maior tolerância aos metais pesados, indicando a possibilidade de uso dos mesmos em processos de biorremediação de solos poluídos através do acúmulo destes elementos nas plantas (LEYVAL et al., 1997; KHAN, 2001; SCHELOSKE et al., 2001).

Os fungos ectomicorrízicos são benéficos ao crescimento da planta hospedeira, principalmente em situações em que fatores climáticos e edáficos são limitantes (SMITH & READ, 1997). Sabe-se que certos fungos podem ainda, apresentar elevada tolerância a metais pesados (MEDVE & SAYRE, 1994). Este efeito tem sido atribuído à habilidade dessas associações em reter os metais no micélio fúngico, evitando a translocação destes para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (COLPAERT & VAN ASSCHE, 1993; AGGANGAN et al., 1998). Moreira & Siqueira (2002), atribuem essa habilidade a mecanismos que incluem processos externos às hifas, ligação a polímeros da parede celular e processos internos nas células dos fungos, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados.

Quando em excesso, os metais pesados podem influenciar negativamente os fungos ectomicorrízicos (DIXON & BUSCHENA, 1988). Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que a contaminação por metais pesados pode inibir a colonização ectomicorrízica (BELL et al., 1988; GRAZZIOTTI, 1999). Rühling & Söderstrom (1990) observaram redução no número de frutificações e espécies de Basidiomicetos à medida que aumentava o nível de contaminação por As, Cd, Cu, Pb e Zn. Os fungos ectomicorrízicos respondem de maneira diferenciada a contaminação do solo, de acordo com sua espécie e o tipo de metal envolvido (HARTLEY et al., 1997).

O estabelecimento de essências florestais nativas micorrizadas pode ser uma alternativa na revegetação e aproveitamento de áreas degradadas, contaminadas por cobre. Nesse sentido, esta etapa do trabalho teve como objetivo determinar o comportamento de mudas de canafístula inoculada com fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus*, UFSC-Pt116, em solo contaminado de cobre.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Solo

O experimento teve duração de 180 dias e foi desenvolvido na casa de vegetação do Centro de Pesquisas de Recursos Florestais (FEPAGRO – FLORESTA) localizado no distrito de Boca do Monte, Santa Maria, RS.

O solo utilizado no experimento foi coletado na área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, RS e classificado como Argiloso Vermelho-amarelo distrófico. O solo foi seco, destorroado, passado em peneira de 2 mm e em seguida esterilizado em autoclave. O processo de esterilização consistiu em colocar o solo em sacos de pano e submeter à temperatura de 121°C por 1 hora, sendo essa operação repetida por três vezes consecutivas. Não foi utilizada adubação de P e K, pois o solo apresentava teores satisfatórios desses nutrientes. Trinta dias antes do transplante das mudas, aplicou-se calcário dolomítico para elevar o pH do solo para 5,5 e 30 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de uréia como adubação (Tabela 6).

**Tabela 6** - Características gerais do solo utilizado no experimento em casa de vegetação. Santa Maria, RS, UFSM, 2006.

pH- água	Ca + Mg	Al	H + Al	P	K	Cu	MO	Argila
1:1	-----	cmol <sub>c</sub> /L	-----	-----	mg dm <sup>3</sup>	-----	-----	%
4,8	5,5	13	6,2	12,6	28	0,6	1,2	19

### 2.2 Espécie florestal

A planta utilizada no experimento foi a canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). As mudas foram produzidas em areia lavada, esterilizada em autoclave. Posteriormente, foram transplantadas para vasos de cultivo quando apresentavam dois pares



de folhas definitivas. Os vasos de cultivo apresentavam capacidade de 1L, no qual foram colocados 1kg de amostra de solo. Cada vaso foi considerado uma unidade experimental. A umidade do solo foi mantida a 80% da sua capacidade de campo, completando-se a diferença do peso dos vasos, com água destilada até 1,2 kg.

