

# SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

## EFEITO DE ZN, Cd E Cu NO COMPORTAMENTO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM MEIO DE CULTURA<sup>(1)</sup>

P. H. GRAZZIOTTI<sup>(2)</sup>, J. O. SIQUEIRA<sup>(3)</sup>,  
F. M. MOREIRA<sup>(3)</sup> & D. CARVALHO<sup>(4)</sup>

### RESUMO

Os fungos ectomicorrízicos são capazes de tolerar concentrações de metais pesados tóxicas às plantas hospedeiras, apesar de serem adversamente influenciados pelo excesso de alguns metais. Avaliou-se o crescimento de um isolado de *Pisolithus tinctorius* e outro de *Suillus bovinus* em meio de cultura líquido com doses crescentes de sais de Zn, Cu ou Cd adicionados individualmente em frascos de 125 mL que continham 50 mL de meio Mellin-Norkrans modificado (MNM), em pH 4,8. Os fungos cresceram por 20 dias em câmara de crescimento a 28°C. O crescimento dos fungos foi inibido com a elevação das concentrações dos metais, porém de forma diferenciada. As concentrações suficientes para inibir 50% do crescimento foram de  $2,71 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Zn,  $1,18 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu e  $12,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de Cd, para o *P. tinctorius*, e de  $2,15 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Zn,  $0,12 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu e  $7,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de Cd, para o *S. bovinus*. O efeito inibitório dos metais sobre o crescimento dos fungos seguiu a seguinte ordem decrescente: Cd > Cu > Zn. O isolado de *S. bovinus* apresentou tolerância ao Zn similar à observada para o *P. tinctorius*, mas foi menos tolerante que este em relação aos outros dois metais. O crescimento de *P. tinctorius* foi favorecido por pequena dose de Cu. A produção de pigmentos extracelulares nestes isolados foi estimulada por todos os metais estudados. O *P. tinctorius*, o mais tolerante, produziu mais pigmentos extracelulares por grama de micélio, o que sugere a relação positiva entre a capacidade de produção de pigmentos e a tolerância aos metais.

**Termos de indexação:** metal pesado, tolerância, toxidez, pigmentos.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA. Trabalho financiado pelo convênio CMM/FAEPE e FAPEMIG e apresentado na FertBIO'98 em Caxambu. Recebido para publicação em agosto de 2000 e aprovado em maio de 2001.

<sup>(2)</sup> Técnico da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas (BA). E-mail: grazziot@cnpmf.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Professor Titular e Adjunto do Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA. CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista do CNPq.

<sup>(4)</sup> Professora Adjunto do Departamento de Ciência Florestal, UFLA.

**SUMMARY: ZN, CU AND CD EFFECTS ON THE BEHAVIOR OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI IN CULTURE MEDIUM**

*Ectomycorrhizal fungi are able to tolerate toxic heavy-metal concentrations in host plants, although being also negatively affected by excessive metal. Isolates of Pisolithus tinctorius and Scleroderma bovinus were grown for 20 days at 28°C in a liquid medium with increasing levels of Zn, Cu and Cd sulfates in 125 mL conical flasks containing 50 mL of MMN medium, adjusted to pH 4.8. Fungi growth was inhibited by heavy metal increasing concentration, which was different for fungi and metals. The 50% effective concentrations inhibiting growth were  $2.71 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  of Zn,  $1.18 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  of Cu and  $12.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  of Cd to the P. tinctorius; and of 2.15 of Zn,  $0.12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  of Cu and  $7.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  of Cd to the S. bovinus. The inhibiting heavy-metal effect on growth was in the following sequence: Cd > Cu > Zn. The fungus S. bovinus demonstrated Zn tolerance similar to P. tinctorius, being less tolerant to Cu and Cd. The growth of P. tinctorius was favored by addition of a low amount of Cu. Production of extracellular pigments by the two isolates was enhanced by the addition of all the heavy metals studied. The fungus P. tinctorius produced more pigments per gram of mycelia, suggesting that there was a positive relationship between pigment production capacity and heavy-metal tolerance.*

