

Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos

Glomalin: characteristics, production, limitations and contribution to soils

Carla da Silva Sousa^{1*}; Rômulo Simões Cezar Menezes²;
Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio²; Francisco de Sousa Lima¹

Resumo

A glomalina é uma glicoproteína hidrofóbica, termoestável e recalcitrante produzida pelos fungos micorrízicos arbusculares. A glomalina é extraída das hifas ou do solo através do uso de citrato de sódio (20-50 mM; pH 7,0 ou 8,0) a elevada temperatura (121°C), e quantificada pelos métodos Elisa ou Bradford. Acredita-se que características do solo, condições climáticas, sistema de uso do solo, práticas de manejo agrícola, presença e tipo de vegetação, dentre outros fatores, influenciam na quantidade de glomalina produzida pelos FMA. A propriedade de “cola” da glomalina auxilia a fixação das partículas do solo, favorecendo a formação de agregados estáveis. A glomalina seqüestra metais pesados, reduzindo a disponibilidade e o risco de toxicidade destes elementos para organismos e plantas crescidos em solos poluídos. Entre 28 e 45% da molécula de glomalina é constituída por carbono e de 0,9 a 7,3% é nitrogênio, chegando a representar de 4 a 5% do C e do N totais do solo. Apesar da importante contribuição da glomalina, são necessários estudos para reformulação do protocolo de extração, para identificação de sua função fisiológica para os FMA, de seus estoques em diferentes ecossistemas, dos organismos responsáveis pela sua decomposição e consumo e das espécies de FMA mais produtoras desta proteína no solo.

Palavras-chave: Proteína, micorrizas, agroecossistemas

Abstract

Glomalin is a hydrophobic, heat-stable, and recalcitrant glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. The glomalin is extracted from the hyphae or from the soil through the use of sodium citrate (20-50 mM; pH 7.0 or 8.0) at high temperature (121 °C) and is quantified by ELISA or Bradford methods. Soil characteristics, climatic conditions, land use systems, agricultural practices, presence and type of vegetation, among other factors, influence the amount of glomalin produced by AMF. The ‘glue’ property of glomalin helps to fixate soil particles, favoring the formation of stable aggregates. Glomalin sequesters heavy metals, reducing the availability and the risk of toxicity of these elements for organisms and plants grown in polluted soils. Depending on the extraction procedure and the origin of the soil, between 28 to 45% dry weight of the glomalin molecule is carbon and 0.9 to 7.3% is nitrogen, representing up to 4 to 5% of total C and N of the soil. Despite the important contribution of glomalin, studies are needed to reformulate the extraction protocol and to identify its physiological function for the AMF, their stocks in different ecosystems, the organisms responsible for its decomposition and consumption, and the AMF species producing more of this protein in the soil.

Key words: Protein, mycorrhizal, agroecosystems

¹ Engenheiros Agrônomos, D.Sc. Bolsista Pós-Doutorado PNP/D/CAPES, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz das Almas, BA. E-mail: cssagro@yahoo.com.br; ufrpe2006@yahoo.com.br

² Engenheiros Agrônomos, D.Sc. Profs. do Deptº de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE. E-mail: rmenezes@ufrpe.br; esampaio@ufrpe.br

* Autor para correspondência

Introdução

Em 1996, pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, que trabalhavam na produção de anticorpos monoclonais visando a identificação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), observaram que um destes anticorpos reagiu com uma substância presente na superfície das hifas de FMA (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996). Estes pesquisadores observaram também que diversos outros fungos do solo testados não reagiram com este anticorpo. Esta substância foi denominada “glomalina” em referência a ordem taxonômica Glomales que em os FMA pertenciam na época em que foi descoberta (MORTON; BENNY, 1990).

Após sua descoberta, a glomalina tem sido detectada em grandes quantidades em numerosos solos (NICHOLS, 2003, WRIGHT; UPADHYAYA, 1998), o que tem sido atribuído ao fato dos FMA colonizarem 80% das plantas vasculares e apresentarem uma distribuição global (VODNIK et al., 2008). As quantidades relativamente altas da glomalina no solo podem também ser resultado do comportamento recalcitrante desta biomolécula no solo (RILLING et al., 2001), conseqüentemente, com reduzida taxa de decomposição (STEINBERG; RILLING, 2003).

Frações de glomalina são definidas com base na sua facilidade de extração em citrato a alta temperatura ou em sua reatividade com o anticorpo monoclonal (LOVERLOCK et al., 2004b). Existem quatro frações da glomalina nos solos: a glomalina facilmente extraível (GFE) que representa a fração recentemente depositada que ainda não sofreu transformações bioquímicas no solo (WRIGHT et al., 1996); a glomalina total (GT) que apresenta-se fortemente ligada às argilas, sendo necessárias até sete extrações seqüenciais para sua completa remoção em alguns solos (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998) e as frações imunorreativas da GT e GFE que é a glomalina nativa verificada nas hifas dos FMA (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996). Acredita-se ainda que exista a fração residual que

é extraída apenas quando se adicionam bases fortes (LOVELOCK; WRIGHT; NICHOLS, 2004a).

É possível que outras diferentes frações de glomalina existam no solo devido a alterações ao longo do tempo, como perda da imunorreatividade pelo ataque microbiano, que interferem no local de reconhecimento do anticorpo (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996; WRIGHT; UPADHYAYA, 1998). Contudo, não se sabe como e quando as diferentes frações de glomalina diferem umas das outras em termos de bioquímica, função no solo e duração, ou como a produção de glomalina é controlada (RILLING et al., 2001b, 2003a).

