

Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* no crescimento de isolados de fungos ectomicorrízicos em diferentes concentrações de cobre, zinco e níquel

Ricardo Bemfica Steffen¹, Zaida Inês Antonioli¹, Gerusa Pauli Kist Steffen¹, Rodrigo Josemar Seminoti Jacques¹, Daniel Pazzini Eckardt¹, Marcos Leandro dos Santos¹, Natielo Almeida Santana¹

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Bairro Camobi, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*Autor correspondente:
bemfica_steffen@yahoo.com.br

Termos para indexação:
Metais pesados
Metabólitos secundários
Ectomicorrizas

Index terms:
Heavy metals
Secondary metabolites
Ectomycorrhizae.

Histórico do artigo:
Recebido em 29 mar 2011
Aprovado em 13 ago 2011
Publicado em 30 set 2011

doi: 10.4336/2011.pfb.31.67.227

Resumo - Os metabólitos secundários bioativos de algumas plantas são capazes de estimular o crescimento dos fungos ectomicorrízicos. Quando em associação com plantas, esses fungos proporcionam as mesmas condições de se desenvolverem em ambientes contaminados por metais pesados. Avaliou-se o efeito da adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* no crescimento de isolados ectomicorrízicos na presença de cobre, zinco e níquel. Os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) foram incubados em meio de cultura líquido na presença de concentrações crescentes de cobre, zinco e níquel e de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$. Após período de incubação de 25 dias, avaliou-se a massa seca do micélio e a concentração que inibiu o crescimento fúngico em 50%. Nas concentrações de cobre, zinco e níquel superiores a 3,94, 1,57 e 0,85 mmol L^{-1} , respectivamente, não foi verificado aumento no crescimento dos isolados ectomicorrízicos avaliados pela adição do óleo essencial. A presença do óleo essencial de *E. grandis* na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ em meio de cultura líquido aumentou a tolerância dos isolados ectomicorrízicos UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 aos metais pesados cobre, zinco e níquel.

Essential oil of *Eucalyptus grandis* effect on the growth of ectomycorrhizal isolates in different copper, zinc and nickel concentrations

Abstract - The bioactive secondary metabolites of some plants are capable of stimulating the growth of ectomycorrhizal fungi. Combined with plants, these fungi provide the same conditions to grow in environments contaminated by heavy metals. We evaluated the effect of adding essential oil of *Eucalyptus grandis* in the growth of ectomycorrhizal isolates in the presence of copper, zinc and nickel. The ectomycorrhizal *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) and *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) were incubated in liquid culture medium in the presence of increasing concentrations of copper, zinc and nickel and essential oil of *Eucalyptus grandis* at a concentration of 20 $\mu\text{L L}^{-1}$. After an incubation period of 25 days, we estimated the dry mass of mycelium and concentration that inhibited fungal growth by 50%. At concentrations of copper, zinc and nickel above of 3.94, 1.57 and 0.85 mmol L^{-1} respectively, no increase was observed in the growth of ectomycorrhizal isolates evaluated by the addition of essential oil. The presence of essential oil of *E. grandis* at a concentration of 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ in liquid culture medium increased the tolerance of ectomycorrhizal isolates UFSC Pt 116 and Pt 24 UFSC to the heavy metals copper, zinc and nickel.

Introdução

A contaminação do solo por metais pesados oriundos de processos de mineração e manufatura de metais, como pela deposição de produtos contendo estes elementos, resulta em problemas ambientais, afetando os mais variados ecossistemas (Navarro-Aviñó et al., 2007; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007). A tentativa de recuperação destes solos pode ser realizada por processos físicos, químicos e/ou biológicos, dependendo do tipo de metal contaminante e da destinação futura da área (Khan, 2006). As técnicas de descontaminação do solo podem ser divididas em dois grupos: 1) utilizando-se técnicas *ex situ*, em que o solo contaminado é removido do local para posterior tratamento, ou 2) técnicas *in situ*, na qual estratégias de remediação são utilizadas no próprio local, sendo esta a mais recomendada devido a fatores econômicos e ambientais (Khan et al., 2000).