*Index terms: heavy metal, tolerance, toxicity, pigments.*

## INTRODUÇÃO

Os processos de mineração, fusão e manufaturação dos metais freqüentemente provocam a contaminação do ambiente por uma mistura de metais potencialmente tóxicos (Hunter et al., 1987; Ribeiro Filho et al., 1999). Essa contaminação pode reduzir consideravelmente a atividade microbiana do solo (Nordgren et al., 1986; Dias Júnior et al., 1998) e alterar a composição das espécies de fungos e plantas (Nordgren et al., 1985; Rühling & Söderström, 1990), acarretando destruição da vegetação em áreas em que a contaminação atinge níveis muito elevados. Isto amplia o impacto destes agentes poluidores, especialmente sobre a biota do solo que é reduzida em número, qualidade e atividade (Dias Júnior et al., 1998).

Tem sido demonstrado que certos fungos apresentam elevada tolerância a altas concentrações de metais pesados, concentrações estas suficientes para causar sintomas severos de toxidez em plantas (Medve & Sayre, 1994). Os fungos ectomicorrízicos são parte essencial do ecossistema (Söderström, 1991) e são benéficos ao crescimento das plantas hospedeiras, principalmente em situações em que fatores climáticos e edáficos são limitantes, destacando-se a maior absorção de nutrientes, como o fósforo, e da água do solo (Smith et al., 1997).

Recentemente, tem-se observado o interesse crescente sobre a habilidade dessas associações em reter os metais no micélio, reduzindo, assim, a translocação destes para a parte aérea da planta e aumentando sua tolerância, tal como verificado em

mudas de *Betula* na presença de Zn (Denny & Wilkins, 1987a,b), *Pinus* na presença de Cd (Colpaert & Van Assche, 1993) e *Eucalyptus* na presença de Cr e Ni (Aggangan et al., 1998). Segundo Doelman (1986), alguns fungos ectomicorrízicos podem, por exemplo, acumular mais de 30 vezes a concentração de Cd presente no solo de sua ocorrência.

No entanto, assim como todos os seres vivos, os fungos também são adversamente influenciados pelo excesso de metais pesados. O número de frutificações e o número de espécies de Basidiomicetos frutificando ao longo de uma floresta de coníferas com gradiente de contaminação por As, Cd, Cu, Pb e Zn foram severamente reduzidos com o aumento do nível de contaminação (Rühling & Söderström, 1990). Também foi demonstrado que a contaminação do solo por metais pesados pode inibir parcialmente, ou totalmente, a colonização ectomicorrízica (Bell et al., 1988, Grazziotti, 1999), sendo alguns isolados fúngicos mais sensíveis que outros (Aggangan et al., 1998).

As espécies ou isolados fúngicos podem apresentar diferentes graus de tolerância aos metais pesados, dependendo desse comportamento do metal. Hartley et al. (1997), estudando a tolerância de cinco fungos ectomicorrízicos a diferentes metais, observaram que *Suillus granulatus* foi o mais tolerante ao Cd e Zn, não diferindo do *S. variegatus* quanto à tolerância ao Zn. As concentrações para inibição de 50% do crescimento (CI<sub>50</sub>) foram de  $12,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de Cd, para *S. granulatus*, e em torno de  $340 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de Zn, para os dois fungos. No entanto, a CI<sub>50</sub> para o Cd do *S. variegatus* foi de

apenas  $0,008 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , demonstrando a importância da avaliação da tolerância dos fungos ectomicorrízicos a diferentes metais.