### **2.3 Inoculante ectomicorrízico**

O inoculante utilizado no experimento foi produzido a partir do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116. O fungo foi cultivado em 50mL de meio líquido MNM - Merlin Norkrans modificado (MARX, 1969) em erlenmeyer de 250mL. Quando o fungo apresentou crescimento cobrindo toda superfície do erlenmeyer foi transferido para substrato, previamente esterilizado, contendo trufa + vermiculita na proporção 3:1, acrescido de 200mL de meio MNM líquido. Após 40 dias o fungo apresentou crescimento por todo o substrato, foi então homogeneizado e aplicado 2 g dessa mistura em cada tratamento com fungo. Aplicaram-se também, 2 g do substrato turfa + vermiculita sem fungo nos tratamentos sem o inoculante. Essas aplicações foram realizadas no momento do transplante das mudas para os vasos de cultivo, ficando localizado abaixo do sistema radicular da planta.

### **2.4 Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num bifatorial (2x4) qualitativo em A (com e sem fungo ectomicorrízico) e quantitativo em D (controle, adição de 150 mg kg<sup>-1</sup>, 300 mg kg<sup>-1</sup> e 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre), com sete repetições, totalizando 56 unidades experimentais. O cobre foi aplicado na forma de solução de sulfato de cobre.

### **2.5 Determinação na planta**

Avaliaram-se os seguintes parâmetros: altura de planta, diâmetro de colo, massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento radicular, área superficial específica radicular,

conforme Tennant (1975) teor de cobre na planta (SILVA, 1999), e porcentagem de colonização radicular (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980).

A altura de planta foi medida utilizando-se uma régua graduada de 50 cm de comprimento. Para evitar a interferência da irregularidade da superfície do solo contido nos potes, colocou-se uma pequena lâmina de isopor no ponto zero da régua formando um ângulo de 90°.

Para a medida do diâmetro de colo, foi utilizado um paquímetro digital, marca Mitutoyo.

A determinação da massa seca da parte aérea da planta constou em cortar as plantas rente ao solo, separando a parte aérea do sistema radicular. As raízes foram separadas do solo e lavadas com água destilada. A parte aérea das plantas e as raízes foram acondicionadas individualmente em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa a 65°C, onde permaneceram até atingirem o peso constante. Em seguida, pesou-se em balança digital com três casas decimais, obtendo-se a massa seca da parte aérea. As amostras da massa seca radicular foram utilizadas para as determinações do teor de cobre na planta.

Na análise do comprimento radicular, separou-se uma amostra de 0,2 g de raízes cortadas em 1cm e distribuiu-se em uma placa quadriculada de 1cm x 1cm e, em seguida, contou-se o número de intersecções das raízes com as linhas da placa. O comprimento radicular foi estimado seguindo-se o método de Tennant (1975), conforme descrito no Capítulo 5.

A área superficial específica do sistema radicular foi estimada segundo Tennant (1975), conforme descrito no capítulo 5.

Na determinação do teor de cobre na planta utilizou-se a massa seca da parte aérea e massa seca radicular. Essas foram moídas em moinho tipo facas, passada em peneira de 2 mm e então submetida à análise química para determinar as concentrações de cobre (Cu). Na análise de Cu empregou-se a digestão por via úmida com solução nitro-perclórica ( $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ ) na proporção 3:1, segundo metodologia descrita pela (SILVA, 1999). As concentrações de Cu foram determinadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica.

Para determinação da porcentagem de colonização radicular as amostras foram coletadas por ocasião da colheita do experimento. As raízes das plantas foram separadas do solo, através de peneiras e lavadas com água destilada e em seguida, retirou-se uma amostra de 0,1 g de raízes, as quais foram cortadas em 1cm e armazenadas em solução com álcool comercial a 50 %. No laboratório, essas raízes foram submetidas ao processo de clareamento e coloração. O procedimento de clareamento e coloração das raízes constou em deixar uma

amostra de 0,1 g de raízes imersas em solução de KOH 10%, a 80 °C durante 1h 30 minutos. Após, lavou-se com água e posteriormente foram colocadas em HCl 0,1N durante 2 minutos. Lavou-se novamente com água e colocou-se em Trypan Blue (corante) a 80° C por 30 minutos. Posteriormente, as raízes foram lavadas novamente com água e armazenadas em lactoglicerol, conforme Brundrett et al. (1996).

