

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
NO CRESCIMENTO, EXTRAÇÃO DE
METAIS PESADOS E CARACTERÍSTICAS
ANATÔMICAS DA *Brachiaria decumbens* Stapf.
EM SOLO CONTAMINADO**

SILVANA DA SILVA

2006

SILVANA DA SILVA

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO
CRESCIMENTO, EXTRAÇÃO DE METAIS PESADOS E
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DA *Brachiaria decumbens*
Stapf. EM SOLO CONTAMINADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do
título de “Doutor”.

Orientador

Prof. José Oswaldo Siqueira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Silvana

Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento, extração de metais pesados e características anatômicas da *Brachiaria decumbens* stapf. em solo contaminado/
Silvana Silva. -- Lavras : UFLA, 2006.

82p. : il.

Orientador: José Oswaldo Siqueira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Absorção de metais. 3. Gramíneas tropicais. 4. Micorrizas. 5. Contaminação do solo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.64

SILVANA DA SILVA

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO
CRESCIMENTO, EXTRAÇÃO DE METAIS PESADOS E
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DA *Brachiaria decumbens*
Stapf. EM SOLO CONTAMINADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do
título de “Doutor”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2006.

Prof. Evaristo Mauro de Castro	DBI/UFLA
Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira	DCS/UFLA
Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares	DCS/UFLA
Prof. Dr. Sidney Luiz Sturmer	DCN/FURB

Prof. José Oswaldo Siqueira
DCS/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A minha mãe, Noêmia; meu pai, Dirceu; meu irmão, Ronaldo; minhas irmãs, Nadir, Luciana, Kely Aline e Marília e a todos os amigos que torceram por mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado força e energia para vencer mais uma etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade de realização do curso.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Ao professor José Oswaldo Siqueira pela orientação, durante o doutorado.

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Fátima Maria de Souza Moreira, Prof. Evaristo Mauro de Castro, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares e Prof. Dr. Sidney Luiz Sturmer, pelas sugestões.

Ao funcionário Manuel Aparecido da Silva pela amizade e ajuda na execução deste trabalho.

Aos amigos adquiridos durante o curso, Regla, Patrícia, Robervone, Rafaela, Michele Rocha, Michele, Antônio Claret, Bruno Dias, Cláudio, Renato, José Roberto, Liziane, Antônio Marcos, Juliano, Alexandre D'Andréa, Gláucia, Krisle, Felipe, Paulo, Éderson, Plínio, Gabriel, Gislene, Carlos (Espeto), José Geraldo, Adriana, Alexandre Barberi, Emerson, Alexandre (Xandão), obrigada pelo apoio e amizade.

Aos amigos José Geraldo, Cláudio, pela amizade e grande ajuda na condução do trabalho.

Ao Prof. Eduardo Alves e a funcionária Heloísa do Departamento de Fitopatologia pela amizade, paciência e dedicação no acompanhamento desse trabalho.

Às minhas grandes amigas, Eva, Lucilene, Regla, Haidêe, Ângela, Fátima e ao meu amigo Silvério que sempre acreditaram em mim e me apoiaram.

Aos meus familiares pela confiança e amor.

À minha mãe, Noêmia Afonso da Silva, pelo amor incondicional que me dedica.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	04
2.1 Metais pesados: origem e impactos no ambiente.....	04
2.2 Toxicidade de metais pesados e absorção pelas plantas.....	06
2.3 Micorrizas na fitoextração de metais pesados.....	09
2.4 Influência dos metais pesados nas características anatômicas da planta.....	13
3 Referências bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 2: Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados de um solo contaminado pela <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf.....	22
1 Resumo.....	23
2 Abstract.....	24
3 Introdução.....	25
4 Material e métodos.....	28
5 Resultados e discussão.....	31
6 Conclusões.....	43
7 Referências bibliográficas.....	44
CAPÍTULO 3: Contaminação do solo por metais pesados e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento, absorção de metais e anatomia de <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf.....	47
1 Resumo.....	48

2 Abstract.....	49
3 Introdução.....	50
4 Material e métodos.....	54
5 Resultados e discussão.....	58
6 Conclusões.....	78
7 Referências bibliográficas.....	79

RESUMO GERAL

SILVA, Silvana. **Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento, extração de metais pesados e características anatômica de *Brachiaria decumbens* Stapf em solos contaminados com metais pesados.** 2006. 82p. Doutorado Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A intensificação da urbanização e das atividades industriais e agrícolas tem causado grande expansão das áreas contaminadas com metais pesados e conseqüências adversas ao meio ambiente, havendo necessidade de desenvolver tecnologias eficazes para remediação destas áreas. Uma tecnologia promissora é a fitorremediação, que consiste na utilização de plantas e sua microbiota associada para degradar ou remover matérias tóxicos do solo. Entretanto, os estudos desta técnica não tem dado a atenção devida aos microrganismos do solo, em especial aos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que exercem efeito protetor para as plantas e facilitam absorção de íons da solução do solo. No presente trabalho avaliou-se a influência de diferentes FMAs no crescimento e na capacidade da *Brachiaria decumbens* de extrair Cd, Zn, Pb e Cu de um solo contaminado, bem como a influência destes fungos e da contaminação sobre as características anatômicas desta planta. Para isto realizaram-se dois experimentos em potes de plástico em casa de vegetação com mistura de solo contaminado contendo em mg kg⁻¹: Zn=3.300; Cu=60; Cd=29 e Pb=73 (extração Mehlich-1), onde plantou-se *Brachiaria decumbens* inoculada ou não com 14 isolados de FMAs. Constatou-se que este nível de contaminação exerce efeito tóxico acentuado para a *B. decumbens* e que este efeito é amenizado pela inoculação com certos FMAs. O efeito protetor da simbiose é associado à redução da absorção ou translocação dos metais das raízes para a parte aérea, sendo efeitos diferenciados para os 14 isolados estudados. A inoculação causou aumento médio na produção de matéria seca de 84% em relação às plantas não inoculadas. Mesmo havendo redução na absorção de alguns metais, plantas micorrizadas aumentaram a quantidade de metais extraídos pela *B. decumbens*. Estes aumentos foram: 845, 142, 68 e 54% para Cu, Pb, Zn e Cd, respectivamente. Os efeitos na extração foram mais consistentes para o Cu. Apenas *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA e *G. gigantea* foram capazes de aumentar a extração dos quatro metais estudados. Estes efeitos dos FMAs aumentam o potencial fitorremediador da *B. decumbens* em solo tropical contaminado. Na segunda parte deste estudo avaliaram-se os efeitos da contaminação e da inoculação com FMAs selecionados sobre características anatômicas da planta. Verificou-se acentuada modificação nas folhas destacando-se redução no tamanho dos vasos e no número de células do

parênquima foliar em consequência da elevada absorção dos metais. Este efeito foi de baixa intensidade nas plantas colonizadas por isolados que exerceram efeito protetor à planta. Houve também alterações na anatomia das raízes destacando-se redução na espessura e a área proporcional do córtex e do cilindro central e aumento na epiderme, exoderme e parênquima lignificado. Em raízes de plantas colonizadas com *S. pellucida* verificou-se alterações nos encaixes celulares da exoderme, endoderme, havendo encaixes tipo bráquiforme. Concluiu-se que os efeitos dos FMAs na proteção e acúmulo de metais pesados na *B. decumbens* difere de modo acentuado. Estes efeitos são mais acentuados e consistentes para *S. pellucida* e *A. morrowiae*, sendo esses resultantes da maior retenção, principalmente do Cu nas raízes. Fica demonstrado o potencial desta simbiose para a fitorremediação de solos contaminados com metais pesados.

¹ Orientador: José Oswaldo Siqueira – UFLA

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Silvana. **Arbuscular mycorrhizal funi on growth, extraction of heavy metals and anatomical characteristics od *Brachiaria decumbens* in soil contaminated with heavy metals**. 2006. 82p. Thesis (Doctorate on Soil and Plant Nutrition) –Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.

Intensification of urbanization and industrial and agricultural activities has caused great expansion of heavy metal contaminated areas, thereby having adverse environmental consequences, evidencing the need to developing efficient technology for remediating these areas. One promising technology is phytoremediation, which consists of utilizing plants and their associated microbiota to degrade or to remove toxic material from soil. However studies of technique have given the deserved attention to soil microorganisms, mainly arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that exhibit plant protection and facilitate ionic absorption from soil solution. In the present study influence of deferent AMF on growth and total extraction of Cd, Zn, Pb and Cu from a contaminated by *Brachiaria decumbens*, as well as contamination and fungal effects on plant anatomical characteristics were evaluated. Two experiments were conducted under greenhouse conditions in plastic pots with a soil mix containing in mg kg⁻¹: Zn= 3300, Pb= 73, Cu= 60 and Cd= 29 (Mehlich 1). Soil was planted with *Brachiaria decumbens* inoculated with 14 differents AMF. It was found that contamination markedly inhibits plant growth being much effect a consequence of high metal uptake and shoot translocation. Contamination inhibition was verified by inoculation with certain AMF isolates. The symbiosis protecting effect was related to a reduction in metal uptake by roots or translocation to shoots. Such effect was highly influenced by the fungal isolates. The average effect of inoculation on dry matter yield was 84%, over non-mycorrhizal controls. Even with the reduction in metal uptake, mycorrhizal plants accumulated more metal than non-mycorrhizal ones. Such increase in metal accumulation was: 845, 142, 68 and 54% for Cu, Pb, Zn and Pb, respectively. Effects on extraction were more consistent for Cu than for any other metal. Only three isolates *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA and *G. gigantea* increased total accumulation of all four metals studied. AMF benefits to metal accumulation enhance the phytoremediation potential of *Brachiaria decumbens* in contaminated tropical soils. In a second part of this study effects of contamination and inoculation with selected AMF on anatomical characteristics of *Brachiaria decumbens* were investigated. Marked anatomical modification caused by contamination was found in leaf tissues. There was a reduction in vessel size and in the cell density in the foliar parenchyma. These effects happened at a much lower intensity in plants colonized by AMF that also exhibit

protection effects on plant growth. Root anatomy was also affected by contamination: reduction in cortical tissue, in the central cylinder and an increase in epiderm, exoderm and lignified parenchyma. In roots colonized by *S. pellucida* it was found alterations in exodermal and endodermal cell shapes. These cells exhibits lateral projections that facilitate cell junctions. As conclusions, the protecting effects of AM and heavy metals accumulation by *Brachiaria decumbens* differ quite substantially. Such effects were more pronounced in plants colonized by *S. pellucida* and *A. morrowiae*, which were capable to retain metal mainly in the roots. The potential of this symbiosis to phytoremediation of heavy metal contaminated soil was demonstrated.