Como em áreas contaminadas, geralmente, observa-se a presença de mais de um metal em níveis potencialmente tóxicos, a tolerância dos fungos ectomicorrízicos a vários metais parece ser uma condição necessária para a sua utilização na revegetação dessas áreas. Portanto, torna-se importante avaliar o comportamento dos fungos na presença de vários metais. Neste trabalho, avaliou-se individualmente os efeitos do Zn, Cu e Cd no comportamento de um isolado de *S. bovinus*, considerado tolerante a Zn, e de um isolado de *P. tinctorius*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar os efeitos isolados do Zn, Cu e Cd sobre o crescimento dos fungos em meio líquido, empregou-se o meio Melin-Norkrans modificado (MNM) (Marx, 1969), suplementado com cinco concentrações dos metais. As concentrações dos metais foram determinadas em testes preliminares e obtidas a partir de soluções estoques de  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{CdSO}_4$ . Para evitar a precipitação de metais durante o preparo do meio MNM, o  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  foi excluído e o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aumentado de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  para  $750 \text{ mg L}^{-1}$ . Parte do N foi fornecida como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $203 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o pH do meio ajustado para 4,7. Foram utilizados dois isolados, sendo um de *Suillus bovinus* (Fr.) O. Kuntze, o SB da coleção do Departamento de Ecologia Microbiana da Universidade de Lund – Suécia, cedido pelo Dr. Heike Buecking, Universidade de Bremen – Alemanha, e outro de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker e Couch, o PT-306 pertencente à coleção do Dr. Donald H. Marx, USA, cedido pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

Considerando as diferenças entre os isolados quanto à tolerância aos metais pesados, as concentrações dos metais foram diferentes para Cu e Cd, como se segue: 0; 1,78; 3,56; 5,34 e  $7,12 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de Cd, para o SB; 0; 9; 18; 27 e  $36 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de Cd, para o PT-306; 0; 0,03; 0,06; 0,09 e  $0,12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Cu, para o SB; 0; 0,47; 0,94; 1,41 e  $1,88 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Cu, para o PT-306, e 0; 0,75; 1,5; 2,25 e  $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Zn, para os dois isolados. Cada combinação isolado x metal compôs um experimento independente, sendo todos em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições.

A parcela experimental foi composta de um Erlenmeyer (125 mL), com 25 mL de meio, inoculado com quatro discos de 5 mm de diâmetro que continham micélio, retirado das bordas das colônias crescidas em placas de Petri com 20 mL de meio MNM sólido, em pH 5,6, por 20 dias em incubadora a 28°C. Os isolados foram mantidos em meio sólido

MNM, pH 5,6. Após a inoculação, os frascos foram incubados por 20 dias a 28°C, quando o micélio foi separado do meio de cultura por filtração em papel de filtro (Watman Nº 42) e lavado com água corrente em peneira de 0,053 mm, seco em estufa com ventilação forçada a 70°C, durante 72 h, e o peso da matéria seca determinado. Verificaram-se, em ensaios preliminares, que alguns isolados de fungos ectomicorrízicos produziram maior pigmentação, quando crescidos em meio de cultura adicionado de alguns metais pesados. Por isso, o meio de cultura, passado pela filtração, foi coletado para determinar a produção total de pigmentos extracelulares, expressa pela absorção da luz do visível a 350 nm, e a produção de pigmentos por grama de micélio seco (produção específica de pigmentos).

Os dados de micélio seco, produção total e específica de pigmentos foram submetidos à análise de variância pelo SAEG 5.0-93 - UFV, de regressão pelo programa TableCurve 3.01 (Jandel Corporation), e o valor de F calculado e testado pelo programa FCalc32 versão 1.1. Para determinar a concentração de cada metal suficiente para inibir 50% do crescimento ( $\text{CI}_{50}$ ) dos isolados, utilizaram-se as equações de regressão para produção de micélio seco, conforme as concentrações de metal no meio de crescimento.