A avaliação da percentagem de colonização micorrízica (CM) foi estimada pelo método da placa quadriculada (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980), através da fórmula abaixo.

$$CM : \frac{N^{\circ} \text{ total de raízes colonizadas}}{N^{\circ} \text{ total de raízes}} \times 100$$

## 2.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando da significância da análise as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro. Equações de regressão foram ajustadas para os teores de cobre na planta, tomando-se como base os níveis de significância maiores que 95 % ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que quanto maior a dose de cobre maior é o teor de cobre no tecido das mudas de canafístula (Tabela 7). Entretanto, na presença do fungo ectomicorrízico o teor de cobre no tecido foi menor. Nas mudas sem fungo micorrízico, a dose de 150 mg kg<sup>-1</sup> mostrou diferença significativa em relação ao controle, enquanto que nas mudas de canafístula com fungo ectomicorrízico a diferença foi com 300 mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 7). Isso indica que a presença do fungo esta reduzindo a absorção de cobre pelas mudas de canafístula. Os fungos micorrízicos podem reter os metais em seu micélio, retardando a translocação destes para a parte aérea da planta, contribuindo para a tolerância (AGGANGAN et al., 1998). Os fungos ectomicorrízicos podem imobilizar metais por meio de ligações a polímeros da parede celular e também, por processos internos nas células, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Ainda, parece haver estreita relação entre a produção de pigmentos extracelulares por fungos e a bioadsorção de metais (GADD, 1993; FOGART & TOBIN, 1996). A melanina, por exemplo, contém grupos carboxílicos, fenólicos, hidróxidos e aminas que fornecem sítios potenciais de bioadsorção para o cobre (GADD & De ROME, 1988). Desse modo, o isolado UFSC-Pt116 pode estar retendo metais no seu micélio e produzindo pigmentos extracelulares capazes de adsorver o cobre evitando que seja absorvido pelo sistema radicular da canafístula.

**Tabela 7** - Teor de cobre (Cu) e porcentagem de colonização micorrízica (CM) de mudas de *Peltophorum dubium* cultivada nas diferentes doses de cobre inoculadas e não inoculadas com fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116. Santa Maria, 2006.

Doses de cobre mg kg <sup>-1</sup>	Cu (mg planta <sup>-1</sup> )		CM (%)	
	sem fungo	com fungo	sem fungo	com fungo
0	11,5 dA	11,4 bA	0,0 aB	2,6 bA
150	103,8 cA	54,4 bA	0,0 aB	4,4 abA
300	264,4 bA	227,8 aA	0,0 aB	6,6 aA
450	489,6 aA	304,0 aB	0,0 aB	4,2 abA
CV %	10,9		24,4	

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada variável (cobre e CM), não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade de erro ( $p \leq 0,05$ ).