Estudos estão sendo direcionados para a utilização de microrganismos na biorremediação de solos contaminados por metais, como alternativa para recuperação de áreas degradadas. Dentre as alternativas, a utilização de fungos ectomicorrízicos (FEM) apresenta resultados satisfatórios quando da implantação de povoamentos florestais nas áreas degradadas (Bellion et al., 2006; Smith & Read, 2008).

Os FEM apresentam função fundamental nos ecossistemas florestais, contribuindo nos processos de ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica do solo, mobilização de nutrientes e interações com outros microrganismos presentes na rizosfera (Courty et al., 2010; Nehls et al., 2010). Em ambientes com excesso de metais pesados, as micorrizas conferem maior tolerância das plantas a estes elementos, devido ao aumento na absorção de nutrientes pelas raízes e a capacidade de imobilizar os metais pesados (Grazziotti et al., 2001a; Göhre & Paszkowski, 2006; Smith & Read, 2008). Segundo os mesmos autores, os FEM representam uma valiosa alternativa de auxílio ao estabelecimento de plantas em ambientes degradados, por fornecerem benefícios ao crescimento da planta hospedeira, principalmente em situações em que fatores edáficos são limitantes.

A capacidade de os fungos micorrízicos reduzirem a biodisponibilidade de metais pesados tem sido atribuída à habilidade dessas associações em reter os metais no micélio fúngico, devido a mecanismos de complexação, quelação, compartimentalização e volatilização (Khan et al., 2000; Cumming et al., 2001; Fomina et al., 2005;

Bellion et al., 2006; Göhre & Paszkowski, 2006), evitando a translocação destes para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (Aggangan et al., 1998; Moreira & Siqueira, 2006).

Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que a contaminação por metais pode inibir o desenvolvimento de alguns isolados fúngicos (Grazziotti et al., 2001b, 2003) e a colonização ectomicorrízica (Bell et al., 1988). Rühling & Söderstrom (1990) observaram redução no número de frutificações em espécies de Basidiomicetos com o aumento do nível de contaminação por arsênio, cádmio, cobre, chumbo e zinco. Contudo, são poucos os trabalhos que visam avaliar alternativas de crescimento dos isolados ectomicorrízicos em condições com excesso de metais pesados. Desse modo, estudos para a maximização do crescimento micelial na presença de metais tornam-se necessários para utilização destes isolados na remediação e produção economicamente viável de áreas contaminadas.

Dentre as alternativas de estímulo ao crescimento fúngico, encontra-se a utilização de metabólitos secundários de plantas bioativas, capazes de induzir a formação e o acúmulo de determinados ácidos orgânicos em FEM. Segundo Weathers et al. (2006) e Zhi-Lin et al. (2007), os compostos fenólicos e terpenóides constituintes dos óleos essenciais de plantas micossimbiontes atuam como sinal bioquímico para o crescimento micelial de FEM.

Embora os óleos essenciais sejam usualmente utilizados na proteção de plantas, em baixas concentrações estes podem estimular o crescimento microbiano (Martins et al., 2000; Mucciarelli et al., 2003). Schützen-Dübel & Polle (2002) descrevem que quanto maior o teor de metais pesados no solo, maior o estímulo à produção de compostos fenólicos na planta, os quais estimulam a manutenção da simbiose micorrízica. Desta forma, acredita-se que a aplicação destes compostos via óleo essencial extraído de plantas micossimbiontes possa auxiliar no crescimento de FEM em condições de excesso de metais.

No entanto, até o presente momento, inexistem trabalhos mostrando o efeito da utilização de óleos essenciais de plantas micossimbiontes no estímulo ao crescimento fúngico em condições de excesso de metais pesados. Assim, nesse trabalho, o objetivo foi determinar se o óleo essencial de *Eucalyptus grandis* contribui para o crescimento e tolerância de fungos ectomicorrízicos a cobre, zinco e níquel.