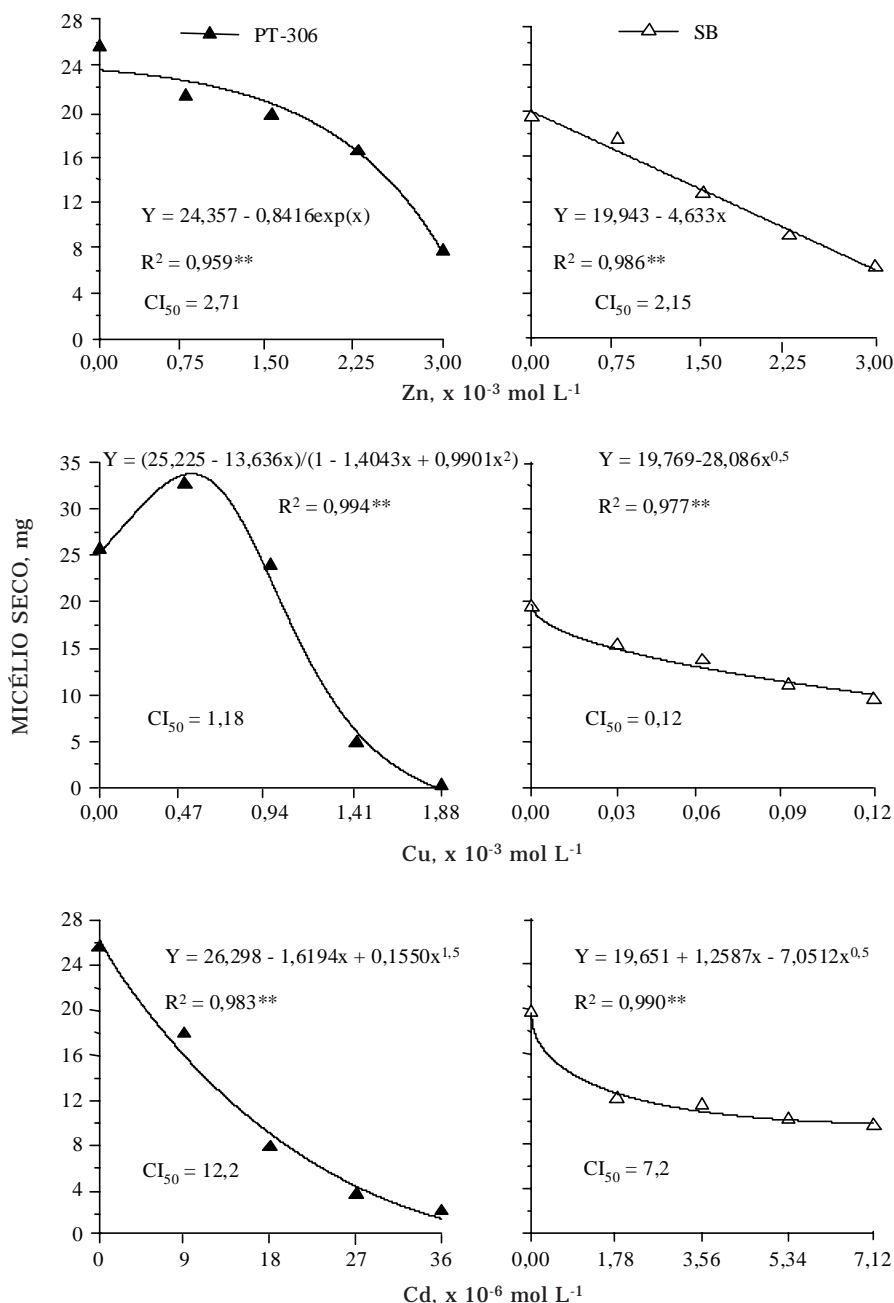
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento de ambos os isolados foi inibido com a elevação das concentrações de Zn, Cu e Cd no meio de cultura (Figura 1), porém de forma diferenciada. O crescimento do PT-306 foi estimulado com a adição de até  $0,51 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Cu, sugerindo maior requerimento de Cu por este isolado. Tam (1995) observou resposta positiva de um isolado de *P. tinctorius* em meio MNM adicionado de  $3,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Al,  $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Cu,  $0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Zn ou  $0,18 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Fe.

A redução do crescimento do SB foi linear com a adição de Zn, enquanto, para o PT-306, inicialmente a redução foi menor, acentuando-se a partir de  $2,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de Zn (Figura 1); determinando uma  $\text{CI}_{50}$  de valor mais elevada para este isolado em relação ao SB. A maior tolerância do PT-306 a Cu e Cd, em relação ao SB, é bem evidente. A  $\text{CI}_{50}$  para o Cu do SB ( $0,12 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) é cerca de quatro vezes menor que a concentração de Cu a partir da qual o crescimento do PT-306 é inibido ( $0,51 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e cerca de 10 vezes menor que a sua  $\text{CI}_{50}$  ( $1,18 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) (Figura 1). Para o Cd, a  $\text{CI}_{50}$  do SB ( $7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi cerca de duas vezes menor do que a do isolado PT-306 ( $12,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) (Figura 1). Esses resultados demonstram que os dois isolados diferiram pouco quanto à tolerância a Zn e que o SB foi mais sensível a elevadas concentrações de Cu e Cd do que o PT-306.