¹Adviser: José Oswaldo Siqueira – UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O processo intensivo de industrialização e expansão agrícola pelo qual passou o país nos últimos 30 anos e a migração de populações rurais para os grandes centros urbanos gerou maior volume de resíduos, a ocorrência de acidentes ambientais, envolvendo o derrame de produtos químicos, poluentes que causam a degradação do solo em praticamente todas as regiões do Brasil. Destaca-se neste cenário a exploração mineral, onde há produção e acúmulo de volume de resíduos sólidos, incluindo estéréis de mineração e rejeitos do processamento industrial que causam sérios problemas ambientais, necessitando de ações que visam combater e recuperar a degradação. Essas ações visam atender exigências legais, e refletem a conscientização da sociedade para as questões ambientais.

Áreas contaminadas podem ser reabilitadas por várias técnicas, porém a mais vantajosa sobre vários aspectos é a fitorremediação, que é definida como o uso de plantas e sua microbiota associada para absorver e remover poluentes do ambiente. É considerada uma técnica muito promissora para remediação de locais poluídos, podendo englobar vários processos, como a fitoextração, que consiste da remoção do contaminante do local (solo) pelas plantas. O sucesso da fitoextração, como técnica de limpeza ambiental, depende de vários fatores, incluindo o nível de contaminação do solo, biodisponibilidade do metal e a habilidade da planta para interceptar, absorver e acumular metais na parte aérea.

As plantas exibem comportamento diferenciado em relação à absorção e translocação dos metais para a parte aérea e, por isso, possuem teores diferenciados nas diferentes partes. O entendimento desse comportamento e também dos mecanismos de tolerância em âmbito molecular, celular, fisiológico, bioquímico e genético são necessários para definir as estratégias de fitorremediação.

A fitorremediação tem sido utilizada sem dispensar, no entanto maiores cuidados aos fatores que afetam a atividade dos microrganismos do solo, especialmente daqueles envolvidos na transformação dos poluentes ou na absorção destes pelas plantas remediadoras. Entre estes e de interesse particular estão os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que funcionam ampliando o sistema radicular das plantas, facilitando a absorção de íons e da água do solo, aumentando, assim, a ação filtrante e purificadora do solo. Além disso, a micorrização aumenta a capacidade das plantas em suportar condições ambientais adversas, tais como alta temperatura, baixa umidade no solo e presença de metais pesados, ou orgânicos fitotóxicos. Não obstante a possibilidade desses efeitos benéficos das micorrizas, poucas são as pesquisas atualmente existentes no Brasil sobre a função desta simbiose na reabilitação de áreas contaminadas.

O objetivo geral desse trabalho foi o de avaliar a influência de diferentes FMAs no crescimento e na capacidade da *Brachiaria decumbens* de extrair Cd, Zn, Pb e Cu de um solo multicontaminado, bem como a influência dos FMAs e da contaminação do solo sobre as algumas características anatômicas da planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados: origem e impactos no ambiente

A contaminação do solo, seja com metais pesados ou qualquer outro íon inorgânico, é oriunda principalmente da atividade antrópica ou da acumulação por processos naturais (McBride, 1994). Através de processos naturais como intemperismo da rocha de origem, sobretudo aquelas ricas em sulfetos, óxidos, silicatos, fosfatos e carbonatos, os teores de alguns metais se encontram dentro das seguintes faixas médias em mg kg^{-1} : Pb, 10-84; Cd, 0,06-1,1; Cu, 6-80; Zn, 17-125 (Kabata-Pendias & Pendias, 1984). Os metais poluentes atingem o solo através de rotas diversas como: deposição de rejeitos industriais sobre o solo, extração e processamento de minérios; fertilizantes e pesticidas; lodos de estação de tratamento de esgoto urbano e industrial; e deposição atmosférica (King, 1996). Estes podem atingir concentrações tóxicas, causando sérias conseqüências sobre os componentes funcionais do ecossistema (Logan, 1992). No caso específico da industrialização de zinco, por exemplo, são produzidos grandes volumes de resíduos ricos em metais, cuja deposição ao solo pode elevar os teores totais (em mg kg^{-1}) para valores superiores a 20.000 de Zn, 800 de Cu, 600 de Pb e 100 de Cd (Dias-Júnior et al., 1998; Ribeiro-Filho et al., 1999).

A exploração mineral é uma atividade que causa grande impacto ambiental nas áreas mineradas, bem como nos pátios de estocagem e nas transformações de rejeitos industriais de materiais metálicos. Nesses locais, há elevada produção e acúmulo de resíduos sólidos, incluindo estéreis de mineração, constituídos de rochas residuais, além de rejeitos do processamento industrial, com elevadas concentrações de metais pesados. Estes podem contaminar o solo e causar graves problemas ambientais que necessitam de efetiva solução tecnológica para remediação (Salt et al., 1995). Grande parte dos

contaminantes inorgânicos é solúvel em água e, de acordo com suas características físico-químicas (peso molecular, polaridade, potencial iônico, entre outras), podem ser lixiviados, atingindo o lençol freático, causando sérias conseqüências ao meio ambiente. De acordo com Singh & Steinnes (1994) o transporte de metais pesados no perfil do solo para águas subterrâneas depende, essencialmente, da concentração do metal na solução do solo. Todavia, esses processos e suas interações na solução do solo ainda não são completamente entendidos. Alterações no conteúdo de água do solo, no equilíbrio dinâmico entre metais e sólidos do solo e na atividade dos microrganismos, influenciam as condições de oxi-redução, conteúdo de agentes quelantes solúveis e composição da atmosfera do solo, necessitando, portanto, de ser simultaneamente considerados (McBride, 1994).

Visto essa grande alteração ao meio ambiente, provocada pela contaminação com metais pesados, a legislação em vigor exige a remediação das áreas contaminadas. Entretanto, existe uma certa carência de tecnologias apropriadas para esse fim. Dentre os procedimentos de descontaminação, destaca-se a fitorremediação, que consiste na utilização de plantas (árvores, arbustos, plantas rasteiras e aquáticas) e de sua microbiota, associada com o fim de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas do ambiente (Cunningham et al., 1996; Wong, 2003). A fitorremediação, como qualquer outra tecnologia, apresenta várias vantagens e desvantagens que devem ser levadas em conta quando for aplicada (Vangronsveld & Cunningham, 1998). Se o baixo custo é uma vantagem, o tempo para que se observem os resultados pode ser longo, pois depende do ciclo vital da planta. Além disso, a concentração do poluente e a presença de outras toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta. Outra limitação é que as plantas usadas com o propósito de minimizar a poluição ambiental podem entrar na cadeia alimentar e resultarem em conseqüências indesejáveis (Sursarla et al., 2002). Apesar dos problemas ainda

não resolvidos, o mercado para a exploração da fitorremediação é promissor, mas para isto é necessário entender as respostas das plantas à contaminação, especialmente por metais pesados.

Os metais pesados prejudicam o funcionamento normal tanto das plantas como da biota do solo (Burkhardt et al., 1993), inibindo uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos, afetando a produtividade e sustentabilidade dos ecossistemas e induzindo a danos, às vezes, irreversíveis, do status biológico, químico e físico do solo (Haselwandter et al., 1994). Em sistemas contaminados por metais pesados são comuns danos e perdas da cobertura vegetal, alterações na estrutura do solo, aumento da erosão, perdas de nutrientes disponíveis e de matéria orgânica, diminuição da densidade de propágulos e da atividade da microbiota, fatores que contribuem para a degradação (Jeffries & Barea, 1994; Vangrosveld et al., 1996).

2.2 Toxicidade de metais pesados e absorção pelas plantas

As respostas das plantas aos metais pesados são complexas e influenciadas por muitos fatores como: quantidade e formas químicas em que os metais se encontram no solo, existindo entre as plantas ampla variabilidade nos processos de absorção, translocação e acúmulo desses, os quais são influenciados pelos microrganismos do solo e simbiontes radiculares (McBride, 1994). Assim, a fitotoxicidade desses elementos pode variar largamente de um elemento para outro e também entre as espécies e cultivares. Além das características inerentes à planta, a absorção de metais também sofre influência de fatores do meio, como o tipo e composição do solo, o pH, o potencial redox, a especiação química e a concentração do metal e de outros elementos (Marschner, 1990).

A determinação da fitotoxidez de um elemento deve se basear nas seguintes variáveis: redução do crescimento ou diminuição da produção,

visualização de sintomas de fitotoxidez e avaliação da concentração no tecido. A faixa de concentração de Zn, Cu Pb e Cd na parte aérea das plantas, considerada excessiva do ponto de vista da fitotoxidez, apontada por Kabata-Pendias & Pendias (1984) e Barceló & Poschenrieder (1992), são (em mg kg⁻¹): 100 a 400 para o Zn, 20 a 100 para o Cu, 30 a 300 para o Pb e 5 a 30 para o Cd.

Para a fitorremediação tornar-se efetiva, é necessário conhecer os padrões de absorção e os limites de tolerância de plantas com potencial, para se estabelecer em áreas contaminadas (Brown et al., 1995). Baker (1981) sugere que diferentes padrões de absorção de metais podem estar relacionados a diferentes mecanismos de tolerância em plantas ao excesso destes elementos. Algumas estratégias básicas estão relacionadas à tolerância das plantas aos metais: (a) a estratégia da “exclusão”, quando a concentração de metais pesados na parte aérea das plantas é mantida a um nível baixo constante, até que uma concentração crítica no solo seja alcançada, resultando em um transporte de metais sem restrições, ocasionando toxidez para a planta; (b) a estratégia da “acumulação”, quando os metais são continuamente concentrados nos tecidos das plantas, seja qual for a concentração destes no solo, implicando numa fisiologia altamente especializada (Baker, 1981). Em termos fisiológicos, os mecanismos de tolerância vegetal a metais pesados variam, desde ligações na parede celular e alterações da permeabilidade das membranas e exsudação de substâncias quelantes até produção de ligantes intercelulares, bombeamento de íons para vacúolos, complexação por ácidos orgânicos, precipitação por fosfatos e ligações metalo-proteína (Shaw, 1989; Barceló & Poschenrieder, 1992).

Nos processos de absorção, translocação e incorporação de metais nas células, verifica-se frequentemente a competição de metais pesados entre si e com outros elementos essenciais ou não. De acordo com Rosen et al. (1977), o excesso de Zn pode levar à deficiência de Fe e à redução da fotossíntese nas plantas. Além destes efeitos, a absorção excessiva de íons metálicos pode

bloquear a atividade de enzimas e, em casos severos, o metabolismo é paralisado e a planta morre (Baker, 1981).