Material e métodos

Isolados ectomicorrízicos

Os fungos utilizados como inóculo foram das espécies *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) fornecidos pela coleção de fungos do Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes isolados foram utilizados pelo fato de o gênero *Pisolithus* apresentar grande diversidade genética e adaptação ecológica (Junghans et al., 1998; Oliveira & Giachini, 1999).

Os isolados foram mantidos em meio de cultura sólido Melin-Norkrans modificado MNM em pH 5,8 (Marx, 1969), em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, sendo multiplicados a partir de culturas da coleção, por meio de repicagens para o meio de cultura da mesma composição, sob condições assépticas.

Obtenção do óleo essencial de *E. grandis*

A extração do óleo essencial foi realizada por meio da técnica de hidrodestilação, utilizando-se folhas frescas de eucalipto (Vitti & Brito, 2003).

Para a extração do óleo, as folhas frescas de *E. grandis* foram pesadas em amostras de 100 g, as quais foram cortadas, com tesoura, em pedaços de aproximadamente 2 cm e, posteriormente, colocadas em balão volumétrico, completando-se o volume do balão de hidrodestilação com, aproximadamente, 600 mL de água destilada. Em seguida, realizou-se o procedimento para obtenção do óleo essencial em aparelho de Clevenger modificado (Serafini & Cassel, 2001) durante 3 horas, mantendo-se água destilada em ebulição dentro do balão com aquecedor externo.

Os componentes líquidos vegetais extraídos, após a passagem por um condensador, foram coletados e mantidos sob refrigeração a 4 °C até sua utilização.

Efeito do óleo essencial de *E. grandis* no crescimento *in vitro* de FEM

Para a montagem dos ensaios, utilizou-se o meio de cultura Melin-Norkrans modificado MNM líquido (Marx, 1969) acrescido com concentrações crescentes de cobre (0; 1; 1,15; 1,97; 3,94; 7,8% mmol l⁻¹), níquel (0; 0,5; 0,85; 1,7; 3,4 e 6,8 mmol l⁻¹) e zinco (0; 0,65; 0,98; 1,07; 2,14; e 4,28 mmol l⁻¹) na forma de soluções de CuSO₄.5H₂O, NiSO₄.6H₂O e ZnSO₄.7H₂O, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos de forma separada para cada metal. A precipitação dos

metais no meio de cultura líquido foi evitada utilizando-se adaptação proposta por Graziotti et al. (2001b), excluindo-se o (NH₄)₂HPO₄, sendo parte do nitrogênio fornecido por 203 mg L⁻¹ de NH₄Cl. A concentração de KH₂PO₄ foi ajustada para 750 mg L⁻¹ e o pH do meio ajustado para 4,7. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com dez repetições.

As unidades experimentais constaram de Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura, nas quais foram adicionados dois discos de 10 mm de diâmetro do micélio fúngico retirados das bordas de crescimento em meio de cultura sólido, incubados a 26 °C sob agitação constante de 50 RPM durante 25 dias. Após o período de incubação, os micélios foram retirados dos Erlenmeyers por filtração em papel Whatman n° 3 e lavados em água corrente sobre peneira de 0,037 mm, secos em estufa de circulação forçada durante 72 horas a 60 °C, para posterior determinação da matéria seca.

Com o intuito de determinar o efeito da adição do óleo essencial de eucalipto na tolerância dos isolados ectomicorrízicos aos metais pesados, a incubação dos isolados na presença dos metais foi novamente realizada, porém, adicionando-se o óleo essencial de eucalipto ao meio de cultura. Para isso, o óleo essencial foi solubilizado em etanol 96,5% na proporção de 1:1 (v v⁻¹), conforme metodologia proposta por Fabrowski et al. (2003), obtendo-se concentração de 20 µL L⁻¹.

Os dados referentes à massa de micélio seco obtidos nos tratamentos foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias de acordo com Scott e Knott (1974) pelo software Sisvar (Ferreira, 2000). A determinação da concentração do metal que inibiu o crescimento miceliano em 50% foi determinada pelo software PriProbit versão 1.63 (Sakuma, 1998) e as equações de resposta do crescimento fúngico em relação à concentração de metal pesado foram determinadas pelo software Systat 11 (Systat software, Inc.).