Observa-se diferença significativa entre os tratamentos com e sem fungo na colonização micorrízica e um efeito significativo das doses de cobre sob a colonização (Tabela 7). A colonização aumentou com as doses de cobre ao solo. A dose de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre foi a que apresentou maior colonização, sendo reduzida na dose mais alta. Os metais podem expressar efeito deletério sob os fungos ectomicorrízicos, reduzindo a colonização micorrízica (GRAZZIOTTI, 1999). Nesse caso, embora o fungo UFSC Pt 116 tenha reduzido a absorção de cobre pela planta de canafístula, a associação pode ter sido influenciada pela toxidez deste metal. Além disso, tem se observado que o teor de fósforo no solo é tido como fator limitante para o estabelecimento da colonização micorrízica. Soares (1986) obteve alta taxa de colonização em *Eucalyptus grandis* quando o substrato apresentava  $4,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de fósforo extraível (Mehlich 1). Andreazza et al. (2004), observaram redução de 59% na colonização por fungos ectomicorrízicos também em *Eucalyptus grandis*, quando adicionou  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  de fósforo em solo arenoso com teor inicial de  $8 \text{ mg kg}^{-1}$  de fósforo disponível, encontrando uma média de 27% de colonização radicular com a adição do fósforo. Desse modo, o nível de disponibilidade de fósforo no solo do experimento ( $12,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pode não estar favorecendo uma alta taxa de colonização micorrízica. No entanto, não há referência na literatura sobre a relação fungo ectomicorrízico e níveis de cobre em canafístula.

A diferença significativa em relação à presença do fungo na dose de  $450 \text{ mg kg}^{-1}$  e na colonização micorrízica quando se aplica cobre no solo (Tabela 7), confirma o efeito do fungo ectomicorrízico na redução da absorção de metais pelas plantas, em doses mais elevadas. Os fungos ectomicorrízicos mostram habilidade em absorver metais pesados do solo podendo ser usado como atenuadores da fitotoxicidade causada pelos metais (LEYVAL et al., 1997) e podem imobilizar os metais pesados diminuindo a sua disponibilidade para o solo (GRAZZIOTTI et al., 2001; DORIA et al., 2002). O manto fúngico e a rede de Harting são estruturas fúngicas que imobilizam os metais do solo funcionando como um filtro, configurando um importante mecanismo de proteção às plantas (COSTA et al., 2000). Jones & Hutchinson (1986) observaram crescimento superior, na ordem de 54%, em mudas de *Betula papyryfera* colonizadas por *Scleroderma flavidum* Pers. na presença de  $85 \text{ molL}^{-1}$  de Ni e atribuíram esse comportamento a retenção dos metais no micélio. Os resultados do presente trabalho indicam a capacidade do fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116 em promover a retenção de cobre em seu micélio fúngico evitando que seja absorvido pelas raízes das mudas de canafístula.

Observa-se decréscimo no comprimento radicular e área superficial específica com adição das doses de cobre (Tabela 8). Trabalhos de pesquisa tem demonstrado que o excesso

de cobre exerce efeitos deletérios sobre a estrutura e funções das raízes (JÉNSEN & ADALSTEINSSON, 1989; ADALSTEINSSON et al., 1997), reduzindo o crescimento ou causando necrose nas raízes absorvente (SOARES et al., 2000). O fungo ectomicorrízico foi benéfico para o comprimento radicular e área superficial específica radicular das mudas de canafístula apenas na dose 0 mgL<sup>-1</sup> de Cu, não exercendo efeito nas demais doses. Embora os fungos ectomicorrízicos também possam alterar o sistema radicular, proporcionando redução da dominância apical (SMITH & READ, 1997), estima-se que a superfície da área explorada por ectomicorrizas é 1000 vezes superior àquela de raízes sem a presença do fungo ectomicorrízico (HARLEY, 1969). Assim, mesmo reduzindo os parâmetros radiculares, espera-se maior capacidade de absorção de nutrientes e água pelas plantas micorrizadas cultivadas em solo com excesso de cobre.

**Tabela 8** - Comprimento radicular e área superficial específica radicular (ASE) de mudas de *Peltophorum dubium* cultivadas nas diferentes doses de cobre, inoculadas e não inoculadas com fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116. Santa Maria, 2006.

Doses de cobre mg kg <sup>-1</sup>	Comprimento radicular (cm)		ASE (cm <sup>2</sup> )	
	sem fungo	com fungo	sem fungo	com fungo
0	3019,84* aB	4734,58 aA	232,17 aB	367,47 aA
150	2439,28 abA	1553,32 bA	201,27 abA	148,71 bA
300	1252,00 bA	1411,12 bA	112,29 abA	131,25 bA
450	1663,74 abA	1476,94 bA	112,07 bA	125,33 bA
CV %	23,44		22,72	

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada variável, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade de erro ( $p \leq 0,05$ ).