Os metais solubilizados entram na raiz por meio de rotas apoplástica e simplástica (Salt, et al. 1995; MacFarlane & Burchett, 2000), sendo que, na rota simplástica, o metal, para ser absorvido por processos ativos, necessitando de ligação específica com carregadores ou através de canais (Taiz & Zeiger, 2004). Uma vez absorvidos, os metais podem ser imobilizados nas raízes ou translocados para a parte aérea. Segundo Salt et al. (1995), a translocação do metal para a parte aérea ocorre no xilema após o metal atravessar a Faixa de Caspary da endoderme via simplástico. Ácidos orgânicos complexados, como Cd-citrato e fitoquelatinas podem ter um papel importante no transporte do metal no xilema. Quando complexado, a taxa de translocação dos metais catiônicos como Zn, Cd e Cu no xilema é aumentada (Marschner, 1995). De modo geral, somente uma pequena parte desses elementos é translocada para parte aérea. De acordo com Miller et al. (1975), plantas de milho que cresceram em solo contendo 240 mg kg^{-1} de Pb acumularam 479 mg kg^{-1} desse metal na raiz e, somente 28 mg g^{-1} na parte aérea. Segundo esses autores, é comum encontrar conteúdos radiculares de Pb e Cu superiores a 90% do conteúdo total na planta.

Considerando a capacidade das plantas de absorver metais pesados em sua biomassa, pode-se utilizar estas para remover o contaminante do solo, processo este conhecido por fitoextração. Este processo surgiu a partir da descoberta de espécies endêmicas de solos ricos em metais pesados, as quais acumulam altas concentrações de metais em suas folhas (Vangronsveld & Cunningham, 1998). O ideal de uma planta para ser utilizada na fitoextração seria com as seguintes características: tolerar altas concentrações de metais; acumular altos níveis de metais em sua parte vegetativa; ter rápida taxa de crescimento; potencial para produção de biomassa; apresentar um sistema

radicular profundo e eficiente na absorção do poluente. Entretanto, a maioria das espécies acumuladoras é relativamente de tamanho reduzido, baixa taxa de crescimento, gerando uma carência de tecnologia para cultivo dessas em grande escala (Salt et al., 1995; Raskin et al., 1997). As gramíneas têm potencial para serem utilizadas em programas de recuperação de áreas contaminadas por metais pesados devido à relativa facilidade de se estabelecerem e assim promover uma rápida e densa cobertura do solo, melhorando a estrutura física do mesmo, atenuando processos erosivos e adicionando matéria orgânica (Carneiro et al., 2001). Na fitoextração, embora as gramíneas não sejam consideradas plantas hiperacumuladoras, essas são de grande interesse, devido a extensa produção de biomassa de modo a extrair quantidades consideráveis de metais pesados, além dessas espécies serem hospedeiras universais de FMAs.

2.3 Micorrizas na fitoextração de metais pesados

Os microrganismos que formam simbioses com as plantas, como os FMAs, têm uma função ecológica crucial nos diferentes estágios sucessionais, interferindo nas espécies individuais e nas habilidades competitivas destas (Siqueira et al., 1998). Esta simbiose, mediante efeitos diversos, nutricionais e não nutricionais, facilitam o crescimento vegetal, exercendo papel importante na revegetação de áreas degradadas (Miller & Jastrow, 1992), inclusive naquelas áreas que apresentam excesso de metais, onde as plantas micorrizadas são menos afetadas pela contaminação do que as sem micorrizas (Levy et al., 1997; Klauberg-Filho et al., 2002; Siqueira et al., 1999b).

Existem diversos estudos sobre a ocorrência dos FMAs e suas associações em solos contaminados com metais pesados, abordando abundância, diversidade, distribuição e funcionalidade dos FMAs nestas condições. Entretanto, ainda são pouco esclarecedores e mais concentrados em regiões temperadas (Klauberg-Filho et al., 2005). As micorrizas têm sido documentadas

em plantas crescendo em solos contaminados com metais pesados (Shetty et al, 1994; Chaudry et al., 1998, 1999; Klauberg-Filho, 2002). Gildon & Tinker (1983) observaram colonizações micorrízicas de 35% em raízes de trevo em solo altamente contaminado; o mesmo foi verificado por Grifföen et al. (1994) em *Agrostis capillaris*, que apresentou extensiva colonização em solo contaminado por Zn e Cd.

Os FMAs, ao se estabelecerem nas raízes, apresentam grande potencial para aumentar o crescimento e sobrevivência das plantas e, também, promover a agregação do solo (Corbett et al., 1996; Abbot & Gazey, 1994; Miller & Jastrow, 1992), facilitando a revegetação de áreas degradadas, com grande potencial de aplicação naquelas contaminadas com metais pesados. Os FMAs podem aumentar a área de absorção da raiz e estimular a aquisição de nutrientes pelas plantas, incluindo íons metálicos (Khan et al 2000), podendo esse aumento atingir até 47 vezes (Smith & Read, 1997). Recentemente tem havido grande interesse nos estudos dos efeitos das Mas sobre as plantas nos estresse de metais pesados. Em ampla revisão da literatura sobre a participação das micorrizas na proteção das plantas ao excesso de metais, Meharg (2003) destaca que a planta hospedeira e os fungos micorrízicos podem operar, independente ou em conjunto, os mesmos mecanismos de tolerância aos efeitos tóxicos dos metais, apresentando diferentes estratégias de proteção, como ações reguladoras da absorção e compartimentalização dos metais pesados em órgãos específicos.

Várias evidências sugerem que os microrganismos do solo possuem mecanismos capazes de alterar a mobilidade dos metais no ambiente com conseqüente efeito no potencial de absorção das raízes (Lasat, 2002). O efeito das associações micorrízicas sobre a absorção de metais pelas raízes não é muito claro e parece ser específica da planta e do metal (Lasat, 2002). As hifas dos FMAs são responsáveis por grande capacidade de absorção de metais pelas

raízes, contribuindo por até 37, 33, e 44% do Cd, Cu e Zn (Guo et al., 1996), respectivamente, absorvidos pelo feijoeiro.

Em altas concentrações de metal, alguns trabalhos mostram aumento na absorção de metais por plantas micorrizadas enquanto outros revelam concentração reduzida na parte aérea de plantas devido à colonização micorrízica (Leyval et al., 1997). Estudos recentes mostram que a inoculação com fungos micorrízicos promove benefícios para o crescimento do milho (Siqueira et al., 1999a) e espécies arbóreas tropicais (Siqueira et al., 1999b), sendo este comportamento relacionado com a menor concentração de metais na parte aérea das plantas. Resultados semelhantes foram obtidos para a *B. decumbens* em solo multicontaminado, mas o efeito protetor da micorriza contribuiu para aumentar a quantidade extraída do metal pela planta (Soares & Siqueira, 2006). Ao contrário destes resultados, tem-se verificado que as micorrizas podem aumentar a concentração de metais na planta. Gildon & Tinker (1983) observaram aumentos nas concentrações de Cu na biomassa das plantas de alho quando inoculadas com *G. mosseae*. Aumentos nos teores de Zn nas raízes e na parte aérea decorrentes da micorrização são também relatados por Shetty et al. (1994) em *Andropogon gerardii* e por Griffioen et al. (1994) em *Agrostis capillaris*.

Características biológicas das micorrizas, assim como a distribuição e quantidade de hifas internas, poderia ter uma forte influência sobre a eficiência da barreira micorrízica à translocação de Zn devido à complexação deste elemento com proteínas ligantes contendo cisteínas presentes nas estruturas dos FMAs (Christie et al., 2004). Turnau (1998) observou deposições de cristalóides em células corticais de plantas de *Euphorbia cyparissias* e ao redor das hifas, contendo alta concentração de Zn. Joner & Leyval (1997) estudaram a transferência de Cd pela hifa extraradicular de *Glomus mosseae* para raízes de *Trifolium subterraneum*, utilizando ¹⁰⁹Cd. Os resultados mostraram que, quando

somente a hifa extraradicular teve acesso ao compartimento com solo contaminado, a absorção de ^{109}Cd aumentou 55% em comparação a plantas não micorrizadas e que grande parte do Cd foi seqüestrado nas raízes.

Devido ao fato de maior retenção nas raízes, plantas micorrizadas podem apresentar alterações no transporte do metal dentro da planta, ocasionando uma menor translocação deste para a parte aérea (Christie et al., 2004). Carneiro et al. (2001), trabalhando com espécies herbáceas, observou que, em plantas inoculadas, a concentração de Cd nas raízes foi maior e cerca de três vezes superior em relação à parte aérea, evidenciando assim menor translocação desse metal em plantas com inoculação, como já mencionado em outros estudos (Leyval et al., 1997; Klauberg-Filho, 1999). Weissenhorn & Leyval (1995) e Joner & Leyval (1997) observaram que o Cd é absorvido do solo, porém seqüestrado na hifa de *Glomus mosseae* com subsequente restrição da transferência do metal do fungo para a raiz de plantas de trevo. Reduções na translocação de Zn da raiz para aérea na gramínea *Andropogon gerardii*, com a associação micorrízicas foram verificadas por Shetty et al. (1994). Enquanto Khan et al. (2000) observaram uma inibição na translocação de Zn para parte aérea em plântulas de milho micorrizadas.

Além dos benefícios proporcionados pelas associações com FMAs, protegendo as plantas dos danos causados pelos metais pesados e das estratégias de absorção utilizadas pelas plantas já mencionadas, também as diferenças estruturais e funcionais de membranas, a expressão diferencial de genes através de diferentes rotas bioquímicas e a compartimentalização específica, podem representar importantes fatores na tolerância a metais pesados (Shaw, 1989; Ali et al., 1999), contribuindo para aumentar a capacidade extratora de metais pesados pelas plantas.

2.4 Influência dos metais pesados em características anatômicas da planta

A absorção e acúmulo de metais pesados em concentrações elevadas pode ser citotóxica para muitas espécies de plantas, causando mudanças estruturais e ultraestruturais, afetando o crescimento e fisiologia das plantas (Barceló et al., 1988; Valquez et al., 1992; Han et al., 2004).

Alguns estudos têm mostrado alterações na arquitetura e estrutura de raiz induzida por uma variedade de condições estressantes, tais como salinidade e metais pesados (Reinhardt & Rost, 1995; Lux et al., 2004; Ederli et al., 2004; Sridhar et al., 2005), e também alterações nas barreiras apoplásticas (North & Nobel, 1995; Perumalla & Peterson, 1986).

Podem ocorrer reduções no tamanho dos vasos do xilema devido à contaminação e este fato pode estar relacionado com espessamentos causados por deposições de metais nas paredes dos vasos, afetando assim translocação de metais e água para a parte aérea (Sridhar et al., 2005). Mangabeira et al. (2005) também verificaram presença de Cr retido nos pontos de trocas das paredes dos vasos condutores e que esse fato estava relacionado com a menor translocação desse elemento para a parte aérea de plantas de *Lycopersicon esculentum*.