Resultados e discussão

O crescimento fúngico, avaliado pela massa do micélio seco de ambos os isolados ectomicorrízicos apresentou redução significativa de acordo com o aumento da concentração dos metais pesados cobre, zinco e níquel nos meios de cultura líquidos (Figura 1). De acordo com os resultados observados, a resposta dos FEM aos metais pesados foi influenciada pelo isolado, tipo de metal e sua concentração no meio de cultura.

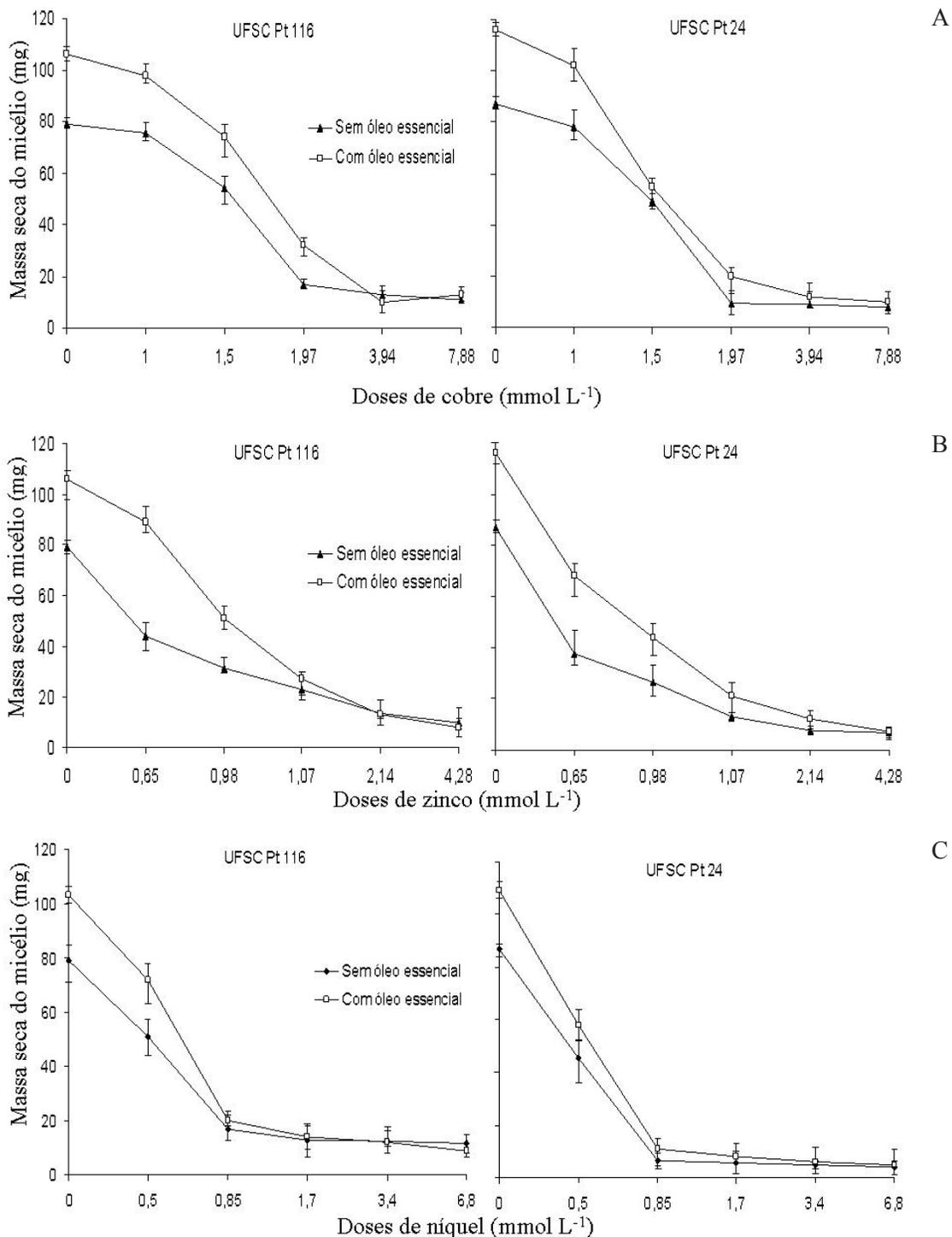


Figura 1. Massa seca do micélio dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), submetidos a diferentes doses (mmol L⁻¹) dos metais (A) cobre, (B) zinco e (C) níquel em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20 μ L L⁻¹.

Embora o comportamento dos FEM *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) tenha sido semelhante, observa-se particularidades em relação ao tipo e à concentração do metal no meio de cultura. Egerton-Warburton & Griffin (1995) e Graziotti et al. (2001b) demonstraram estas variações em isolados do mesmo gênero.

Segundo Graziotti et al. (2001b), Gadd et al. (2001) e Bellion et al. (2006), diferentes isolados ectomicorrízicos podem apresentar níveis distintos de tolerância a metais pesados. Blaudez et al. (2000) descrevem que a heterogeneidade observada para FEM em relação à tolerância a metais pesados é intrínseca do isolado, não sendo influenciada por mecanismos de adaptação. Donnelly & Entry (1998) descrevem que, apesar da aparente tolerância a metais pesados observada em determinados isolados de FEM, de modo geral, muitos isolados são incapazes de suportar a presença do metal em longo prazo, tanto no solo como em meios de cultura.

Quando da adição do óleo essencial na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ao meio de cultura contendo diferentes concentrações de metais pesados, os isolados ectomicorrízicos apresentaram crescimento superior ao observado sem a presença do óleo essencial (Figura 1).