A glomalina foi inicialmente identificada como uma glicoproteína, formada por 60% de carboidratos que se ligam à porção protéica por ligações glicosídicas do tipo N, apresentando aminoácidos alifáticos e aromáticos na cadeia peptídica. Foi demonstrado também, que a molécula contém ferro fortemente ligado (0,04-8,8%), que provavelmente é o cromóforo transmissor da cor vermelho amarronzada dos extratos (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998; RILLING et al., 2001; NICHOLS, 2003), bem como, cátions que são ligados a glomalina em quantidades que variam entre os diferentes solos (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998; NICHOLS, 2003).

Segundo Driver, Holben e Rilling (2005) a deposição da glomalina no solo é resultante, principalmente da decomposição de esporos e hifas (>80%) e em menor grau da liberação passiva ou secreção hifálica. Possivelmente, a glomalina por estar contida dentro das paredes de hifas e esporos, cumpre funções fisiológicas no decorrer da vida do fungo, como favorecer a aderência das hifas nas superfícies, reduzir a palatabilidade das hifas para predadores ou contribuir para a imobilização de poluentes na interface solo-hifa. Foi observado através de um microscópio eletrônico de transmissão que a glomalina encontra-se mais concentrada nas camadas mais internas da parede de esporos e hifas do que no citoplasma (PURIN; RILLING, 2008).

Em estudos de campo sobre a atividade dos FMA, a quantificação da glomalina apresenta-se como uma avaliação rápida, barata, objetiva e relativamente fácil de ser realizada, em comparação a outras variáveis como densidade de esporos, comprimento de hifas, colonização radicular e potencial de inóculo (PURIN; RILLIG, 2007). O objetivo desta revisão foi realizar uma abordagem sobre as características da glomalina, os processos de extração e quantificação desta proteína no solo e nas hifas dos FMA, os fatores que influenciam sua produção e decomposição, bem como, sua contribuição para o solo.

Extração e quantificação da glomalina

Após a descoberta da produção de glomalina por FMA pela pesquisadora Dra. Sara Wright do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, iniciaram-se os estudos para realizar a extração desta proteína tanto das hifas fungicas quanto do solo (WRIGHT et al., 1996; WRIGHT; UPADHYAYA, 1996, WRIGHT; UPADHYAYA, 1998). Numerosos solubilizadores de proteínas testados incluindo detergentes, ácidos, bases e solventes não foram eficientes em solubilizar glomalina do micélio fúngico (DRIVER; HOLBEN; RILLIG, 2005). De forma semelhante, extratores quelantes como EDTA ou EDDHA, não tiveram sucesso em liberar a glomalina adsorvida aos minerais de argila (GONZÁLEZ-CHAVÉZ et al., 2004).

O citrato de sódio (20 mM; pH 7,0) teve sucesso em extrair a glomalina de solo e hifas (WRIGHT et al., 1996; WRIGHT; UPADHYAYA, 1996), possivelmente, porque atua através de dois mecanismos para “soltar” as moléculas de glomalina adsorvidas aos minerais de argila do solo. Um mecanismo é através do sódio que rompe as ligações de óxido de ferro e alumínio que existem entre os minerais de argila e as moléculas de glomalina. No outro mecanismo, atua o citrato que tem grande afinidade por íons de Fe, e como a glomalina é rica neste elemento, ele consegue

“puxar” a molécula adsorvida às partículas de argila. Posteriormente, (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998), verificaram que quanto mais concentrada e maior o pH da solução de citrato de sódio (50 mM; pH 8,0) maior a quantidade de glomalina extraída do solo.

O atual protocolo para extração da glomalina foi proposto por Wright e Upadhyaya (1998), de modo que para obtenção da glomalina facilmente extraível é realizada uma primeira autoclavagem do solo em citrato de sódio (20mM; pH 7,0) por 30 minutos, enquanto que para a extração da glomalina total, são necessários múltiplos ciclos de autoclavagem por 60 minutos através da reposição de solução extratora de citrato de sódio (50mM; pH 8,0) no sedimento, até que o sobrenadante não apresente coloração típica de glomalina, ou seja, vermelho-amarronzado.

Recentemente, reavaliando o procedimento de extração das frações de glomalina no solo, Janos, Garamszegi e Beltran (2008) verificaram que o aumento do tempo de autoclavagem de 30 para 75 minutos extrai 1,37 vezes mais glomalina facilmente extraível. Contudo, se retardada a centrifugação do sobrenadante por 3 h, essa quantidade é reduzida em 19,4%, sugerindo que possivelmente a glomalina pode ser reversivelmente imobilizada em partículas do solo. Estes autores verificaram também que aumentando a proporção entre o volume da solução extratora em relação ao peso do solo de 8:1 para 16:1, 24:1 e 32:1, aumenta a quantidade de glomalina total extraída em 1,8 vezes, 2,3 vezes e 1,6 vezes, respectivamente.

Além do extrator utilizado, a eficiência da extração da glomalina depende do pH da solução extratora, bem como, da temperatura durante o processo de extração. A glomalina solubilizada permanece na solução a pH alcalino, precipita lentamente a pH < 5,5 e rapidamente em pH 2,5 (NICHOLS; WRIGHT, 2005). Pequenas quantidades de glomalina no solo foram solubilizadas usando água a 121°C (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996). A eficiência do citrato na extração de glomalina diminui a 110°C (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996), e somente uma pequena

quantidade de glomalina é extraída a temperatura ambiente (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996). Amostras de solo armazenadas em refrigerador 11 meses após coleta em campo apresentaram até 47,6% mais glomalina que as mantidas em temperatura ambiente (SOUSA et al., 2011b).