As raízes possuem barreiras fisiológicas às quais exercem papéis importantes para funções básicas e proteção contra estresses diversos (Enstone et al., 2003). Por exemplo, a epiderme da raiz estabelece uma barreira ao Pb e as estrias de Caspary é uma barreira efetiva ao movimento dos metais pesados em direção ao cilindro vascular. Este fato foi verificado por Chabbi (2002) que observou maiores concentrações de metais nas barreiras apoplásticas de raízes de *Juncus bulbosus*, reduzindo a concentração destes em regiões do parênquima cortical. De acordo com Schreiber et al. (1999), a suberina é o mais importante composto formando as barreiras apoplásticas. Esses autores observaram um aumento de três vezes no conteúdo de suberina nas estrias de Caspary em raízes

de *Zea mays* que receberam tratamento de Cd, sendo este fato interpretado como uma resposta das plantas para prevenir a translocação de Cd para a parte aérea.

A parede celular das raízes e folhas podem desempenhar um papel importante contra os efeitos adversos dos metais para a planta. Por exemplo, a parede celular tem elevada capacidade de reter Cd, devido à presença de cargas negativas, reduzindo assim a concentração deste metal no citossol (Lozano-Rodriguez et al., 1997; Ramos et al., 2002). Como o citossol é responsável por uma variedade de reações metabólicas e presença de enzimas, esta menor concentração de metais pesados pode contribuir para um menor efeito fitotóxico para a planta (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). É concebível também que mudanças na composição ou no arranjo molecular das membranas, o que previne a passagem passiva de íons, possam desempenhar algum papel na resistência a metais, embora existam poucas evidências que comprovem esta idéia (Verkleij & Shat, 1990).

As estrias de Caspary também podem ser formadas na exoderme, como uma reação à estresse ambiental (Reinhardt & Rost, 1995; Enstone & Peterson, 1998). As estrias de Caspary têm a função de bloquear a passagem livre de íons, incluindo metais pesados, do meio apoplástico do córtex para o cilindro vascular (Cholewa, 2000).

Diante das estratégias desenvolvidas pelas plantas a níveis metabólicos, fisiológicos e até estruturais, ainda há muita carência de estudos com o propósito de investigar os mecanismos que são utilizados quando ocorre a associação com FMAs, visto os inúmeros benefícios já relatados destes sobre o crescimento de espécies vegetais em condições estressantes.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, L.K.; GAZEY, C. An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. **Plant Soil**, v.159, p.69-78, 1994.

ALI, G.; SRIVASTAVA, P.S.; IQBAL, M. Morphogenic and biochemical responses of *Bacopa monniera* cultures to zinc toxicity. **Plant Science**, v.143, p.187-193, 1999.

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

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, Ch. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**, v.2, n.2, p.345-361, 1992.

BARCELÓ, J.; VAZQUÉZ, M. D.; POSCHENRIEDER, C. Cadmium induced structural and ultrastructural changes in the vascular system of bush bean stems. **Botany Acta**, v.101, p.254-261, 1988.

BROWN, S.L. et al. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.59, p.125-133, 1995.

BURKHARDT, C. et al. Impact of heavy metal on the degradative capabilities of soil bacterial communities. **Biology Fert. Soil**, v.19, p.154-156, 1993.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solos com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares.xx, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12, p.1443-1452, 2001.

CHABBI, A. Metal concentrations pore water of the lusitanian lignite mining sediments and internal metal distribution in *Juncus*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.3, p.105-117, 2002.

CHAUDRY, T.M.; HAYES, A.J.; KHOO, C.S. Phytoremediation focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soils. **Australian Journal Ecotoxicol.**, v.4, p.37-51, 1998.

CHAUDRY, T. M. et al. Colonization of iron and zinc-contaminated dumped filter cake waste by microbes, plants and associated mycorrhizae. In: WONG, M.H.; BAKER, A.J.M. (Ed.). **Remediation and management of degraded land**. Boca Raton, FL: CRC, 1999. p.25-283.

CHOLEWA, E. M. **Calcium transport and delivery to the xylem in onion (*Allium cepa* L.) roots**. 2000. Thesis (PhD Thesis)-University of Waterloo, Waterloo, Canada.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v.261, p.209-217, 2004.

CORBETT, E.A.; ANDERSON, R.C.; RODGERS, C.S. Prairie revegetation of strip mine in Illinois: fifteen years after establishment. **Rest. Ecology**, v.4, p.346-354, 1996.

CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, v.110, p.715-719, 1996.

DIAS JÚNIOR, H.E. et al. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.22, p.631-640, 1998.

EDERLI, L. et al. Responses induced by highy concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. **Physiologia Plantarum**, v.21, p.66-74, 2004.

ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A. Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. **Plant, Cell and Environment**, v.21, p.837-844, 1998.

ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: Struture, function, and responses to the environment. **Journal Plant Growth Regul.**, v.21, p.335-351, 2003.

GILDON, A.; TINKER, P.B. Interactions of vesicular-arbuscular infection and heavy metal in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytol**, v.95, p.247-261, 1983.

GRIFFIÖEN, W.A.J.; IETSWAART, J.H.; ERNST, W.H.O. Mycorrhizal infection of na *Agrostis capillaris* population on copper contaminated soil. **Plant Soil**, v.158, n.1, p.83-89, 1994.

GUO, Y.; GEORGE, E.; MARSCHNER, H. Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. **Plant Soil**, v.184, p.195-205, 1996.

HAN, F.X. et al. Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea* L. Czern. **New Phytol.**, v.162, p.489-499, 2004.

HASELWANDTER, K.; LEYVAL, C.; SANDERS, F.E. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on plant uptake of heavy metals and radionuclides from soil. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H. (Ed.). **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Germany, Birkhäuser Verlag: Advances in Life Sciences, 1994. p.179-189.

JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H. (Ed.). **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Germany, Birkhäuser Verlag: Advances in Life Sciences, 1994. p.101-116.

JONER, E.J.; LEYVAL, C. Uptake of ¹⁰⁹Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae* / *Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. **New Phytologist**, v.135, p.353-360, 1997.

KABATA PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton, CRC, 1984. 315p.

KHAN, A.G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, v.21, p.197-207, 2000.

KING, L. D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ, V.V.H.; FONTES, L.E.; FONTES, M.P.F. (Ed.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, MG: UFV/Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. p.823-836.

KLAUBER FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.125-134, 2002.

KLAUBER-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: UFV/Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p.85-144.

- LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal Environment Qual.**, v.31, p.109–120, 2002.
- LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, v.7, p.139-153, 1997.
- LOGAN, T.J. Reclamation of chemically degraded soils. **Advance Soil Science**, v.17, p.13-35, 1992.
- LOZANO-RODRÍGUEZ, E.; BONAY, P.; CARPENA-RUIZ, R.O. Districution of cadmium in shoot and root tissue of maize end pea plants: physiological disturbances. **Journal Exp. Botany**, v.48, p.123-128, 1997.
- LUX, A. et al. Differences in struture of adventitions roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.537-545, 2004.
- MACFARLANE, G.R.; BURCHETT, M.D. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Aguat. Botany**, v.68, p.45-59, 2000
- MANGABEIRA, P.A. et al. Chromium localization in plant tissues of *Lycopessicum esculentum* Mill using ICP-MS an ion microscopy (SIMS). **Applied Surface Science**, v. 252, n. 10, p. 3488-3501, 2006 xx, xx, xx, 2005.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic, 1995. 674p.
- McBRIDE, M.B. **Environmental chemistry of soil**. New York: Oxford University, 1994. 406p.
- MEHARG, A.A. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. **Mycol. Res.**, v.107, p.1253-1265, 2003.
- MILLER, J.E.; HASSET, J.J.; KOEPPE, D.E. The effect of soil lead sorption capacity on the uptake of lead in corn. **Comm. Soil Science Plant Anal.**, v.6, p.349-358, 1975.

- MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. The application of VA Mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In: ALLEN, M.F. (Ed.). **Mycorrhizal functioning**. Chapman and Hall, 1992. p.438-467.
- NORTH, G.R.; NOBEL, P.S. Hydraulic conductivity of concentric root tissues of *Agave deserti* Engelm. Under wet and drying conditions. **New Phytologist**, v.130, p.47-57, 1995.
- PERUMALHA, C.J.; PETERSON, C.A. Deposition of Caspary bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of Young corn and onion roots. **Canadian Journal of Botany**, v.64, p.1873-1878, 1986.
- RAMOS, I. et al. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. **Plant Science**, v.162, p.761-767, 2002.
- RASKIN, I.; SMITH, R.D.; SALT, D.E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Curr. Opin Biotechnol.**, v.18, n.2, p.221-285, 1997.
- REINHARDT, D.H.; ROST, T.L. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. **Environmental and Experimental Botany**, v.35, p.563-574, 1995.
- RIBEIRO-FILHO, M.R. et al. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.453-464, 1999.
- ROSEN, J.A.; PIKE, S.C.; GOLDEN, M.L. Zinc, iron, and chlorophyll metabolism in zinc-toxic corn. **Plant Physiology**, v.59, p.1085-1087, 1977.
- SALT, D.E. et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian mustard*. **Plant Physiology**, v.109, p.1427-1433, 1995.
- SANITÀ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.41, p.105-130, 1999.
- SCHREIBER, L. et al. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell wall. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.337, p.1267-1280, 1999.
- SHAW, A.J. **Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects**. New York: CRC, 1989. 355p.

SHETTY, K.G. et al. Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. **Environmental Pollution**, v.86, p.181–188, 1994.

SHRIDHAR, B.B.M. et al. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental of Experimental Botany**, v.54, p.131-141, 2005.

SINGH, B.R.; STEINNES, S. Soil and water contamination by heavy metals. In: LAR, R.; STEWART, B.A. (Ed.). **Soil processes and water quality**. Boca Raton: Lewis, 1994. p.233-271.

SIQUEIRA, J.O. et al. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.107, p. 241-252, 1998.

SIQUEIRA, J.O. et al. Efeito da formononetina (7 Hidroxi, 4' metoxi Isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.23, p.561-567, 1999a.

SIQUEIRA, J.O.; POUYÚ, E.; MOREIRA, F.M.S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.23, p.569-580, 1999b.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic, 1997. 589p.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Phosphate and mycorrhizas on protection of a tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Environmental Pollution**, 2006. No prelo.

SUSARLA, S.; MEDINA, V.F.; McCUTCHEON, S.C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, v.18, p.647-658, 2002.

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

TURNAU, K. Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in Southern Poland. **Acta Sov. Botany**, v.67, p.105-113, 1998.