Na presença dos metais pesados, os isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 com a adição de óleo essencial apresentaram retardo significativo da inibição do crescimento fúngico provocado pela presença do metal, quando em comparação ao isolado sem adição de óleo essencial (Figura 1).

O efeito de tolerância dos isolados ectomicorrízicos em meio de cultura contendo metais pesados pode ter ocorrido devido à produção e excreção de ácidos orgânicos e proteínas com propriedades de formar quelatos com os metais. A maior tolerância dos isolados ectomicorrízicos observada quando da adição do óleo essencial ao meio de cultura (Figura 1) pode ter ocorrido devido a mecanismos de excreção de moléculas orgânicas, principalmente de ácidos di e tri-carboxílicos, os quais formam quelatos com os íons metálicos (Bellion et al., 2006; Nehls et al., 2010) e/ou aumento na formação de melaninas fúngicas, que atuam nos mecanismos de tolerância dos FEM a metais pesados (Graziotti et al., 2001a; 2001b).

Ahonen-Jonnarth et al. (2008) observaram que em isolados ectomicorrízicos expostos a diferentes concentrações de metais pesados, há estímulo à produção

de ácidos orgânicos como oxálico, cítrico, láctico, acético, propiônico, fumárico, fórmico, butírico e iso-butírico, os quais atuam nos mecanismos de quelação dos metais pesados.

Com base nas equações de regressão, a concentração de metal pesado que inibiu o crescimento fúngico em 50% (CL_{50}) para o isolado UFSC Pt 116 foi de 1,898; 0,713 e 0,599 mmol L^{-1} para o cobre, zinco e níquel, respectivamente. Já para o isolado UFSC Pt 24, a concentração de metal correspondente ao CL_{50} foi de 1,516, 0,550 e 0,487 mmol L^{-1} para o cobre, zinco e níquel, respectivamente (Tabela 1).