Na análise da variância para diâmetro de caule, altura de planta e massa seca da parte aérea, observou-se que não houve interação significativa entre o fungo testado e as doses de cobre (Tabela 9). Ao analisar o efeito do fungo ectomicorrízico UFSC-PT116 sobre esses parâmetros, nota-se que a presença deste não alterou a produção desses parâmetros. Contudo, espera-se que as plantas possam apresentar crescimento significativo em relação ao controle sem fungo, pois os fungos ectomicorrízicos também contribuem para aumentar a absorção de nutrientes e água pelas raízes (SMITH & READ, 1997; GRAZZIOTTI et al., 2001). Nesse

caso, pode ser que as espécies florestais, como a canafístula, necessitem de maior tempo de crescimento para expressar o efeito benéfico das ectomicorrizas.

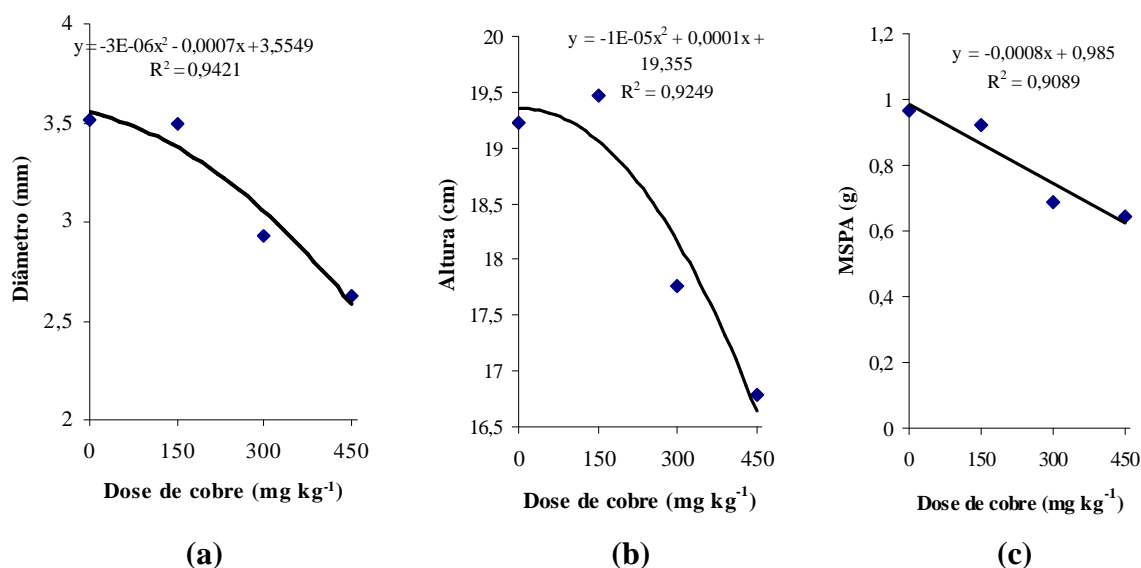
**Tabela 9** – Diâmetro do colo, altura de planta e massa seca da parte aérea (MSPA) de mudas de *Peltophorum dubium* inoculadas e não inoculadas com fungo *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt116. Santa Maria, 2006.