VANGRONSVELD, J.; CUNNINGHAM, S.D. **Metal - contaminated soils**. New York: Springer, 1998. 265p.

VANGROSVELD, J.; COLPAERT, J.V.; TICHELEN, K.K. van. Reclamation of bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physico-chemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental Pollution**, v.94, p.131-140, 1996.

VÁZQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.H.; BARCELÓ, J. Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentration in bean roots. **New Phytologist**, v.120, p.215-226, 1992.

VERKLEIJ, J.A.C.; SCHAT, M.T. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: SHAW, A.J., ed. **Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects**. Boca Raton: CRC, 1990. p.179-193.

WEISSENHORN, I.; LEYVAL, C. Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. **Plant Soil**, v.175, p.233-238, 1995.

WONG, M.H. Ecological restoration of mine degraded soil, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, v.50, p.775-780, 2003

CAPÍTULO 2

**FUNGOS MICORRÍZICOS NO CRESCIMENTO E EXTRAÇÃO DE
METAIS PESADOS DE UM SOLO CONTAMINADO, PELA *Brachiaria*
decumbens STAPF.**

1 RESUMO

SILVA, Silvana. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados de um solo contaminado, pela *Brachiaria decumbens* Stapf In: _____. **Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados de um solo contaminado, pela *Brachiaria decumbens* Stapf.** 2006. Cap. 2, p.22-46. Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Avaliou-se em casa de vegetação a influência de 14 isolados de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento e extração de metais pesados pela *Brachiaria decumbens*, de solo multicontaminado. Plantas com e sem FMAs foram desenvolvidas em vasos com 0,92 kg de solo contendo (mg kg^{-1}): Zn=3.300; Cu=60; Cd=29; Pb=73. Os FMAs tiveram efeitos diferenciados no crescimento, aumentando, em média, a produção de matéria seca em 84%. Os teores de metais na planta foram elevados atingindo níveis tóxicos, apresentando relação inversa com a produção de matéria seca. Verificou-se que a inoculação não afetou os teores de Pb, mas reduziu os teores de Zn, Cd e Cu na parte aérea em 20, 28 e 63%, respectivamente, contribuindo assim, para amenizar a fitotoxidez dos metais. A micorriza aumentou os teores de Cu nas raízes em mais de 1.000%, fato não observado para os demais metais. Apesar dos efeitos negativos nos teores, a inoculação aumentou a quantidade de metais extraídos do solo em 845, 142, 68 e 54% para Cu, Pb, Zn e Cd, respectivamente. Os efeitos dos FMAs foram mais consistentes para o Cu e apenas *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA e *G. gigantea* foram capazes de aumentar a extração dos quatro metais avaliados. Ficou evidenciado que os FMAs aumentam a capacidade da *B. decumbens* de extrair metais contaminantes do solo.

¹ Orientador: José Oswaldo Siqueira – UFLA

2 ABSTRACT

SILVA, Silvana. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados de um solo contaminado, pela *Brachiaria decumbens* Stapf In: _____. **Mycorrhizal fungi on growth and heavy metal extraction from a contaminated soil, by *Brachiaria decumbens* Stapf.** 2006. Cap. 2, p.22-46. Thesis (Doctorate on Soil and Plant Nutrition) –Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.

The influence of 14 arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) on growth and extraction of heavy metal from a multi-contaminated soil was evaluated in a greenhouse experiment. Mycorrhizal and non-mycorrhizal plants were grown in pots with 0.92 kg of a soil containing (mg kg⁻¹): Zn=3,300; Cu=60; Cd=29; Pb=73. The AMF have differentiated effects on plant growth, but increased dry matter yield on average of 84% over non-inoculated controls. Shoot heavy metal concentrations were high, reaching toxic levels and inversely related to dry matter yield. Inoculation with AMF had no effect on Pb, but reduced shoot Zn, Cd and Cu concentrations by 20, 28 and 63%, respectively, and this contributed to alleviate metal phytotoxicity. It was found a consistent effect of mycorrhiza on Cu accumulation in roots (over 1,000%), but no effect on other metals. In spite of reductions of shoot metals, AMF inoculation enhanced the total amount of metal extracted from the soil by 845, 142, 68 and 54% for Cu, Pb, Zn and Cd, respectively. Mycorrhizal effects were more consistent for Cu and only *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA and *G. gigantea* enhanced the soil extraction of all four metals. It was evidenced that AMF increased the capacity of *B. decumbens* to extract contaminant heavy metals from soil.

¹ Adviser: José Oswaldo Siqueira – UFLA

3 INTRODUÇÃO

A capacidade das plantas de extrair elementos metálicos ou substâncias que contaminam o solo passou a se destacar a partir da descoberta de espécies endêmicas em solos contaminados, apresentando elevada capacidade de tolerar concentrações tóxicas destes materiais (Cunningham & Ow, 1996). A capacidade extratora e tolerância das plantas representam as bases de processos tecnológicos variados, conhecidos coletivamente por fitorremediação e se relaciona com diversas características como: capacidade de acumular altos níveis de metais nos tecidos; potencial para produção de biomassa; e sistema radicular profundo e eficiente na absorção do contaminante do solo (Lasat, 2002). No caso dos metais, as espécies acumuladoras teriam maior potencial fitoextrator, mas estas geralmente apresentam tamanho reduzido e baixa taxa de crescimento, limitando sua aplicação em larga escala (Raskin et al., 1997). Além da extração de metais biodisponíveis no solo, a introdução de plantas em área contaminada melhora o aporte de material orgânico e aumenta a quantidade de raízes que contribuem para melhorar a estrutura, atenuando processos erosivos e melhorando o habitat para os microrganismos do solo (Khan et al., 2000).

As gramíneas geralmente apresentam elevada diversidade, facilidade de semeadura, rápido crescimento e estabelecimento, garantindo a cobertura e proteção do solo e, por isso, destacam-se com potencial para revegetação de áreas contaminadas com metais pesados (Carneiro et al., 2001). Além destas vantagens, as gramíneas são ótimas hospedeiras para os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que exercem grande influência sobre estas plantas, constituindo-se importantes componentes bióticos do ecossistema (Smith & Read, 1997). Esses fungos, quando associados às raízes, formam as micorrizas que favorecem o crescimento, a nutrição e podem atenuar os efeitos adversos do

excesso de metais pesados sobre as plantas e tolerância destas aos contaminantes (Gaur & Adholeya, 2004). Esta associação amplia o potencial absorptivo do sistema radicular, facilitando a absorção de íons e de água do solo, podendo aumentar a capacidade extratora das plantas (Klauber-Filho et al., 2005) e a ação filtrante e purificadora do solo (Safir et al., 1991). Plantas micorrizadas produzem maior quantidade de massa vegetal, absorvem e acumulam mais metais que plantas sem micorrizas (Chen et al., 2003). Isto pode significar maior capacidade de extração e maior eficiência na remediação de solos contaminados. Estudos com este enfoque têm sido desenvolvidos em condições temperadas, mas são raros aqueles com espécies vegetais e fungos de ocorrência natural nos trópicos (Klauber-Filho et al., 2005).

Os FMAs têm ocorrência abundante em solos contaminados (Silva et al., 2005; Stürmer & Siqueira, 2006) e há evidências da contribuição destes para a tolerância de espécies hospedeiras tropicais, como encontrado por Soares & Siqueira (2006) que verificaram o aumento na tolerância da *B. decumbens* ao excesso de metais pesados devido à inoculação com FMAs. Trabalhando com outro enfoque, Carneiro et al. (2001) mostraram que a co-semeadura de gramíneas e crucíferas em solo contaminado e infestado com propágulos de FMAs, aumentou a extração de metais biodisponíveis, facilitando o estabelecimento posterior da gramínea. As plantas micorrizadas extraem maior quantidade de metais do solo do que as sem micorrizas, porém podem reter estes metais nas raízes, reduzindo a translocação para a parte aérea (Christie et al., 2004). Isto envolve vários mecanismos, como a produção, pelos FMAs, de glicoproteínas denominadas glomalinas que apresentam alta capacidade de reter metais. González-Chávez et al. (2002) verificaram que há um comportamento diferenciado da relação fungo-metal e isto pode explicar as variações dos efeitos dos FMAs quanto aos benefícios para a planta hospedeira em solos, com excesso de metais pesados (Orlowska et al., 2005). Conhecer os efeitos de diferentes

isolados de FMAs na capacidade extratora de metais das plantas tropicais reveste-se de grande importância acadêmica e tecnológica, quando se considera o potencial das micorrizas para melhorar a ação remediadora das plantas em solos contaminados. Este aspecto assume importância ainda maior diante do fato de que a contaminação do solo geralmente ocorre, simultaneamente, por mais de um metal, como se verifica em áreas que vêm sendo objeto de estudo do laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solos-UFLA nos últimos anos, visando ao desenvolvimento de estratégias de revegetação (Ribeiro-Filho et al., 1999; Klauberg-Filho, 1999; Carneiro et al., 2001). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes FMAs no crescimento e na capacidade da *Brachiaria decumbens* de extrair Cd, Zn, Pb e Cu de um solo multicontaminado com estes metais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período de 03/12/2003 a 30/04/2004 em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, MG, empregando uma mistura de um solo contaminado com diversos metais com outro sem contaminação. O solo contaminado foi coletado em área de deposição de rejeitos industrializados de zinco da Companhia Mineira de Metais S.A. – Três Marias (MG). A elevada contaminação impossibilita o crescimento da *Brachiaria decumbens* e dos FMAs e, por isso, este solo foi diluído com material de um Latossolo Vermelho-escuro sem contaminação com metais pesados. A mistura constou de 15% de solo contaminado (v/v), sendo esta proporção definida com base em estudos já realizados neste laboratório (Klauber-Filho, 1999). Foi adicionado ao solo não contaminado K_2HPO_4 para suprir as necessidades de P e K. Após a completa homogeneização, a mistura passou a denominar-se solo contaminado que apresentou os seguintes teores médios de metais (extração Mehlich-1), em $mg\ dm^{-3}$: Zn = 3.300; Cu = 60; Cd = 29; Pb = 73. O solo contaminado foi colocado em garrafas PET invertidas com capacidade de 0,92 kg, onde foram testados os tratamentos de inoculação. O experimento constituiu-se de um tratamento controle sem FMAs e 14 tratamentos de inoculação, dispostos no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições. Os isolados empregados são de diferentes origens e mantidos na coleção de FMAs da UFLA de onde foram obtidos para o presente experimento, conforme listados a seguir: *Scutellospora heterogama* (Nicol. & Gerdemann) Walker & Sanders (pastagem de braquiária), *Acaulospora spinosa* Walker & Trappe (gramíneas), *Acaulospora morrowiae*-UFLA Spain & Schenck (pimenta), *Gigaspora gigantea* (Nicol. & Gerdemann) Gerdemann & Trappe (braquiária), *Glomus clarum*-CMM Nicol &