Para a extração da glomalina diretamente do micélio fúngico, Rillig e Steinberg (2002) cultivaram em uma placa de Petri subdividida, contendo meio de cultura sólido fitagel, raízes de cenoura colonizadas por *Glomus intraradices*. Nestas placas, raízes de cenoura e hifas do fungo foram separadas, permitindo a extração da glomalina produzida. Contudo, neste método, tem sido difícil a extração dos compostos orgânicos produzidos pelas hifas fungicas do meio de cultura sólido. Considerando a inviabilidade deste método, Gadkar, Driver e Rillig (2006) desenvolveram um recipiente cilíndrico, constituído de dois compartimentos sobrepostos um que permite o crescimento das raízes colonizadas (compartimento radicular) e outro das hifas do fungo (compartimento hifal) separadamente. Para facilitar a coleta de compostos orgânicos produzidos pelo fungo, o compartimento hifal contém substrato inerte e meio de cultura líquido.

Para a coleta de glomalina produzida por hifas fungicas em plantas colonizadas por FMA, Wright e Upadhyaya (1999) cultivaram plantas de milho colonizadas por FMA dentro de um saco de nylon que foi colocado no centro de vasos contendo substrato (areia e carvão esterilizados). Este saco de nylon foi constituído de malha de 40 µm de modo a permitir somente a passagem das hifas fúngicas para o substrato. Neste sistema, filmes plásticos foram colocados no substrato e no fundo dos vasos, como armadilhas das hifas fungicas para coleta da glomalina produzida por estas estruturas.

Após extração do micélio fúngico ou do solo, a quantificação da glomalina é feita por métodos bioquímicos de rotina para dosagem de proteína, como o método Bradford ou pode-se ainda fazer uso de técnicas imunológicas, como o método ELISA.

Pelo método ELISA, é utilizado um anticorpo monoclonal MAb32b11, produzido a partir do macerado de esporos de *Glomus intraradices* injetado em camundongo, que reconhece epítipo da glomalina apenas em FMA, não reagindo com outros fungos do solo (WRIGHT et al. 1996). O método Bradford é baseado na formação de complexos entre o corante Comasié Brilliant Blue G-250 (CBB) e proteínas na solução. O complexo corante-proteína causa alteração na absorvância que é proporcional à quantidade de proteína presente (BRADFORD, 1976). Albumina bovina sérica, uma proteína de peso molecular semelhante à glomalina é usada como padrão (ROSIER; HOYE; RILLIG, 2006). Contudo, o método Bradford embora simples, rápido e repetível (HALVORSON; GONZALEZ, 2006) detecta todas as proteínas, inclusive peptídeos maiores que 3000 Da (ROSIER; HOYE; RILLIG, 2006), e por esta razão, sua precisão na quantificação da glomalina tem sido questionada por alguns pesquisadores.

Contudo, Rosier, Hoye e Rillig (2006) demonstraram que tanto albumina bovina sérica quanto misturas de proteínas contidas em folheto proveniente de três diferentes fontes vegetais não foram eliminadas após o processo de extração da glomalina, sendo detectadas pelo método Bradford, e adicionalmente, interferindo no método ELISA. Whiffen, Midgley e Mcgee (2007) demonstraram que compostos polifenólicos, tais como ácido tânico e ácidos húmicos presentes no folheto, resistiram à autoclavagem no processo de extração, ligando-se ao CBB e resultando em aumento na quantificação da glomalina.

Halvorson e Gonzalez (2006) verificaram que o pré-tratamento do solo com taninos resultou em extrato escuro comparado com solo controle, que pode ter influenciado na medição fotométrica após a reação Bradford e, conseqüentemente, causado estimativa incorreta da glomalina. Em outro estudo, Janos, Garamszegi e Beltran (2008) recuperaram 34% de albumina bovina sérica e 22% de mucina bovina no primeiro ciclo de autoclavagem, adicionadas ao

solo antes da extração da glomalina. Segundo os autores, é possível que estas glicoproteínas sejam desnaturadas a fragmentos menores que 3000 Da somente após 1 hora de autoclavagem, ou que possam se aderir à matéria orgânica do solo, ficando protegidas da desnaturação.

Resultados dos estudos indicam que no processo de extração da glomalina de solos, é obtido um extrato contendo complexas associações de compostos polifenólicos com proteína produzida por fungos micorrízicos.

Produção e decomposição da glomalina

Os mecanismos que regulam a produção de glomalina pelos FMA ainda não estão bem compreendidos, contudo fatores que afetam a simbiose micorrízica possivelmente devem também influenciar na produção desta proteína pelos FMA. Alguns autores (RILLIG et al., 2003b; HADDAD; SARKAR, 2003a) observaram correlação negativa entre concentrações de glomalina e pH do solo. Fungos tendem a predominar em solos ácidos, pois em solos alcalinos existe maior concorrência entre estes, bactérias e outros organismos. Como a glomalina é produzida por FMA, é de se esperar que haja maior produção desta proteína em solos ácidos em virtude de maior atividade fúngica nestas condições (HADDAD; SARKAR, 2003a).

Segundo Lovelock et al. (2004a) solos com altas concentrações de P, apresentaram menores concentrações de glomalina. Em condições de maior disponibilidade de nutrientes, principalmente N e P, sinais moleculares emitidos pela planta hospedeira são afetados, reduzindo os sítios de infecção e o estabelecimento da associação micorrízica, o que conseqüentemente afeta a produção de glomalina pelos FMA, uma vez que para isto dependem de fotossintatos fornecidos pelas plantas.