As  $CI_{50}$  para Zn de ambos os isolados e de Cu e Cd para o isolado PT-306 foram próximas ou superiores àquelas observadas por outros autores para diversos fungos ectomicorrízicos em meio líquido (Jones & Hutchinson, 1988; Darlington & Rauser, 1988; Jongbloed & Borst-Pauwels, 1990; Tam, 1995). Por exemplo, a  $CI_{50}$  desses metais para um isolado de *P. tinctorius*, considerado tolerante, estava entre  $1,5 \times 10^{-3}$  e  $3,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, para o Zn e o Cu, e entre  $8,9 \times 10^{-6}$  e  $89,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, para o Cd (Tam, 1995). Para o isolado SB, a  $CI_{50}$  de Cu de

$0,12 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e de Cd de  $7,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> foram menores do que aquelas obtidas para diversos fungos, indicando alta sensibilidade deste isolado a esses metais. A tolerância diferenciada de um fungo ectomicorrízico aos metais foi observada por outros autores, como Hartley et al. (1997) e Tam (1995). Hartley et al. (1997) observaram que *S. variegatus* apresentou-se tolerante ao Zn com a  $CI_{50}$  de  $0,34 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, embora este fungo tenha sido muito sensível ao Cd, apresentando uma  $CI_{50}$  de apenas  $0,008 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