Schenck (gramíneas em áreas contaminadas com metais pesados), *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann (cafeeiro), *Scutellospora gregaria* (Schenck & Nicol.) Walker & Sanders (algodão), *Acaulospora morrowiae*-CMM Spain & Schenck (gramíneas em áreas contaminadas com metais pesados), *Gigaspora margarita* Becker & Hall (milho), *Scutellospora pellucida* (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders (cerrado), *Acaulospora scrobiculata* Trappe (cafeeiro), *Gigaspora albida* Schenck & Smith (gramíneas em áreas contaminadas com metais pesados), *Glomus clarum*-UFLA Nicol & Schenck (braquiária), *Paraglomus occultum* Morton & Redecker (gramíneas). Para a inoculação, os fungos obtidos dos vasos de cultivo foram aplicados como solo-inóculo, aplicando-se cerca de 300 esporos por vaso no transplântio das plântulas. As sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf foram tratadas com H₂SO₄ concentrado por 1 minuto e seguidamente lavadas em água corrente, visando eliminar microrganismos contaminantes e facilitar a germinação, a qual foi realizada em bandejas plásticas contendo vermiculita. O transplântio para as garrafas PET foi realizado quando as plântulas atingiram aproximadamente 10 cm de altura, sendo colocada 3 plântulas por vaso. Os tratamentos sem inoculação receberam 50 mL de um filtrado de solo-inóculo ausente de propágulos de FMAs, visando equilibrar a microbiota nesses tratamentos. As plantas de braquiária foram mantidas em casa de vegetação, recebendo irrigação adequada e, durante a condução do experimento, foram realizadas adubações com nitrogênio (15 mg kg⁻¹ vaso⁻¹) na forma de NH₄NO₃ no transplântio das mudas e após o primeiro corte. Nos cortes realizados aos 70 e 147 dias, os vasos foram desmontados e a parte aérea cortada, lavada e colocada para secar em estufa de circulação forçada a 60 °C para posterior determinação do peso da matéria seca. Ao final do experimento (147 dias) as raízes foram coletadas do solo, lavadas e 1 g de raízes finas foi retirado e armazenado em FAA (Formalina-álcool-ácido acético) para posterior clarificação e coloração com

azul de tripano (Phillips & Hayman, 1970) e quantificação da taxa de colonização micorrízica (Giovannetti & Mosse 1980), sendo o restante das raízes destinado à determinação do peso da matéria seca. Após a determinação da matéria seca da parte aérea e raízes, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley e submetidas à digestão nítrico-perclórica para posterior análise das concentrações de Zn, Cu, Cd e Pb nos tecidos por espectrofotometria de absorção atômica. A quantidade acumulada na parte aérea e raízes das plantas foi calculada com base nas concentrações e produção de matéria seca em cada corte e a quantidade total extraída foi obtida pela soma do acúmulo na parte aérea nos dois cortes mais o acumulado nas raízes. Os resultados foram submetidos à análise de variância e testes de médias (Tukey 5%) por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000). Correlações de Pearson entre os teores de metais na planta e a produção de matéria seca para os dois cortes foram realizadas por meio do programa estatístico SAEG (teste t; $P \leq 0,05$). Foram retiradas algumas amostras de raízes para microanálises de Raio-x, e posterior observação em MEV (DSM 940), acoplado ao sistema de MAX:EDS-OXFORD INSTRUMENT Link ISIS, para a verificação dos metais presentes e sua localização em nível celular e nas estruturas fúngicas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Matéria seca e colonização micorrízica

Os efeitos dos tratamentos de inoculação micorrízica na produção de matéria seca da parte aérea da braquiária foram diferenciados tanto no primeiro quanto no segundo corte (Tabela 1). No primeiro corte, os fungos *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA, *G. clarum*-CMM, *G. etunicatum*, *S. pellucida* e *G. clarum*-UFLA promoveram aumento na produção de matéria seca em relação ao controle, chegando a dobrar nas plantas inoculadas com *G. clarum* isolado de área contaminada com metais pesados. Verifica-se que vários fungos não tiveram efeito significativo na matéria seca em relação ao controle. A produção de matéria seca da parte aérea das plantas não inoculadas sofreu grande redução no segundo corte, caindo de 4,1 para 1,7 g, ficando evidente o efeito negativo da exposição das plantas à contaminação do solo. Entretanto, a queda acentuada na produção matéria seca do primeiro para o segundo corte (-60%) não ocorreu com a mesma magnitude nas plantas inoculadas com alguns FMAs, evidenciando o efeito protetor destes à exposição das plantas ao excesso de metais no solo. No caso de *G. albida*, houve até mesmo um incremento de 40% no segundo corte em relação ao primeiro. A produção de matéria seca da parte aérea da *B. decumbens*, no segundo corte, foi favorecida pela inoculação com *S. heterogama*, *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA, *G. gigantea*, *G. etunicatum*, *S. pellucida*, *G. albida*, *G. clarum*-UFLA e *P. occultum*. A produção média de matéria seca obtida com estes isolados foi de 4,8 g, a qual é 182% superior à produção obtida nas plantas sem inoculação. A matéria seca de raízes só foi avaliada após o segundo corte, quando também se observou efeito significativo dos FMAs: *A. spinosa*, *A. morrowiae*-CMM e *G. albida* e tendências de aumentos observadas em quase todos os tratamentos de inoculação. Uma análise

conjunta para matéria seca total nos dois cortes mostra que a maioria dos tratamentos de inoculação teve efeito significativo (Figura 1). Plantas inoculadas com isolados eficientes (com efeito significativo) produziram, em média, 84% mais matéria seca que naquelas sem inoculação, sendo os maiores efeitos observados com *A. morrowiae*-UFLA e *A. spinosa*. Este efeito pode ter grande impacto no potencial de extração de metais do solo, compensando os baixos teores destes na planta (Ebbs et al., 1997). Apenas os fungos *S. gregaria*, *A. morrowiae*-CMM, *G. margarita* e *A. scrobiculata* não tiveram efeito na produção de matéria seca total.

A taxa de colonização micorrízica não foi muito elevada, porém diferiu entre os tratamentos (Tabela 1). Esta foi máxima para *S. pellucida* (27%) e mínima para *S. heterogama* e *A. spinosa* (9%). Algumas destas espécies têm apresentado elevada colonização radicular na *B. decumbens* em condições de elevada contaminação com metais pesados (Klauber-Filho, 1999), mas, em condições controladas, a colonização é geralmente ao redor de 20% em condições de solo com contaminação moderada (Soares & Siqueira, 2006).

TABELA 1 Matéria seca da parte aérea e de raízes e colonização micorrízica da *B. decumbens* não inoculada e inoculada com diferentes FMAs em solo contaminado com metais pesados.

Tratamentos	Matéria seca (g)			Colonização (%)
	1 ^o corte	2 ^o corte	Raiz	
1-Controle	4,09 ef	1,70 d	2,41 c	0 c
2- <i>S. heterogama</i>	4,73 c-f	4,54 abc	4,08 abc	9 bc
3- <i>A. spinosa</i>	6,67 a-d	4,96 ab	4,79 ab	9 bc
4- <i>A. morrowiae</i> -UFLA	6,87 abc	4,68 abc	4,95 a	19 ab
5- <i>G. gigantea</i>	5,84 b-e	5,57 a	4,46 abc	12 b
6- <i>G. clarum</i> -CMM	8,50 a	3,02 cd	3,25 abc	17 ab
7- <i>G. etunicatum</i>	6,57 a-d	4,32 abc	3,49 abc	20 ab
8- <i>S. gregaria</i>	4,40 def	3,18 bcd	3,57 abc	16 ab
9- <i>A. morrowiae</i> -CMM	3,61 ef	3,39 bcd	4,06 abc	17 ab
10- <i>G. margarita</i>	3,05 f	3,00 cd	3,59 abc	11 bc
11- <i>S. pellucida</i>	7,69 ab	4,04 abc	3,47 abc	27 a
12- <i>A. scrobiculata</i>	3,73 ef	1,93 d	2,70 bc	18 ab
13- <i>G. albida</i>	3,95 ef	5,52 a	4,64 ab	20 ab
14- <i>G. clarum</i> -UFLA	6,99 abc	4,69 abc	4,19 abc	17 ab
15- <i>P. occultum</i>	5,15 c-f	4,92 ab	4,57 abc	13 b

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste

Tukey a 5% de probabilidade

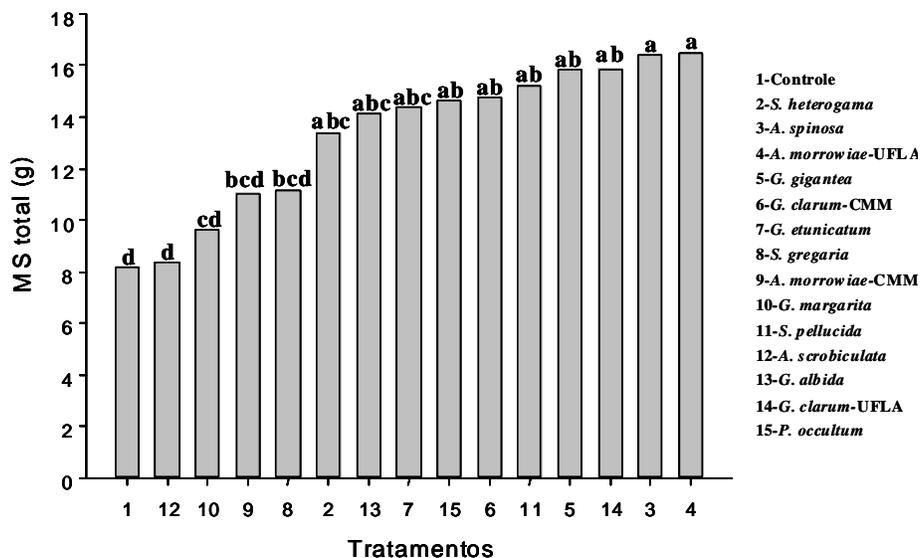


FIGURA 1 Matéria seca total de *B. decumbens* não inoculada e inoculada com diferentes FMAs. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Teores de metais pesados