Carbono orgânico é um dos indicadores mais consistentes da concentração de glomalina nos solos. Correlações positivas entre as frações de glomalina

e o teor de carbono orgânico têm sido registrados em solos naturais e cultivados (BIRD et al., 2002; FRANZLUEBBERS; WRIGHT; STUEDEMANN, 2000; NICHOLS; WRIGHT, 2005; RILLIG et al., 2003b; WRIGHT et al., 1996). Segundo alguns autores, a glomalina reduz a decomposição de materiais orgânicos através da formação de agregados, que ficam protegidos da atividade enzimática dos micro-organismos decompositores. Contudo, para Bedini et al. (2007), a glomalina e o carbono orgânico apresentam semelhantes dinâmicas de deposição e decomposição.

Além dos fatores do solo, a produção de glomalina varia entre as espécies fúngicas, principalmente devido a efeitos ambientais sobre o metabolismo fúngico, bem como, a diferenças intrínsecas das espécies fúngicas. Wright e Upadhyaya (1999) verificaram que houve diferença significativa na produção de glomalina entre *Glomus caledonium* e *Gigaspora rósea*, que produziram respectivamente, 30 e 43% mais glomalina que *Glomus intraradices*. Quando cultivados em meio de cultura, *Gigaspora rosea* e *Gigaspora gigantea* apresentaram maior produção de glomalina que *Glomus intraradices* e *Glomus etunicatum* (WRIGHT et al., 1996). Diferenças significativas na produção de glomalina por comprimento de hifas foram observadas por Lovelock, Wright e Nichols (2004a), com *Acaulospora morrowiae* produzindo maiores níveis deste componente (0,036 $\mu\text{g m}^{-1}$ hifa) que *Gigaspora rosea*, *Glomus etunicatum* e *Glomus intraradices* (0,026, 0,022 e 0,0068 $\mu\text{g m}^{-1}$ hifa, respectivamente).

Estes resultados sugerem que espécies do gênero *Glomus* parecem alocar menos recursos para produção de glomalina (TRESSEDER; TURDER, 2007). Embora espécies do gênero *Glomus* freqüentemente predominem na comunidade de FMA, este grupo tende a investir menos na produção de hifas extrarradiculares (responsáveis pela produção da glomalina) e mais em estruturas intrarradiculares (TRESSEDER et al., 2003).

A presença de cobertura vegetal é um indicativo da disponibilidade de fotossintatos para os FMA, aspecto que, segundo Rillig, Maestre e Lamit (2003a), possivelmente justificou maiores concentrações de glomalina sob arbustos e gramíneas que em áreas descobertas, no Mediterrâneo. Solos sob copas de *Stipa tenacissima* apresentaram maiores concentrações das frações de glomalina comparada a áreas adjacentes sem cobertura (RILLIG et al., 2003b). Resultados semelhantes foram observados em um ecossistema semi-árido na América do Norte por Bird et al. (2002), onde maiores concentrações de glomalina foram registradas sob *Bouteloua eriopoda* [Torr.] Torr e *Prosopis glandulosa* Torrey que em áreas sem cobertura próximas a estas árvores. Segundo estes autores, solos sob copas de plantas acumulam mais matéria orgânica e estão menos expostos a perturbações, o que promove melhor condição para crescimento fúngico e produção de glomalina.

A composição da comunidade vegetal também pode influenciar na produção de glomalina pelos FMA nos solos (RILLIG; WRIGHT; EVINER, 2002). Em um sistema de rotação com trigo, milho e milheto, concentrações de glomalina foram significativamente maiores em comparação com outros sistemas de rotação que incluíram girassol (WRIGHT; ANDERSON, 2000), possivelmente devido a baixa dependência desta espécie à associação micorrízica (ESPINOZA-VICTORIA et al., 1993).

Solos sob rotação de cultura com período de pousio apresentaram menores concentrações de glomalina que solos sob rotação onde houve cultivo contínuo (WRIGHT; ANDERSON, 2000). A presença da vegetação resulta em maior disponibilidade de fotossintatos para os FMA, conseqüentemente, favorecendo a produção de glomalina por estes micro-organismos (TRESSEDER; TURNER, 2007).

Diversos estudos têm também relatado que a produção de glomalina pode ser influenciada pelo sistema de uso do solo, sendo menor em solos

agrícolas do que em solos nativos ou não cultivados (RILLIG et al., 2003b; WRIGHT, SATARR; PALTINEANU, 1999). Em áreas agrícolas, as concentrações de glomalina GFE e GT foram em torno de 0,5 a 3 mg g⁻¹ solo, respectivamente (RILLIG et al., 2003b), enquanto que em regiões semi-áridas, as concentrações foram comparativamente baixas, não excedendo 0,3 e 0,6 mg.g⁻¹ solo (BIRD et al., 2002). Contudo, em solos de floresta, Rillig et al. (2001) conseguiram extrair até 60 mg glomalina g⁻¹ solo.

O revolvimento do solo destroça hifas fungicas e deste modo, influencia negativamente na produção de glomalina pelos FMA. Valores de estabilidade de agregados e glomalina em áreas mesmo após 3 anos de plantio direto, foram substancialmente menores quando comparados com valores observados em áreas de pasto inalteradas por 15 anos (WRIGHT; SATARR; PALTINEANU, 1999).