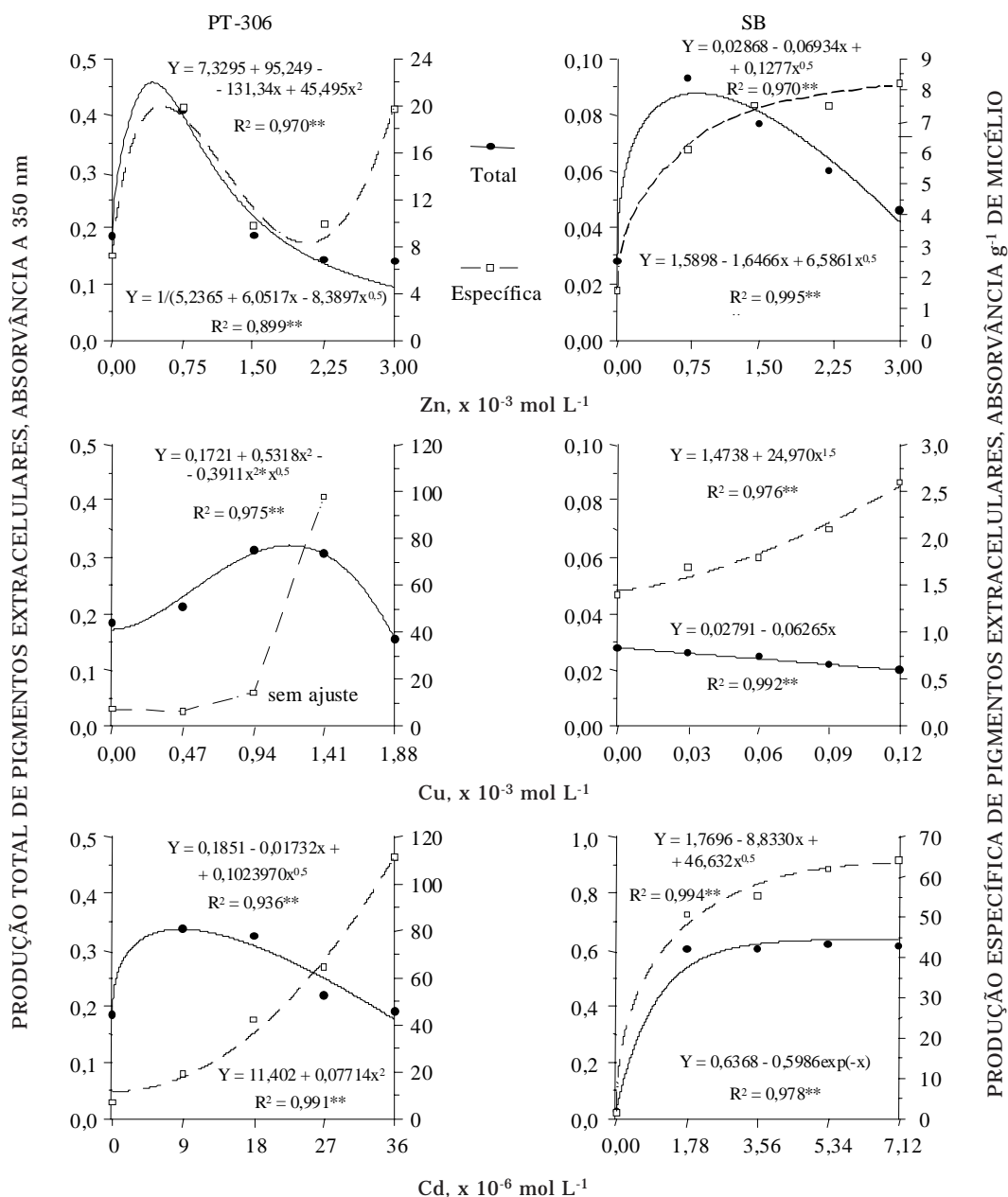


**Figura 1.** Crescimento dos isolados PT-306 e SB em meio MNM líquido com doses crescentes de Zn, Cu e Cd, na forma de sais.  $CI_{50}$  = concentração que inibiu 50% do crescimento.

Como em áreas contaminadas por metais pesados geralmente ocorre mais de um metal em níveis potencialmente tóxicos, isolados como o PT-306, aqui estudado, tolerante a diferentes metais, são mais promissores para inoculação de plantas para a revegetação dessas áreas. Entretanto, há necessidade de conhecer o comportamento desse isolado na presença simultânea dos metais e em simbiose.

A produção total de pigmentos extracelulares do PT-306 foi visualmente observada em todos os níveis de metais pesados, enquanto para o isolado SB a

produção de pigmentos só foi visível na presença de Cd. Ao contrário do gênero *Pisolithus*, o fungo *Suillus bovinus* apresentou micélio de coloração branca e normalmente não foi observada a produção de pigmentos. Para o isolado SB, a produção total de pigmentos, medida pela absorvância a 350 nm, aumentou com a elevação das doses de Zn e Cd. Na presença de Cd, a produção de pigmentos foi sete vezes maior do que a produção máxima observada na presença de Zn, sendo também maior do que aquela observada para o PT-306 (Figura 2).



**Figura 2. Produção total de pigmentos extracelulares, determinada e expressa pela absorção da luz do visível a 350 nm, e produção específica de pigmentos (absorvância 350 nm por grama de micélio seco) na solução do meio de cultura (MNM) com doses crescentes de Zn, Cu e Cd onde foram crescidos os isolados PT-306 e SB.02.**

A produção total de pigmentos do PT-306 aumentou nas doses iniciais de Zn e Cd e nas doses intermediárias de Cu, decrescendo nas maiores doses dos três metais, decorrente do efeito inibitório dos metais sobre o crescimento. Para o PT-306, os aumentos máximos na produção total de pigmentos extracelulares variaram de 2,4 vezes, para o Zn, a 1,9, para o Cd (Figura 2).

A produção de pigmentos extracelulares por grama de micélio (produção específica) foi, em geral, crescente com o aumento das doses dos metais, exceto para o PT-306 com Zn, que seguiu as mesmas tendências da produção total de pigmentos (Figura 2). Isto indica mecanismos fisiológicos distintos dos fungos em relação aos metais. Apesar da maior produção específica de pigmentos com o aumento das concentrações dos metais, observada para os dois isolados, esta foi de grandezas muito distintas de acordo com o metal e com o isolado.