Os teores de metais na planta variaram em função do corte, do metal, parte da planta e tratamentos (Tabela 2 e 3). As plantas inoculadas com *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA, *G. gigantea*, *G. clarum*-CMM e *G. clarum*-UFLA apresentaram, no primeiro corte, teor médio de Zn na parte aérea de 1.200 mg kg⁻¹, sendo este 20% menor do que os teores encontrados nas plantas não inoculadas. Entretanto, não houve efeito significativo dos tratamentos nos teores deste elemento na parte aérea do segundo corte e na matéria seca de raízes. Para o Cd, observou-se que a inoculação com *G. gigantea*, *G. clarum*-CMM e *G. clarum*-UFLA resultou em menores teores na parte aérea no primeiro corte, apresentando teor médio de 39 mg kg⁻¹, contra 54 mg kg⁻¹ de Cd no controle, uma redução de 28%. No segundo corte, várias espécies: *A. spinosa*, *A.*

morrowiae-UFLA, *G. etunicatum*, *S. gregaria*, *G. albida* e *G. clarum*-UFLA, reduziram a concentração desse metal na planta. Os teores de Cd nas raízes foram reduzidos em alguns tratamentos: *G. gigantea*, *G. clarum*-CMM, *G. albida* e *P. occultum*. As plantas não inoculadas (controle) apresentaram teores médios na matéria seca da parte aérea de 1.511 e 53 mg kg⁻¹ de Zn e Cd, respectivamente, os quais se encontram acima do nível considerado tóxico por Kabata-Pendias & Pendias (2001) (Zn = 100 a 400 mg kg⁻¹; Cd = 5 a 30 mg kg⁻¹). Apesar de a inoculação de alguns FMAs reduzir os teores de Zn e Cd na parte aérea da *B. decumbens*, estes ainda encontram-se muito elevados e acima da faixa considerada tóxica para várias espécies (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Os efeitos dos FMAs na redução da concentração de Zn e Cd na parte aérea das plantas têm sido relatados em diversos estudos (Schüepp et al., 1987; Weissenhorn & Leyval, 1995; Leyval et al., 1997), inclusive com esta espécie (Soares & Siqueira, 2006). Estes efeitos podem resultar de vários mecanismos como: efeito de diluição decorrente do favorecimento do crescimento da planta (Christie et al., 2004); exclusão da absorção por meio da precipitação ou quelação dos metais na rizosfera (Kaldorf et al., 1999); redução da absorção devido à retenção e imobilização dos metais nas estruturas fúngicas (Khan et al., 2000; Zhu et al., 2001; González-Chávez et al., 2004) com conseqüente redução da transferência dos metais das raízes para a parte aérea (Joner et al., 2000; Christie et al., 2004). Embora a concentração de metais, nas raízes, tenha sido bastante variada, não foi possível detectar os metais através da microanálise de raio-X.

Os efeitos observados para o Cu foram bastante consistentes, em termos de redução dos teores na parte aérea (Tabela 3), havendo efeito significativo no primeiro corte em plantas inoculadas com os seguintes fungos: *A. morrowiae*-UFLA, *G. gigantea*, *G. clarum*-CMM, *G. etunicatum*, *S. gregaria*, *G. margarita*, *G. clarum*-UFLA e *P. occultum*, havendo uma redução média de 63% em

relação ao controle sem inoculação. Já no segundo corte, isto ocorreu apenas para *G. albida* e *P. occultum*. Os teores de Cu nas raízes aumentaram substancialmente na maioria dos tratamentos, elevando-se de 21 mg kg⁻¹ no tratamento sem inoculação para um valor médio de 300 mg kg⁻¹ nos tratamentos com efeito significativo, correspondendo a um aumento de 1.329%. A acumulação de concentrações elevadas de Cu nas raízes micorrizadas tem sido observada em outros estudos e, como demonstrado por González-Chávez et al. (2004), isto se deve à produção de glomalina nas hifas de FMAs. Segundo estes autores, glomalinas podem reter de 2 a 3 mg Cu g⁻¹ de proteína. A concentração de Pb na *B. decumbens* foi baixa e pouco influenciada pela inoculação. Houve acréscimos nos tratamentos com *S. heterogama* e *A. morrowiae*-UFLA no primeiro corte e nenhum efeito no segundo corte e nas raízes. Todos os tratamentos apresentaram concentração de Pb na parte aérea abaixo do nível crítico de 30 a 300 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias & Pendias, 2001), indicando a baixa disponibilidade deste metal no solo e a ausência de ação tóxica deste elemento para a braquiária.

TABELA 2 Teores de Zn e Cd na matéria seca da parte aérea e raízes da *B. decumbens*, não inoculada e inoculada com diferentes FMAs.

Tratamentos	Teor de metais na <i>B. decumbens</i> (mg kg ⁻¹)					
	Zn			Cd		
	1 ^o corte	2 ^o corte	Raiz	1 ^o corte	2 ^o corte	Raiz
1-Controle	1501 abc	1521 a	1585 a	54 abc	51a	63 a
2- <i>S. heterogama</i>	1315 c-g	1336 a	1477 a	50 a-d	38 ab	55 a-e
3- <i>A. spinosa</i>	1255 d-g	1259 a	1323 a	45 cde	36 b	51 a-e
4- <i>A. morrowiae</i> -UFLA	1207 efg	1331 a	1517 a	45 c-f	31 b	51 a-e
5- <i>G. gigantea</i>	1234 d-g	1305 a	1416 a	44 def	41 ab	43 e
6- <i>G. clarum</i> -CMM	1164 fg	1541 a	1375 a	36 f	42 ab	50 b-e
7- <i>G. etunicatum</i>	1412 a-e	1286 a	1475 a	47 bcd	35 b	51 a-e
8- <i>S. gregaria</i>	1453 a-d	1363 a	1270 a	55 ab	37 b	53 a-e
9- <i>A. morrowiae</i> -CMM	1348 b-g	1369 a	1862 a	54 abc	44 ab	59 abc
10- <i>G. margarita</i>	1558 ab	1381 a	1846 a	57 a	41 ab	56 a-d
11- <i>S. pellucida</i>	1364 b-f	1492 a	1732 a	45 cde	43 ab	56 a-d
12- <i>A. scrobiculata</i>	1551 ab	1497 a	1491 a	53 a-d	42 ab	61 ab
13- <i>G. albida</i>	1510 abc	1258 a	1219 a	46 b-e	32 b	44 de
14- <i>G. clarum</i> -UFLA	1140 g	1304 a	1543 a	37ef	34 b	52 a-e
15- <i>P. occultum</i>	1619 a	1437 a	1441 a	55ab	39 ab	47 cde

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste

Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 3 Teores de Cu e Pb na matéria seca da parte aérea e raízes da *B. decumbens*, não inoculada e inoculada com diferentes FMAs.

Tratamentos	Teor de metais na <i>B. decumbens</i> (mg kg ⁻¹)					
	Cu			Pb		
	1 ^o corte	2 ^o corte	Raiz	1 ^o corte	2 ^o corte	Raiz
1-Controle	20,2 bc	7,0 abc	21 bc	5,3 c-f	5,0 a	29 abc
2- <i>S. heterogama</i>	24,0 ab	7,0 abc	292 a	9,0 ab	5,8 a	38 ab
3- <i>A. spinosa</i>	25,4 ab	5,9 a-d	235 ab	8,6 abc	5,8 a	38 ab
4- <i>A. morrowiae</i> -UFLA	7,4 d	5,7 cd	258 a	9,1 a	4,8 a	48 a
5- <i>G. gigantea</i>	7,4 d	6,0 a-d	324 a	5,7 b-e	6,0 a	39 ab
6- <i>G. clarum</i> -CMM	7,5 d	6,3 a-d	280 a	5,8 a-e	5,4 a	17 c
7- <i>G. etunicatum</i>	7,8 d	6,3 a-d	258 a	4,6 def	5,3 a	45 a
8- <i>S. gregaria</i>	7,1 d	5,8 bcd	195 abc	3,4 ef	5,5 a	28 abc
9- <i>A. morrowiae</i> -CMM	22,0 abc	5,8 a-d	287 a	5,7 b-e	6,0 a	45 a
10- <i>G. margarita</i>	8,1 d	6,0 a-d	404 a	3,3 ef	5,0 a	31 abc
11- <i>S. pellucida</i>	26,4 a	6,1 a-d	296 a	5,3 c-f	4,6 a	41 ab
12- <i>A. scrobiculata</i>	23,4 abc	7,2 ab	23 bc	4,9 def	4,5 a	29 abc
13- <i>G. albida</i>	17,5 c	5,5 d	18 bc	3,8 ef	4,0 a	24 bc
14- <i>G. clarum</i> -UFLA	7,2 d	7,4 a	307 a	7,6 a-d	5,4 a	41 ab
15- <i>P. occultum</i>	7,6 d	5,5 d	7 c	2,1 f	4,4 a	39 ab

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste

Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados mostram que apesar de ter havido decréscimo acentuado na produção de matéria seca na parte aérea no segundo corte (Tabela 1), a concentração média de Zn, Cd e Pb na planta não diferiu muito entre os cortes (primeiro corte: Zn=1.375; Cd=48; Pb=5,6 mg kg⁻¹; segundo corte: Zn=1.379; Cd=39; Pb=5,2 mg kg⁻¹). Enquanto isso, houve grande diminuição nos teores de Cu de 14,6 para 6,2 mg kg⁻¹ do primeiro para o segundo corte, correspondendo a

58% de redução. Isto ocorreu devido principalmente à elevada capacidade de retenção desse elemento nas raízes, como já comentado. Verificou-se uma relação inversa entre os teores de Cd e Zn e a produção de matéria seca da planta. A matéria seca da parte aérea no primeiro corte foi reduzida linearmente com os teores de Cd na planta ($y = 15,86 - 0,2155x$; $r = -0,84$; $P \leq 0,01$) e de Zn ($y = 16,26 - 0,00785x$; $r = -0,72$; $P \leq 0,01$), sendo x a concentração de metal em mg kg^{-1} matéria seca vegetal. Para o segundo corte, comportamento semelhante foi observado de acordo com as equações: $y = 10,43 - 0,1652x$; $r = -0,70$; $P \leq 0,01$ (Cd) e $y = 16,77 - 0,00928x$; $r = -0,74$; $P \leq 0,01$ (Zn). Para Cu e Pb não foi verificada relação significativa entre os teores na parte aérea e a matéria seca, devido à baixa concentração destes em relação ao Cd e Zn no solo. Estes resultados evidenciam a sensibilidade da *B. decumbens* ao excesso de metais no solo, o que resulta em aumento na concentração de Cd e Zn na parte aérea, atingindo concentrações tóxicas para a planta. Estes resultados corroboram os de outro estudo com esta espécie em solo multicontaminado com Zn, Cd, Cu e Pb (Soares & Siqueira, 2006).