Concentrações de glomalina aumentaram em solos submetidos a preparo reduzido (7,4 mg g⁻¹ de solo) ou plantio direto (7,2 mg g⁻¹ de solo), comparadas à solos com preparo convencional (5,8 mg g⁻¹ de solo). As proporções de agregados também foram significativamente maiores em áreas de plantio direto, comparada com áreas submetidas a preparo convencional (gradagem~15 cm) ou preparo mínimo (BORIE et al., 2006).

A decomposição da glomalina pode ser influenciada por características do solo, tais como teor de nutrientes e metais pesados, que atuam sobre a atividade microbiana (LOVELOCK et al., 2004b; VODNIK et al., 2008), conteúdo de argila, que pode promover proteção física da proteína (NICHOLS; WRIGHT, 2005), ou estabilização da proteína, por estar ligada ao ferro em solos ricos com este elemento (RILLIG et al., 2001). Outra possibilidade é que a decomponibilidade da glomalina varie entre os tipos de solos, devido a diferenças na estrutura química da glomalina ou ao grau com que a glomalina está ligada às partículas do solo (TRESSEDER; TURNER, 2007).

Rillig et al. (2003b) demonstraram que até 57% da glomalina permaneceu após 413 dias de incubação do solo em laboratório, indicando que certa quantidade desta proteína pode ser uma fração recalcitrante do carbono do solo. Conversão de pastagens para áreas cultiváveis resultou em perdas exponenciais de glomalina com taxa constante variando de 0,04 a 0,41 mg g de solo ano⁻¹. Contudo, entre 11 a 92 anos, a estabilidade foi atingida e as concentrações de glomalina observadas representavam 57 a 69% dos reservatórios iniciais (PREGGER et al., 2007). Em dois solos de Nova Zelândia, Rillig, Hoye e Carran (2006) verificaram que quantidades não significativas de glomalina (0,03%) foram lixiviadas, representando uma fração mínima do carbono total dissolvido (0,06%).

Concentrações de GFE e GT em áreas de floresta sem interferência antrópica, não alteraram significativamente ao longo de seis 6 anos, sendo 0,67 e 1,28 mg⁻¹g solo, em 1994, e 0,81 e 1,28 mg⁻¹g solo, em 2000, respectivamente. (KNORR; BOERNER; RILLIG, 2003). Steinberg e Rillig (2003) observaram que após 150 dias de incubação do solo, a GFE aumentou enquanto a GT diminuiu em 25%. Segundo estes autores, é provável que o aumento das concentrações de GFE durante a incubação do solo na ausência de plantas hospedeiras e, portanto, de simbiose micorrízica, seja resultado da glomalina liberada pela decomposição de hifas e esporos.

Contribuições da glomalina para o solo

Estabilidade de agregados

A relação entre estabilidade de agregados do solo e concentrações de glomalina tem sido demonstrada por muitos autores (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998; WRIGHT; ANDERSON, 2000; WRIGHT et al., 2007), e atribuída a recalcitrância e hidroforbicidade desta molécula. Como resultado desta relação, tem sido creditada à glomalina, importante contribuição na sustentabilidade dos ecossistemas (LUTGEN et al., 2003), uma vez que melhorias na estrutura do

solo, favorece trocas gasosas, infiltração de água, crescimento de raízes, redução da erosão e aumento da capacidade do solo de armazenar carbono (RILLIG et al., 1999).

Estudos demonstraram que a GFE imunorreativa foi mais estreitamente associada com a estabilidade de agregados em diferentes solos que outras frações da glomalina (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998). A fração imunorreativa, possivelmente por ser responsável pela propriedade de “cola” da glomalina (WRIGHT et al., 1996), desta maneira, auxiliado na fixação de material particulado no solo e favorecendo a formação e estabilidade de agregados.

Embora existam evidências relacionando o papel da glomalina na agregação do solo, esta proteína, não foi o principal agente cimentante de agregados em solos ricos em carbonatos, sugerindo que estabilidade de agregação do solo, possivelmente, não é a principal função da glomalina (PURIN; RILLIG, 2007).

Seqüestro de metais pesados

A glomalina seqüestra metais pesados, reduzindo a disponibilidade e o risco de toxicidade destes elementos para organismos e plantas crescidas em solos poluídos (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2004). Segundo Cornejo et al. (2008), o seqüestro de metais pesados pela glomalina pode ser um mecanismo altamente eficiente dos FMA para melhorar as condições ambientais para seu crescimento, levando a estabilização de solos altamente poluídos por estes elementos.

Vodnik et al. (2008) verificaram em um solo com altas concentrações de Pb (5900 mg kg⁻¹) e Zn (1300 mg kg⁻¹), que 15,5% e 20,5% do teor total destes metais estavam ligados à molécula da glomalina, respectivamente. Altos teores de Cu (27%) e Zn (5,8%) associados à glomalina foram também observados por Cornejo et al. (2008). Em ambos os estudos, os autores observaram que

houve correlação positiva entre as concentrações de glomalina e os teores totais dos elementos nos solos.

A produção de glomalina pelos FMA aumenta em solos contaminados por metais pesados, possivelmente como um mecanismo para melhorar o habitat fúngico (PURIN; RILLIG, 2007) ou devido a baixa população microbiana capaz de degradar este componente sob extremas condições de poluição (RILLIG et al., 2001; STEINBERG; RILLIG, 2003; RILLIG et al., 2003b).