Com a adição do óleo essencial aos meios de cultura contendo a mesma concentração de metais que inicialmente provocou redução do crescimento fúngico em 50%, o isolado UFSC Pt 116 apresentou ganho de 40,05%, 66,01% e 31,65% na massa micelial quando na presença de cobre, zinco e níquel, respectivamente (Tabela 1). Para o isolado UFSC Pt 24, o ganho em massa micelial foi de 28,92%, 55,38% e 21,80% quando foi adicionado óleo essencial de eucalipto ao meio de cultura líquido na presença de cobre, zinco e níquel, respectivamente (Tabela 1).

A concentração de níquel que inibiu em 50% (CL_{50}) o crescimento dos isolados UFSC Pt 116 e UFSC Pt 24 foi semelhante à observada por Ray et al. (2005) para isolados de *Pisolithus tinctorius*. No entanto, quando da adição do óleo essencial ao meio de cultura líquido, a concentração do CL_{50} obtida neste trabalho foi superior à encontrada pelos autores. Graziotti et al. (2001b), estudando o efeito de metais pesados sobre o crescimento do fungo *P. tinctorius* (isolado Pt 306), observaram que as concentrações de 1,18 mmol L^{-1} de cobre e de 2,71 mmol L^{-1} de zinco inibiram o crescimento fúngico em 50% (CL_{50}). No entanto, os mesmos autores observaram estímulo ao crescimento de *P. tinctorius* quando incubado com 0,47 mmol L^{-1} de cobre. Este efeito de estímulo ao crescimento miceliano não foi observado no presente trabalho. Segundo Graziotti et al. (2001a), a tolerância de FEM a metais pesados é dependente não somente do tipo de metal, mas do isolado ectomicorrízico utilizado.

Todavia, o micélio de Basidiomicetos pode apresentar diferenças em seu crescimento quando houver ausência de substratos sólidos, o que, em alguns casos, pode alterar a resposta de isolados de FEM a metais (Hartley et al., 1997).

Tabela 1. Resposta dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24), submetidos a doses de cobre, zinco e níquel em meio de cultura líquido, com e sem a adição de óleo essencial de *Eucalyptus grandis* na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$.

| Metal | Óleo essencial ($\mu\text{L L}^{-1}$) | Equação ¹ | CI ₅₀ ² (mmol L ⁻¹) | MS micélio na CI ₅₀ ³ (mg) | Ganho na massa micelial ⁴ (%) |
|---|---|---|---|--|--|
| <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC Pt 116) | | | | | |
| Cobre | 0 | $y = 0,0546x^3 + 1,9148x^2 - 27,84x + 85,087$ | 1,898 | 39,52 | |
| | 20 | $y = 0,3846x^3 - 0,8588x^2 - 29,646x + 112,08$ | | 55,35 | 40,05 |
| Zinco | 0 | $y = -3,081x^3 + 26,751x^2 - 74,306x + 79,659$ | 0,713 | 39,16 | |
| | 20 | $y = -0,1485x^3 + 12,012x^2 - 72,631x + 110,74$ | | 65,01 | 66,01 |
| Níquel | 0 | $y = -2,1606x^3 + 24,746x^2 - 78,212x + 78,454$ | 0,599 | 40,02 | |
| | 20 | $y = -2,811x^3 + 32,406x^2 - 104,39x + 104,2$ | | 52,69 | 31,65 |
| <i>Pisolithus</i> sp. (UFSC Pt 24) | | | | | |
| Cobre | 0 | $y = -0,1959x^3 + 5,3711x^2 - 40,998x + 93,946$ | 1,516 | 43,45 | |
| | 20 | $y = -0,3647x^3 + 8,2346x^2 - 56,7x + 124,32$ | | 56,02 | 28,92 |
| Zinco | 0 | $y = -5,0691x^3 + 41,243x^2 - 102,49x + 87,252$ | 0,550 | 42,52 | |
| | 20 | $y = -4,3728x^3 + 39,619x^2 - 115,44x + 118,3$ | | 66,07 | 55,38 |
| Níquel | 0 | $y = -5,1124x^3 + 40,442x^2 - 63,12x + 64,76$ | 0,487 | 43,02 | |
| | 20 | $y = -4,1124x^3 + 44,132x^2 - 71,15x + 72,06$ | | 52,40 | 21,80 |

¹Equação de resposta do fungo à concentração de metal no meio líquido; ²Concentração de metal no meio de cultura que inibiu em 50% o crescimento miceliano; ³Massa seca do micélio na concentração que inibiu em 50% o crescimento miceliano; ⁴Porcentagem de ganho de massa micelial em relação ao tratamento sem a adição do óleo essencial.