Verificou-se que, para o PT-306, a produção específica máxima na presença de Zn (19,9) foi cinco vezes menor do que a observada para o Cu (98,0) e 5,6 vezes menor do que para a de Cd (111,4). Para o isolado SB, a produção específica máxima de menor grandeza foi aquela observada para o Cu (2,6), 3,1 vezes menor do que a de Zn (8,1) e 24,3 vezes menor do que aquela para Cd (63,3). Assim, para os dois isolados, a produção específica máxima foi maior na presença de Cd, metal com maior efeito inibitório no crescimento. Já em relação ao Cu e Zn, observou-se um comportamento diferenciado entre os isolados.

A pigmentação produzida não foi caracterizada quimicamente, mas apresentava coloração marrom-escura, típica de melaninas extracelulares, substâncias normalmente induzidas por metais pesados (Gadd, 1984; Fogarty & Tobin, 1996). Por exemplo, em *Aureobasidium pullulans* e *Clamidosporium resinae*, a produção de melaninas foi mais rápida e maior na presença de  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu (Gadd & De Rome, 1988). Para Fogarty & Tobin (1996), isto ocorre pelo fato de ser a polimerização do 1,8-diidroxinafitaleno para a síntese da melanina controlada por uma lactase que contém Cu. Na falta desse elemento, a síntese da melanina é bloqueada (Bell & Wheeler, 1986).

No entanto, no presente trabalho, a produção de pigmentos foi estimulada também por Zn e Cd e, no isolado SB, a produção específica foi até 35,8 vezes maior na presença de Cd do que no controle sem metal. É interessante notar que, além desse estímulo, a produção específica de pigmentos foi sempre maior para o isolado PT-306 do que para o SB, indicando uma relação positiva com a tolerância aos metais. Os fungos pigmentados apresentavam maior crescimento e sobrevivência sob condições ambientais estressantes, inclusive sob contaminação por metais pesados (Fogarty & Tobin, 1996).

Gadd & De Rome (1988) observaram que, em geral, a melanina, obtida de *Aureobasidium*

*pullulans* e *Clamidosporium resinae*, absorveu mais cobre do que a biomassa intacta dos fungos e que a adição de melanina extraída do isolado de *A. pullulans* pigmentado no meio de crescimento do isolado albino, na presença de Cu, resultou no aumento na taxa de crescimento e na produção de biomassa. Os autores atribuíram esse efeito à ligação ou seqüestro do metal pela melanina. A elucidação dos mecanismos de tolerância de fungos ectomicorrízicos aos metais pesados pode trazer grandes contribuições para a aplicação destes em programas de fitorremediação, empregando plantas hospedeiras, como *Eucalyptus* e *Pinus*, com potencial de uso em áreas contaminadas.

## CONCLUSÕES

1. Nas doses mais elevadas, todos os metais reduziram o crescimento dos isolados estudados, porém de modo diferenciado para o metal e para o isolado.

2. As concentrações que inibiram 50% do crescimento foram de:  $2,71 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Zn,  $1,18 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu e  $12,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de Cd, para o isolado PT-306; e de  $2,15 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Zn,  $0,12 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu e  $7,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de Cd, para o isolado SB. O efeito inibitório dos metais sobre o crescimento foi maior na seguinte ordem: Cd > Cu > Zn.

3. O isolado SB de *Suillus bovinus* apresentou tolerância a Zn similar ao isolado PT-306 de *Pisolithus tinctorius*, mas foi pouco tolerante a Cu e Cd.

4. A produção de pigmentos extracelulares nestes isolados foi estimulada por todos os metais estudados, chegando, no isolado SB, a produzir 38,7 vezes mais na presença de Cd do que no controle sem metal.

5. A maior tolerância e produção de pigmentos por grama de micélio do isolado PT-306 em relação ao SB indicou uma relação positiva entre a capacidade de produção de pigmentos e a tolerância ao metais.

## LITERATURA CITADA

- AGGANGAN, N.S.; DELL, B. & MALAJCZUK, N. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Geoderma*, 84:15-27, 1998.
- BELL, A.A. & WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann Rev. Phytopathol.*, 24:411-451, 1986.
- BELL, R.; EVANS, C.S. & ROBERTS, E.R. Decreased incidence of mycorrhizal root tips associated with soil heavy-metal enrichment. *Plant Soil*, 106:143-145, 1988.