González-Chávez et al. (2004) demonstraram que glomalina produzida por hifas de *Gigaspora rosea* seqüestrou até 28 mg Cu⁻¹g *in vitro*. Segundo estes autores, a glomalina seqüestra íons de Cu por reações reversíveis (sorção eletrostática) e, em certa medida, por forte complexação, pois mesmo após extração com citrato, precipitação com HCl, e neutralização com borato de sódio, alguns íons de Cu estavam ligados a molécula.

A capacidade de seqüestro pela molécula da glomalina é variável entre os metais pesados. Além disso, citrato de sódio que é usado como extrator, pode liberar íons metálicos provenientes de outras frações do solo e esses podem se ligar posteriormente à molécula da glomalina (VODNIK et al., 2008).

Estoque de C e de N em solos

Estima-se que, dependendo do procedimento de extração e da origem do solo, entre 28 a 45% da molécula de glomalina é carbono (RILLIG et al., 2003b; LOVELOCK et al., 2004b; NICHOLS; WRIGHT, 2006). A glomalina também é relativamente rica em nitrogênio (0,9 a 7,3% de peso seco; LOVELOCK et al., 2004b; NICHOLS; WRIGHT, 2005; RILLIG et al., 2001), portanto servindo como fonte deste elemento para os micro-organismos nos solos.

Em solos havaianos, Rillig et al. (2001) verificaram que as quantidades de C e de N na glomalina representaram 4 e 5% do C e do N totais do solo, enquanto que a contribuição do

C da biomassa microbiana para o C total do solo variou somente entre 0,08 a 0,2%. Loverlock et al. (2004b) verificaram que o C e o N na glomalina corresponderam a aproximadamente 3,2 e 5% do reservatório total de C e de N em dois solos de La Selva.

Em um agroecossistema, o C da glomalina representou 7,2 a 8,5% do C total do solo, enquanto que, em uma floresta nativa, a glomalina contribuiu com 18,5 a 26,1% do C total do solo, na camada de 0-10 cm (MORALES et al., 2005). Rillig et al. (2003b) observaram que a contribuição do C da glomalina para o C total do solo variou de 3,8% (áreas de mata nativa) a 7,8% (área reflorestada), dependendo do sistema de uso da terra.

As diferenças na contribuição da glomalina para o C total do solo podem ser explicadas pelo sistema de uso do solo, de modo que em ecossistemas naturais, diferente dos agroecossistemas, a ausência de intervenções antrópicas promove condições favoráveis ao crescimento fúngico, e conseqüentemente à produção de glomalina. Além disso, o não revolvimento do solo preserva a integridade das hifas fungicas que são as estruturas produtoras de glomalina, bem como, favorece a formação de agregados estáveis que protegem a molécula da degradação por micro-organismos.

Alguns estudos recentes

Durante dois anos consecutivos, foi avaliada a ocorrência e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em um plantio consorciado de milho, feijão e algodão sob diferentes sistemas de adubação orgânica no semi-árido paraibano. Em ambos os anos, maiores teores de glomalina foram registrados no solo rizosférico do algodoeiro, quando o esterco foi incorporado antes do plantio e a gliricídia aplicada em cobertura 45 dias após o plantio (SOUSA et al., 2011c).

Garrido et al. (2009) verificou que neste sistema, também houve maior produção de biomassa pelas

plantas de algodão, e atribuiu ao crescimento mais lento da cultura em relação ao milho e feijão, o que proporcionou melhor aproveitamento dos nutrientes liberados gradativamente pelo esterco. Maior produção de biomassa possivelmente resultou em aumento da taxa fotossintética e conseqüentemente da alocação de fotossintatos para as raízes, estimulando a produção de glomalina pelos FMA associados a estas plantas. Sousa et al. (2011a) também verificaram que em um solo argiloso a aplicação de esterco como adubo orgânico, favoreceu a produção de glomalina por FMA nativos de regiões produtoras de sisal no semi-árido da Bahia.

Em um estudo sobre a diversidade e atividade de FMA em diferentes estádios sucessionais de caatinga no semi-árido paraibano, foi possível observar que os teores de glomalina no solo aumentaram durante o avanço do processo de sucessão da vegetação (SOUSA et al., 2011d). Os autores justificaram que espécies vegetais em estádios iniciais de sucessão apresentam grande demanda por nutrientes, resultando em maior capacidade fotossintética, desta maneira aumentando a quantidade de fotossintatos transferidos para os FMA, o que possivelmente favoreceu a produção de glomalina.

Avaliando o efeito de diferentes sistemas de uso da terra sobre a comunidade de FMA (dados não publicados) verificaram maiores teores de glomalina no sistema de produção de palma forrageira quando comparado com os sistemas de consorcio milho e feijão e no sistema de produção de capim buffel. Os autores atribuíram este resultado aos maiores teores de C orgânico no solo neste sistema, que é considerado um dos indicadores mais consistentes do teor de glomalina nos ecossistemas.

As características químicas e físicas do solo influenciam significativamente na comunidade de FMA, e conseqüentemente na produção de glomalina por estes micro-organismos. Araújo et al. (2011) verificaram em plantios de sisal na região semi-árida da Bahia, maiores teores de glomalina

em Retirolândia (3,67 mg g solo⁻¹), enquanto que os menores valores foram registrados em áreas localizadas no município de Ouroândia (0,67 mg g de solo⁻¹), correspondendo a uma diferença de 447,7%. É possível que os maiores teores de glomalina nas áreas em Retirolândia estejam relacionados ao maior teor de argila nestes solos, uma vez que estes minerais promovem proteção física à molécula, contra a ação de micro-organismos decompositores. Em plantios de eucalipto no litoral norte da Bahia, Jesus et al. (2010), verificaram que embora os clones apresentem susceptibilidade à micorrização em condições de campo, variações nas características dos solos resultaram em diferenças significativas em aspectos ecológicos dos FMA, inclusive nos teores de glomalina produzida por estes micro-organismos, sendo observados valores entre 0,34 e 1,92 mg g de solo⁻¹.