Neste sentido, deve-se ter cuidado quanto aos resultados de sobrevivência dos isolados de FEM na presença de metais pesados em meios de cultura, visto que os meios podem, dependendo da sua constituição, precipitar os metais, reduzindo sua disponibilidade (Angle et al., 1992). Segundo Graziotti et al. (2003), este é um dos motivos para a realização, em um segundo momento, de testes de toxicidade no próprio solo, a fim de determinar a real concentração de metal capaz de inibir o crescimento fúngico.

Devido à grande variação de resultados na literatura, que apresentam as concentrações de metais pesados capazes de limitar o crescimento de fungos mantidos tanto em meio de cultura como no solo, resultados recentes (Bellion et al., 2006) colocam em dúvida a especificação de concentrações de metais pesados, os quais causariam toxidez a fungos, sendo necessária a realização de calibrações para cada espécie ou isolado fúngico de interesse. Por este motivo, afirmações quanto à inoculação de uma espécie de FEM em uma determinada essência florestal, que garantiria o desenvolvimento da planta em solos contendo elevados teores de cobre, devem ser cautelosas.

Conclusões

A adição de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de *E. grandis* diminuiu a velocidade de inibição do crescimento micelial de fungos ectomicorrízicos provocado por metais pesados até as doses de 3,94 mmol L⁻¹ de cobre, 1,57 mmol L⁻¹ de zinco e 0,85 mmol L⁻¹ de níquel no meio de cultura líquido.

A presença do óleo essencial de *E. grandis* em meio de cultura líquido aumenta a tolerância dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC Pt 116) e *Pisolithus* sp. (UFSC Pt 24) a cobre, zinco e níquel.

Referências

- AGGANGAN, N. S.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Geoderma*, Tucson, v. 84, n. 1-3, p. 15-27, June 1998.
- AHONEN-JONNARTH, U.; VAN HESS, P. A. W.; LUNDSTR, U. S.; FINLAY, R. D. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentration. *New Phytologist*, Lancaster, v. 146, n. 3, p. 557-567, July 2008.