Fungo	Diâmetro (mm)	Altura (cm)	MSPA (g)
Controle	3,0465 a	18,51 a	0,7675 a
UFSC-Pt116	3,2510 a	18,11 a	0,8175 a
CV %	7,09	3,96	9,38

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Analisando-se apenas o efeito do cobre sobre os parâmetros sem interação, observa-se que o diâmetro e altura das mudas de canafístula apresentam a tendência de resistir ao efeito do cobre até a dose  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 22). Sabe-se que o uso de plantas pode alterar as formas dos metais pesados, reduzindo sua mobilidade e disponibilidade no solo (TORDOFF et al., 2000). As plantas podem ainda, contribuir indiretamente na remoção de metais através do efeito rizosférico, por meio da microbiota ou acumulando o metal em suas raízes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Desse modo, as mudas de canafístula podem estar apresentando um certo grau de tolerância até a dose de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre. Torna-se então, recomendável que se avalie o comportamento dessas plantas em doses intermediárias a  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre, para que se tenha resultado mais preciso.

Observa-se também que as doses testadas reduzem a massa seca da parte aérea das mudas de canafístula (Figura 22c). Grandes concentrações de cobre causam necrose das folhas, desfolhamento precoce e diminuição do crescimento (FILHO, 2005). Estes sintomas estão diretamente relacionados com a redução das raízes, que diminui a capacidade de absorção de água e nutrientes (PANOU-FILOTHEU et al., 2001). As mudas de canafístula apresentaram redução no comprimento e área superficial específica radicular com as doses de cobre (Tabela 8).



**Figura 22** - Diâmetro (a), altura (b) e massa seca da parte aérea (MSPA) (c) de mudas de *Peltophorum dubium* nas diferentes doses de cobre. Santa Maria, 2006.

O cobre é um elemento essencial para planta e participa do metabolismo de carboidratos, do nitrogênio, da síntese de lignina e de clorofila (MARSCHNER, 1995; FILHO, 2005). Contudo, quando em altas concentrações na solução do solo o cobre, pode proporcionar alterações nos tecidos vegetais, em nível bioquímico e fisiológico, os quais podem resultar em perdas consideráveis do potencial produtivo das plantas (FERNANDES & HENRIQUES, 1991). Quando plantas são expostas ao excesso de cobre, estas apresentam alteração na atividade da enzima nitrato redutase, reduzindo o N total na planta e o tamanho da planta devido à redução na produção de clorofila (LUNA et al., 1997). Esse efeito pode explicar em parte a tendência de redução na massa seca da parte aérea das plantas de canafístula com a aplicação das doses de cobre.



## 4 CONCLUSÕES

O isolado de fungo ectomicorrízico UFSC-Pt116 reduz significativamente a absorção de cobre pelas mudas de canafístula na dose de 450 mg kg<sup>-1</sup>.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

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. 51-6, 2004.

ADALSTEINSSON, S. et al. Monitoring copper-induced in fine root geometry of birch (*Betula pendula*) using nutrient film technique, **Physiology Plant**, Rockville, v. 99, p. 379-384, 1997.

AGGANGAN, N.S. et al. Effects on chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. **Blanke Geoderma**, Amsterdam, v. 84, p. 15-27, 1998.

BACKES, P.; IRGANG, B, **Árvores do Sul**. Guia de Identificação e Interesse Ecológico. 2 ed. Porto Alegre: Pallotti - Instituto Souza Cruz, 2004, 326p.

BELL, R. et al. Decreased incidence of mycorrhizal root tips associated with soil heavy metal enrichment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 106, p. 143-145, 1988.

BRUNDRETT, M. et al **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400 p.

COLPAERT, J.V.; VAN ASSCHE, J.A. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L.. **New Phytologist**, Oxford, v. 123, p. 325-333, 1993.

COSTA, M. D. et al. **Ectomicorrizas: a face oculta das florestas**: Aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção florestal. **Biotechnology. Ciência Desenvolvimento**, v. 10, 2000. 17 p.

DIAS JÚNIOR, H.E. et al Metais pesados densidade e atividade microbiana do solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, p. 631-640, 1998.

DIXON, R.K.; BUSCHENA, C.A. Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. **Plant and Soil**, Hague, v. 105, p. 265-271, 1988.

DORIA, K. et al. **Influência do fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius* no desenvolvimento de mudas de Eucalipto aplicados no substrato**. In: REUNIÃO

CIENTIFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS DE LAGEADO, 9. 2002. Lageado, Anais...Lageado: Pallotti, 2002. p.