Considerações Finais

Apesar da importante contribuição da glomalina, a natureza bioquímica desta proteína ainda não está plenamente compreendida. Além disso, para uma determinação precisa da glomalina nos solos será necessário reformular o protocolo de extração, reduzindo a interferência de compostos polifenólicos co-extraídos que interferem na quantificação da proteína.

Estudos sobre a produção e decomposição da glomalina serão importantes para esclarecer muitas questões pendentes sobre a função fisiológica desta proteína para os FMA, seus estoques em diferentes ecossistemas, identificação de organismos responsáveis pela decomposição e consumo da molécula e espécies de FMA com maior potencial em produzir esta proteína no solo.

Referências

ARAÚJO, A. F.; SOUSA, C. S.; LOPES, P. L.; PRADO, I. G. O.; MAMÉDIO, I. M. P.; SOARES, A. C. F. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares e teores de glomalina em cultivos de sisal (*Agave sisalana*)

- na região semi-árida da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 33., 2011, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2011. CD-ROM.
- BEDINI, S.; AVIO, L.; ARGESE, E.; GIOVANNETTI, M. Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Zürich, v. 120, n. 2-4, p. 463-466, 2007.
- BIRD, S. B.; HERRICK, J. E.; WANDER, M. M.; WRIGHT, S. F. Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. *Environmental Pollution*, v. 116, n. 3, p. 445-455, 2002.
- BORIE, F.; RUBIO, R.; ROUANET, J. L.; MORALES, A.; BORIE, G.; ROJAS, C. Effect of tillage systems on soil characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean Ultisol. *Soil & Tillage Research*, Netherlands, v. 88, n. 1-2, p. 253-261, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CORNEJO, P.; MEIER, S.; BORIE, G.; RILLING, M. C.; BORIE, F. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science of the Total Environment*, v. 406, n. 1-2, p. 154-160, 2008.
- DRIVER, J. D.; HOLBEN, W. E.; RILLIG, M. C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 37, n. 1, p. 101-106, 2005.
- ESPINOZA-VICTORIA, D.; QUINTERO-RAMOS, M.; FERRERA-CERRATO, R.; BETHLENFALVAY, G. J. Fitting plants to soil through mycorrhizal fungi – Plant nutrition in host-endophyte combinations evaluated by the diagnosis and recommendation integrated system. *Biology and Fertility of Soils*, Germany, v. 15, n. 2, p. 96-102, 1993.
- FRANZLUEBBERS, A. J.; WRIGHT, S. F.; STUEDEMANN, J. A. Soil aggregation and glomalin under pastures in the southern Piedmont USA. *Soil Science Society of America Journal*, v. 64, p. 1018-1026, 2000.
- GADKAR, V.; DRIVER, J. D.; RILLIG, M. C. A novel in vitro cultivation system to produce and isolate soluble factors released from hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 14, p. 1071-1076, 2006.
- GARRIDO, M. S.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MARQUES, T. R. R. Crescimento e absorção de nutrientes pelo algodoeiro e pela mamoneira adubados com gliricídia e esterco. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 13, n. 5, p. 531-536, 2009.
- GONZÁLEZ-CHAVÉZ, M. C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; WRIGHT, S. F.; NICHOLS, K. A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, v. 130, n. 3, p. 317-323, 2004.
- HADDAD, M. J.; SARKAR, D. Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: part II – relationship with soil properties. *Environmental Geosciences*, v. 10, n. 3, p. 99-106, 2003a.
- _____. Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: part I – environmental significance. *Environmental Geosciences*, v. 10, n. 3, p. 91-98, 2003b.
- HALVORSON, J. J.; GONZALEZ, J. M. Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. *Plant and Soil*, The Hague, v. 286, n. 1-2, p. 339-356, 2006.
- JANOS, D. P.; GARAMSZEGI, S.; BELTRAN, B. Glomalin extraction and measurement. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 40, n. 3, p. 728-739, 2008.
- JESUS, J. A.; LIMA, F. de S.; SOUSA, C. S.; DAMASCENO, J. C. A.; SOARES, A. C. F. Propágulos de fungos micorrízicos arbusculares e teores de glomalina em plantios de eucalipto no litoral norte da Bahia. In: FERTBIO, 2010, Guarapari. *Anais...* Guarapari: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010. CD-ROM.
- KNORR, M. A.; BOERNER, R. E. J.; RILLIG, M. C. Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. *Mycorrhiza*, Berlin, v. 13, n. 4, p. 205-210, 2003.
- LOVELOCK, C. E.; WRIGHT, S. F.; NICHOLS, K. A. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 36, n. 6, p. 1009-1012, 2004a.
- LOVELOCK, C. E.; WRIGHT, S. F.; CLARK, D. A.; RUESS, R. W. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungal across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, v. 92, n. 2, p. 278-287, 2004b.
- LUTGEN, E. R.; MUIR-CLAIRMONT, D.; GRAHAM, J.; RILLIG, M. C. Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. *Plant and Soil*, The Hague, v. 257, n. 1, p. 71-83, 2003.