- ANGLE, J. S.; McGRATH, S. P.; CHAUDRI, A. M. Effects of media components on toxicity of Cd to rhizobia. **Water, Air, & Soil Pollution**, Guelph, v. 64, n. 3-4, p. 627-633, Sept. 1992.
- BELL, R.; EVANS, C. S.; ROBERTS, E. R. Decreased incidence of micorrhizal root tips associated with soil heavy-metal enrichment. **Plant and Soil**, Dordrecht, n. 106, n. 1, p. 143-145, Feb. 1988.
- BELLION, M.; COURBOT, M.; JACOB, C.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 254, n. 2, p. 173-181, Jan. 2006.
- BLAUDEZ, D.; JACOB, C.; TURNAU, K.; COLPAERT, J. V. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metal *in vitro*. **Mycological Research**, Ottawa, v. 104, n. 11, p. 1366-1371, Nov. 2000.
- COURTY, P. E.; BUÉE, M.; DIEDHIOU, A. G.; FREY-KLETT, P.; TACON, F. L.; RINEAU, F.; TURPAULT, M. P.; UROZ, S. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 42, n. 5, p. 679-698, May 2010.
- CUMMING, J. R.; SWIGER, T. D.; KURNIK, B. S.; PANACCIONE, D. G. Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum *in vitro*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 31, n. 4, p. 703-710, Apr. 2001.
- DONNELLY, P. K.; ENTRY, J. A. Bioremediation of soils with mycorrhizal fungi. In: ADRIANDO, D. C.; BOLLAG, J. M.; FRANKENBERGER, JR. W. T.; SIMS, R. C. **Bioremediation of contaminated soils**. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, 1998. 677 p.
- EGERTON-WARBURTON, L. M.; GRIFFIN, B. J. Differential responses of *Pisolithus tinctorius* to aluminum *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 73, n. 8, p. 1229-1233, Aug. 1995.
- FABROWSKI, F. J.; MUÑIZ, G. I. B. de; NAKASHIMA, T.; NISGOSKI, S.; KLOCH, U. Investigação da presença de óleo essencial em *Eucalyptus smithii* R. T. Baker por meio da anatomia de seu lenho e casca. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 13, n. 1, p. 95-106, 2003.
- FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras, MG: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.
- FOMINA, M.; HILLIER, S.; CHARNOCK, J. M.; MELVILLE, K.; ALEXANDER, I. J.; GADD, G. M. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Jena, v. 71, n. 1, p. 371-381, Jan. 2005.
- GADD, G. M.; RAMSAY, L.; CRAWFORD, J. W.; RITZ, K. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 204, n. 2, p. 311-316, Nov. 2001.
- G HRE, V.; PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. **Planta**, Bonn, v. 223, n. 6, p. 1115-1122, May 2006.
- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.; CARVALHO, D. Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 4, p. 839-848, jul./ago. 2001a.
- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.; CARVALHO, D. Efeito de Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 4, p. 831-837, jul./ago. 2001b.
- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relao ao excesso de metais pesados. In: CURI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M. de.; LOPES, A. S.; ALVAREZ, V. H. (Eds.). **T picos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. 430 p. v. 1.
- HARTLEY, J.; CAIRNEY, J. W. G.; MEHARG, A. A. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, n. 2, p. 303-319, Feb. 1997.
- JUNGHANS, D. T.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, W. V.; BARROS, E. G.; ARAÚJO, E. F. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, Oregon, v. 7, n. 5, p. 243-248, Feb. 1998.
- KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer, 2007. 450 p.
- 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**, Atlanta, v. 41, n. 1-2, p. 197-207, July 2000.
- KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation: an enhanced form of phytoremediation. **Journal of Zhejiang University Science**, Zhejiang, v. 7, n. 7, p. 503-514, July 2006.
- MARTINS, M. A.; GONÇALVES, G. F. de; SOARES, A. C. F. Efeito de fungos micorr zicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecu ria Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 7, p. 1465-1471, July 2000.
- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioqu mica do solo**. 2. ed. Lavras, MG: UFLA. 2006. 729 p.
- MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S.; BERTEA, C. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, Lancaster, v. 158, n. 3, p. 579-591, June 2003.
- NAVARRO-AVI N , J. P.; ALONSO, I. A.; LÓPEZ-MOYA, J. R. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. **Ecosistemas, Alicante**, v. 16, n. 2, p. 1-17, May 2007.

- NEHLS, U.; GÖHRINGER, F.; WITTULSKY, S.; DIETZ, S. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. **Plant Biology**, Freiburg, v. 12, n. 2, p. 292-301, Mar. 2010.
- OLIVEIRA, V. L.; GIACHINI, A. J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras, MG: UFLA, 1999, p. 775-796.
- RAY, P.; TIWARI, R.; REDDY, U. G.; ADHOLEYA, A. Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 21, n. 3, p. 309-315, Apr. 2005.
- RÜHLING, A.; SÖDERSTRÖM, B. Changes in fruitbody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. **Water, Air & Soil Pollution**, Guelph, v. 49, n. 3-4, p. 375-387, Feb. 1990.
- SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 33, n. 3, p. 339-347, 1998.
- SCHÜTZEN-DÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, n. 372, p. 1351-1365, May 2002.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agroindústria, 2001. p. 333-377.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008, 787 p.
- VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de Eucalipto**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 2003. 26 f. (Documentos, 17).
- WEATHERS, P. J.; ELKHOLY, S.; WOBBE, K. K. Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 42, p. 309-317, 2006.
- ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, June 2007.