- COLPAERT, J.V. & van ASSCHE, J.A. The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 145:237-243, 1992.
- COLPAERT, J.V. & van ASSCHE, J.A. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L.. *New Phytol.*, 123:325-333, 1993.
- 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. *Can. J. Bot.*, 66:225-229, 1988.
- DENNY, H.J. & WILKINS, D.A. Zinc tolerance in *Betula* spp.. III. Variation in response to zinc among ectomycorrhizal associates. *New Phytol.*, 106:535-544, 1987a.
- DENNY, H.J. & WILKINS, D.A. Zinc tolerance in *Betula* spp. IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. *New Phytol.*, 106:545-553, 1987b.
- DIAS JÚNIOR, H.E.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *R. Bras. Ci. Solo*, 22:631-340, 1998.
- DOELMAN, P. Resistance of soil microbial to heavy metals. In: JENSEN, U.; KJØLLER, A. & SØRENSEN, L.H., eds. *Microbial communities in soil*. New York, E.A.S., 1986. p.369-385.
- FOGARTY, R.V. & TOBIN, J.M. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzy. Microb. Technol.*, 19:311-317, 1996.
- GADD, G.M. Effects of copper on *Aureobasidium pullulans* in solid medium: adaptation not necessary for tolerant behaviour. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 82:546-549, 1984.
- GADD, G.M. & DE ROME, L. Biosorption of copper by fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29:610-617, 1988.
- GRAZZIOTTI, P.H. Comportamento de fungos ectomicorrízicos, *Acacia mangium* e espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* em solo contaminado por metais pesados. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1999. 177p. (Tese de Doutorado)
- HARTLEY, J.; CAIRNEY, J.W.G.; SANDERS, F.E. & MEHARG, A.A. Toxic interactions of metal ions (Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Sb<sup>3+</sup>) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 137:551-562, 1997.
- HUNTER, B.A.; JOHNSON, M.S. & THOMPSON, D.J. Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. I. Soil and vegetation contamination. *J. Appl. Ecol.*, 24:573-586, 1987.
- JONES, M.D. & HUTCHINSON, T.C. The effects of nickel and copper on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 66:119-124, 1988.
- JONGBLOED, R.H. & BORST-PAUWELS, G.W.F.H. Differential response of some ectomycorrhizal fungi to cadmium in vitro. *Acta Bot. Neerl.*, 39:241-246, 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*, 59:153-163, 1969.
- MEDVE, R.J. & SAYRE, W.G. Heavy metals in red pines, basidiomycete sporocarps and soils on bituminous stripmine spoils. *J. Pennsylvania Acad. Sci.*, 68:131-135, 1994.
- NORDGREN, A.; BÅÅTH, E. & SÖDERSTRÖM, B. Soil microfungi in an area by heavy metals. *Can. J. Bot.*, 63:448-455, 1985.
- NORDGREN, A.; KAURI, T.; BÅÅTH, E. & SÖDERSTRÖM, B. Soil microbial activity, mycelial lengths and physiological group of bacteria in a heavy metal polluted area. *Environm. Poll. (Series A)*, 41:89-100, 1986.
- RÜHLING, Å. & SÖDERSTRÖM, B. Changes in fruitbody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. *Water Air Soil Poll.*, 49:375-387, 1990.
- RIBEIRO FILHO, M.R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O. & MOTTA, P.E.F. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:453-464, 1999.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. & HARLEY, J.L. *Mycorrhizal symbiosis*. 2.ed. San Diego, Academic Press, 1997. 605p.
- SÖDERSTRÖM, B. The fungal partner in mycorrhizal symbiosis. In: MARCUS WALLENBERG PRIZE SYMPOSIUM IN STOCKHOLM, Sweden, 1991, Lectures. Sweden, The Marcus Wallenberg Foundation, 1991. p.5-26.
- TAM, P.C.F. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 5:181-187, 1995.