- MORALES, A.; CASTILLO, C. C.; RUBIO, R.; BORIE, F.; ROUANET, J. L. Niveles de glomalina en suelos de dos ecosistemas del sur de Chile. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, v. 5, n. 1, p. 37-45, 2005.
- MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with and emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, v. 37, p. 471-491, 1990.
- NICHOLS, K. A. *Characterization of glomalin – a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi*. 2003. Thesis (Ph.D.) – University of Maryland, College Park, MD.
- NICHOLS, K. A.; WRIGHT, S. F. Carbon and nitrogen in operationally defined soil organic matter pools. *Biology & Fertility of Soils*, Germany, v. 43, n. 2, p. 215-220, 2006.
- _____. Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils. *Soil Science*, Madison, v. 170, n. 12, p. 985-997, 2005.
- PREGER, A. C.; RILLIG, M. C.; JOHNS, A. R.; PREEZ, C. C. D.; LOBE, I.; AMELUNG, W. Losses of glomalin-related soil protein under prolonged arable cropping: a chronosequence study in sandy soils of the South African Highveld. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 39, n. 2, p. 445-453, 2007.
- PURIN, S.; RILLIG, M. C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*, v. 51, n. 2, p. 123-130, 2007.
- _____. Immuno-cytolocalization of glomalina in the mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, n. 3, p. 1000-1003, 2008.
- RILLIG, M. C.; MAESTRE, F. T.; LAMIT, L. J. Microsite differences in fungal hyphal length, glomalin, and soil aggregate stability in semiarid Mediterranean steppes. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 35, n. 9, p. 1257-1260, 2003a.
- RILLIG, M. C.; RAMSEY, P.; MORRIS, S.; PAUL, E. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to soil-use change. *Plant and Soil*, The Hague, v. 253, n. 2, p. 293-299, 2003b.
- RILLIG, M. C.; STEINBERG, P. D. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 34, n. 9, p. 1371-1374, 2002.
- RILLIG, M. C.; WRIGHT, S. F.; EVINER, V. T. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil*, The Hague, v. 238, n. 2, p. 325-333, 2002.
- RILLIG, M. C.; WRIGHT, S. F.; NICHOLS, K. A.; SCHMIDT, W. F.; TORN, M. S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil*, The Hague, v. 233, n. 2, p. 167-177, 2001.
- RILLIG, M. C.; WRIGHT, S. F.; ALLEN, M. F.; FIELD, C. B. Rise in carbon dioxide changes soil structure. *Nature*, London, v. 400, p. 628, 1999.
- ROSIER, C. L.; HOYE, A. T.; RILLIG, M. C. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 38, n. 8, p. 2205-2211, 2006.
- SOUSA, C. S.; LIMA, F. S.; MAMÉDIO, I. M. P.; JESUS, J. A.; CARMO, M. O.; SOARES, A. C. F. Adubação orgânica no controle da podridão vermelha, crescimento de mudas de sisal e sobre a ocorrência de fungos micorrízicos nativos de solos da região semi-árida da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 33., 2011, Uberlândia. *Anais... Uberlândia: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 2011a. CD-ROM.
- SOUSA, C. S.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; LIMA, F. S. Influências da temperatura de armazenamento e de extratores na determinação de glomalina em solos Paraibanos. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 42, n. 4, p. 837-841, 2011b.
- SOUSA, C. S.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MAIA, L. C.; OEHL, F.; LIMA, F. S. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi after organic fertilization in maize, cowpea and cotton intercropping systems. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 34, n. 2, p. 149-156, 2012c.
- _____. Arbuscular mycorrhizal fungi in different successional stages of caatinga in the semi-arid region of Brazil. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 2011d. (no prelo).
- STEINBERG, P. D.; RILLIG, M. C. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 35, n. 1, p. 191-194, 2003.
- TRESEDER, K. K.; TURNER, K. M. Glomalin in ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 71, n. 4, p. 1257-1266, 2007.
- TRESEDER, K. K.; EGERTON-WARBURTON, L. M.; ALLEN, M. F.; CHENG, Y. F.; OECHEL, W. C. Alteration of soil carbon pools and communities of mycorrhizal fungi in chaparral exposed to elevated carbon dioxide. *Ecosystems*, v. 6, n. 8, p. 786-796, 2003

- VODNIK, D.; GRČMAN, H.; MACEK, I.; ELTEREN VAN, J. T.; KOVACENIC, M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, v. 392, n. 1, p. 130-136, 2008.
- WHIFFEN, L. K.; MIDGLEY, D. J.; MCGEE, P. A. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 39, n. 2, p. 691-694, 2007.
- WRIGHT, S. F.; ANDERSON, R. L. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. *Biology & Fertility of Soils*, Germany, v. 31, n. 3-4, p. 249-253, 2000.
- WRIGHT, S. F.; FRANKE-SNYDER, M.; MORTON, J. B.; UPADHYAYA, A. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil*, The Hague, v. 181, n. 2, p. 193-203, 1996.
- WRIGHT, S. F.; GREEN, V. S.; CAVIGELLI, M. A. Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil & Tillage Research*, Netherlands, v. 94, n. 2, p. 546-549, 2007.
- WRIGHT, S. F.; STARR, J. L.; PALTINEANU, I. C. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 63, n. 6, p. 1825-1829, 1999.
- WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, The Hague, v. 198, n. 1, p. 97-107, 1998.
- _____. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, Madison, v. 161, n. 9, p. 575-586, 1996.
- _____. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza*, Berlin, v. 8, n. 5, p. 283-285, 1999.