FERNANDES, J. C.; HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiology and structural effects of excess copper in plants. **Botanic Revision**, Bronx, v. 57, p. 246-273, 1991.

FERREIRA, D.F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: <UFLA/ DEX/SISVAR>., 2006. 145 p.

FILHO, H. G. Cobre na planta. In: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS. Departamento de Recursos Naturais. Área de Ciência do Solo, 2005. Disponível em:< <http://www.fca.unesp.br/intranet/arquivo>>. Acesso em: 8 de março 2007.

FORGATY, R.V.; TOBIN, J.M. Fungal melanins and their interactions with metal. *Enzyme Microbiol. Technology*, New York, v. 19, p. 311-317, 1996.

GADD, G.M.; DE ROME, L. Biosorption of copper by fungal melanin. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 29, p. 610-617, 1988.

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

GIOVANETTI, M. G.; MOSSE, B. Na evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, London, v. 84, p. 489-500, 1980.

GIOVANNINI, E. Toxidez por cobre em vinhedos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 3, p. 115-117, 1997.

GRAZZIOTTI, P.H. **Comportamento de fungos ectomicorrízicos, Acacia mangium e espécies de Pinus e Eucaliptus em solo contaminado por metais pesados**. 1999. 177f . Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeito do Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 831-838, 2001.

HARLEY, J.L. **The biology of mycorrhiza**. London: Leonard Hill, 1969. 230 p.

HARTLEY, J. et al. Toxic interactions of metal ions ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  and  $\text{Sb}^{-3}$ ) in vitro biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, London, v. 137, p. 551-562, 1997.

JENSÉN, P.; ADALSTEINSSON, S. Copper effects on active and passive  $\text{Rb}^+$  influx in roots of winter wheat. **Physiology Plant**, Rockville, v. 75, p. 195-200, 1989.

JONES, M. D.; HUTCHINSON, T. C. The effect mycorrhizal infection on the response of *Betula papyrifera* to nickel and copper. **New Phytologist**, London, v. 3, p. 429-442, 1986.

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

LEYVAL, C. et al. Effect of heavy metal pollution on micorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, Florida, v. 7, p. 139-153, 1997.

LUNA, C. M.; CASANO, I. M.; TRIPPI, V. S. Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Tricum aestivum* treated with high levels of copper. **Physiology Plant**, Rockville, v. 101, p. 103-108, 1997.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2. ed. San Diego: Academic press Inc., USA, 1995. 902 p.

MARX, D. H. The influence of ectotropic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to roots pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathologist**, Saint Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.

MEDVE, R.J.; SAYRE, W.G. Heavy metals in red pines, basidiomycetes sporocarps and soils on bituminous stripmine spoils. **Journal Pennsylvania Academic Science**, New York, v. 68, p. 131-135, 1994.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 623p.

NORDGREN, R.J. et al. Soil microfungi in an area by heavy metals. **Canadian Journal Botanic**, Ottawa, v.63, p. 448-455, 1985.

PANOU-FILOTHEU, H. BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effectes of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 207-214, 2001.

PEDLER, J.J.; PARKER, D.R. Copper. In: LAL, R. **Encyclopedia of Soil Science**. Ohio, p.236-239, 2002.

PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.5, p.496-501, 1997.

PFLEGER, F. L.; STEWART, E. L.; NOYD, R. K. Role of VAM fungi in mine land revegetation. In: PFLEGER, F. L.; LINDERMAN, R. G. (Eds.). **Mycorrhizae and plant health**. Sant Paul: APS Press, 1994. p. 47-82.

RÜHLING, A.; SÖDERSTROM, B. Changes in fruibody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. **Water Air Pollution**, Saint Paul, v. 49, p. 375-387, 1990.

SCHELOSKE, S.; MAETZ, M.; SCHÜBLER, A. Heavy metal uptake of *Geosiphon pyriforme*. **Nuclear instruments and Methods in Physics Research B**, Washington, v.181, p. 659-663, 2001.

SCHROEDER, M. Cobertura florestal do Rio Grande do Sul: Tendências e Perspectivas. In: I SEMINÁRIO SOBRE A SITUAÇÃO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1991. p.1-9.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência e Tecnologia, 1999. 370 p.

SILVA, R.F. **População de fungos micorrízicos e influência de ectomicorrizas na produção de mudas de Eucalyptus grandis e Pinus elliottii em solo arenoso**. 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

SILVA, R.F; ANTONIOLLI, Z.I; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de Eucalyptus grandis W. ex. MAIDEN em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 3, n.1, p. 33-42, 2003.

SMITH, S.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 1997. 605p.

SOARES, I. Níveis de fósforo no desenvolvimento de ectomicorrizas por *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e no crescimento de mudas de eucalipto. 1986. 51p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1986.

SOARES, C.R.F.S. et al. Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus malulata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 213-225, 2000.

SOLIOZ, M.; STOYANOV, J.V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p. 183-195, 2003.

TENNANT, D. A test of a modified liwe intersect method of estimating root lengh. **Journal Ecology**, London, v. 63, p. 995-1001, 1975.

TORDOFF, G. M.; BAKER, A. J. M.; WILLIS, A. J. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous wastes. **Chemosphere**, Ottawa, v. 41, p. 219-228, 2000.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

As espécies florestais estudadas não apresentam associação com fungos ectomicorrízicos em ambiente natural, mas apresentam associação com micorriza arbuscular, na fase adulta de desenvolvimento. Contudo, essas plantas apresentam a capacidade de formar ectomicorriza em condição de laboratório.

O angico-vermelho pode ser considerado uma planta exclusora de cobre. A canafístula uma planta indicadora de contaminação. O cedro uma planta acumuladora de cobre. Nenhuma das espécies estudadas pode ser considerada hiperacumuladora de cobre.

A adição de cobre ao solo não reduziu a colonização radicular de mudas de canafístula, por fungo ectomicorrízico, produzidas em casa de vegetação. No entanto, as porcentagens de colonização radicular observada nesse trabalho, foram baixas quando comparadas a outros trabalhos. Recomenda-se o desenvolvimento de trabalhos que visem testar formas de inoculação radicular, para proporcionar maior porcentagem de colonização micorrízica nas plantas de canafístula.

O desenvolvimento das mudas de canafístula em solo com excesso de cobre não depende da inoculação pelo fungo ectomicorrízico UFSC Pt116. Contudo, a inoculação do fungo ectomicorrízico reduziu a absorção de cobre pela planta, na dose mais elevada de cobre. No entanto, recomenda-se o desenvolvimento de trabalhos testando diferentes tipos de fungos, não somente com plantas de canafístula, mas também com outras espécies florestais nativas.

Os fungos ectomicorrízicos apresentam resposta diferenciada em relação à adição de cobre ao meio de cultura. A tolerância ao cobre não está relacionada ao sítio de origem do fungo. Dessa forma, um fungo isolado de uma área não contaminada pode apresentar maior tolerância que um fungo isolado de área contaminada por esse elemento.

A população de fungos micorrízicos arbusculares nativos do Estado do Rio Grande do Sul poderá ser uma alternativa para revegetação das áreas contaminadas por cobre, com espécies florestais nativas. Os resultados indicam, que esses fungos, não são importantes apenas, para fase inicial de desenvolvimento das espécies florestais nativas do RS, mas durante todo seu desenvolvimento. Portanto, a elaboração de pesquisa envolvendo micorriza arbuscular e espécies florestais nativas podem ser um caminho promissor para vegetação de áreas contaminadas por cobre.

Está sendo desenvolvido um experimento com os tratamentos do capítulo VI, para que se possam obter informações do comportamento das mudas inoculadas no campo.