Quantidades extraídas de metais

A quantidade total de metais acumulada na planta e a respectiva distribuição nas raízes são apresentadas na Figura 2. Verifica-se que os FMAs influenciaram a extração dos quatro metais estudados, porém este efeito é diferenciado quanto aos fungos e metal. Dentre os FMAs estudados, apenas *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA e *G. gigantea* aumentaram a extração dos quatro metais, indicando uma adaptação destas espécies a concentrações elevadas destes metais. *G. gigantea* tem sido encontrada em solos multicontaminados da Índia (Sambandan et al., 1992; Raman et al., 1993), enquanto *A. morrowiae* é freqüente em solos contaminados por Zn, Cd, Cu e Pb em Minas Gerais (Klauber-Filho et al., 2002). Outros isolados apresentaram baixa capacidade de

favorecer a acumulação de metais na planta. Isto resulta do reduzido efeito na produção de matéria seca, como no caso da *A. scrobiculata*, ou do efeito na redução na absorção dos metais, resultando em baixa concentração, como verificado para *G. albida* (Tabela 2 e 3). A maior frequência de isolados, com efeito significativo no acúmulo de metal, foi observada para o Cu (dez isolados), acumulando em média $1.380 \mu\text{g vaso}^{-1}$, enquanto no controle, o acúmulo atingiu apenas $146 \mu\text{g vaso}^{-1}$, portanto, um acréscimo de 845% devido à inoculação, indicando o elevado potencial dos FMAs para a extração de Cu do solo. Este resultado é coerente com a elevada ocorrência dos FMAs em áreas contaminadas com este metal (Silva et al., 2005).

As quantidades acumuladas dos outros metais (Cd, Zn e Pb) na planta também foram influenciadas pelos FMAs, mas a frequência e consistência dos resultados foram inferiores ao verificado para o Cu. Apenas *G. gigantea*, *P. occultum*, *A. morrowiae*-UFLA, *S. pellucida* e *A. spinosa* apresentaram efeito significativo sobre a quantidade acumulada de Cd na planta com média de $700 \mu\text{g vaso}^{-1}$, enquanto no controle este foi de $456 \mu\text{g vaso}^{-1}$, representando um ganho de 54%. Além desses fungos, *G. etunicatum* e *G. clarum* UFLA também contribuíram para incrementar a quantidade acumulada de Zn na planta, a qual aumentou de $12.616 \mu\text{g vaso}^{-1}$ (controle) para em média $21.173 \mu\text{g vaso}^{-1}$, representando um ganho de 68% devido à inoculação. Os fungos *S. heterogama*, *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA, *G. gigantea*, *A. morrowiae*-CMM e *G. clarum* UFLA aumentaram a quantidade total acumulada de Pb na planta, apresentando em média de $252 \mu\text{g vaso}^{-1}$, enquanto no controle esta foi de apenas $104 \mu\text{g vaso}^{-1}$, representando um ganho de 142% devido à inoculação.

A quantidade de metal acumulada na parte aérea em relação às raízes difere de modo acentuado para os diferentes metais e FMAs. Baseando-se nos dados da Figura 2, observa-se que as raízes da *B. decumbens* inoculadas com FMAs eficientes acumularam em média 31%, 30% e 72% do Cd, Zn e Pb,

respectivamente, com pouca influência da inoculação. Enquanto isso, a proporção de Cu nas raízes aumentou de 35% no controle (sem inoculação) para, em média, 91% nas plantas com FMAs eficientes, corroborando com a elevada afinidade entre os FMAs e este metal (González-Chávez et al., 2004). Portanto, *B. decumbens* quando micorrizada apresenta elevada capacidade de reter este metal nas raízes. Para *G. margarita*, por exemplo, a razão do acúmulo de Cu entre raízes e parte aérea é de 32, enquanto no controle (sem inoculação) esta é de apenas 0,53.

Baseando nas quantidades totais extraídas pela *B. decumbens* em relação à quantidade de metais presentes no solo, têm-se valores de eficiência de extração da ordem de 2,5% para Cu e Cd e inferior a 1% para Zn e Pb para plantas inoculadas, enquanto que, para o controle sem inoculação, os valores foram inferiores a 0,30% para Cu, Zn e Pb e de 1,70% para o Cd. Embora a eficiência de extração pareça baixa, esta se encontra na faixa estimada por outros autores (Ebbs et al., 1997). Uma extrapolação dos resultados do presente estudo indica que a quantidade de metal extraída pela *B. decumbens*, inoculada com FMAs selecionados, atinge valores médios de: 46 kg de Zn; 3,0 kg de Cu; 1,5 kg de Cd e 0,6 kg de Pb por hectare, enquanto que, nas plantas não inoculadas, estes são de apenas 27 kg de Zn; 0,3 kg de Cu; 1,0 kg de Cd e 0,2 kg de Pb por hectare. Ficam evidentes os benefícios das micorrizas para a fitoextração pela *B. decumbens* e, considerando seu potencial de crescimento e de ser hospedeira universal dos FMAs, torna esta gramínea promissora em programas de fitorremediação de áreas contaminadas com metais pesados.

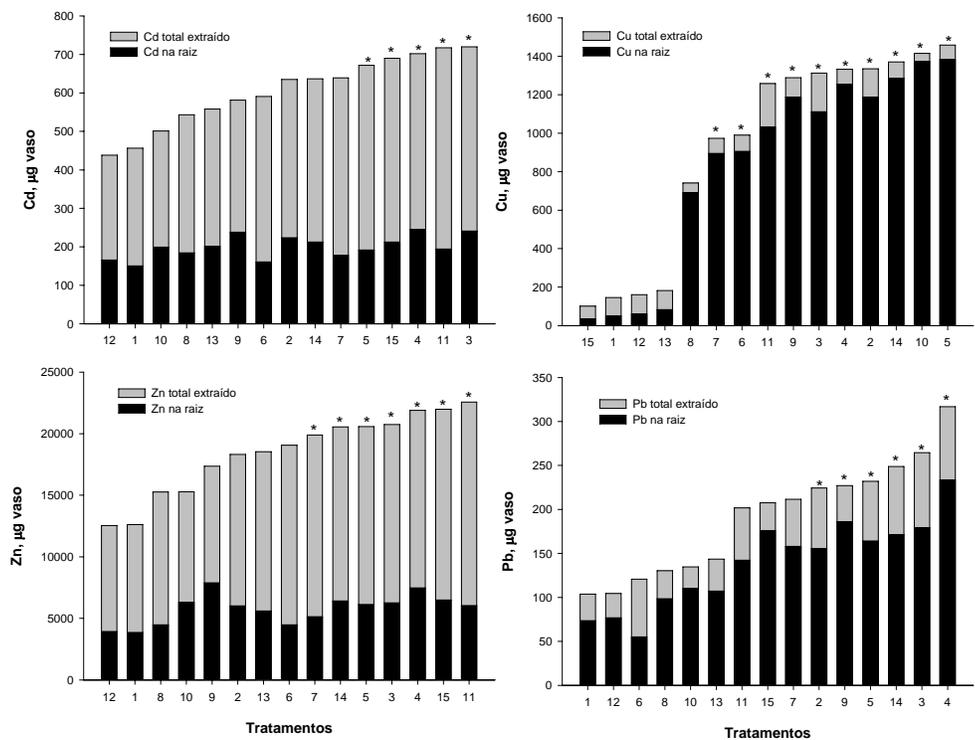


FIGURA 2 Acúmulo total de Cd, Zn, Cu e Pb nas plantas de *B. decumbens* nos diferentes tratamentos. 1-Controle, 2-*S. heterogama*, 3-*A. spinosa*, 4-*A. morrowiae*-UFLA, 5-*G. gigantea*, 6-*G. clarum*-CMM, 7-*G. etunicatum*, 8-*S. gregaria*, 9-*A. morrowiae*-CMM, 10-*G. margarita*, 11-*S. pellucida*, 12-*A. scrobiculata*, 13-*G. albida*, 14-*G. clarum*-UFLA, 15-*P. occultum* (* indica tratamentos diferentes estatisticamente do controle pelo teste Tukey, 5%).

6 CONCLUSÕES

A redução nos teores de metais, causada pela micorriza, ameniza a toxidez dos metais para a *B. decumbens*, favorecendo a produção de matéria seca e, como conseqüência, a maior extração de metais do solo;

Os fungos têm efeito diferenciado na extração dos metais, sendo que apenas *A. spinosa*, *A. morrowiae*-UFLA e *G. gigantea* são capazes de aumentar a extração dos quatro metais avaliados;

A ação fitorremediadora da *B. decumbens* para solo multicontaminado seria melhorada por meio da inoculação múltipla com espécies selecionadas;

Dos quatro metais contaminantes, verifica-se efeito mais consistente dos isolados e freqüente para o Cu, cuja retenção nas raízes é favorecida pela micorriza.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solos com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1443-1452, 2001.

CHEN, B.D. et al. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. **Chemosphere**, v.50, p.839-846, 2003.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v.261, p.209-217, 2004.

CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, v.110, p.715-719, 1996.

EBBS, S.D. et al. Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v.26, p.1424-1430, 1997.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.235.

GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **Current Science**, v.86, p.528-534, 2004.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. **New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, C. et al. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**, v.240, p.287-297, 2002.

JONER, E.J.; BRIONES, R.; LEYVAL, C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. **Plant and Soil**, v.226, p.227-234, 2000.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC, 2001. 413p.

KALDORF, M. et al. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal of Plant Physiology**, v.154, p.718-728, 1999.

KHAN, A.G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, v.21, p.197-207, 2000.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: UFV/Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p.85-144.

KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.125-134, 2002.

KLAUBERG-FILHO, O. **Ecologia e atividade de fungos micorrízicos arbusculares em solo poluído com metais pesados**. 1999. 161p. Tese (Doutorado)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.109-120, 2002.

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

ORLOWSKA, E. et al. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonization of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. **Geoderma**, v.129, p.92-98, 2005.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v.55, p.158-160, 1970.

RAMAN, N. et al. Mycorrhizal status of plant species colonizing a magnesite mine spoil in India. **Biology and Fertility of Soils**, v.16, p.76-78, 1993.

- RASKIN, I. SMITH, R.D.; SALT, D.E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p.221–285, 1997.
- RIBEIRO-FILHO, M.R. et al. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.453-464, 1999.
- SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O.; BURTON, T.M. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in a wastewater-irrigated oldfield ecosystem in Michigan. **Plant and Soil**, v.121, p.187-196, 1990.
- SAMBANDAN, K.; KANNAN, K.; RAMAN, N. Distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal polluted soils of Tamil Nadu, India. **Journal of Environmental Biology**, v.13, p.159-157, 1992.
- SCHÜEPP, H.; DEHN, B.; STICHER, H. Interaktionen zwischen VS-Mykorrhizen und schwermetallbelastungen. In *Mycorrhiza and plant stress*. **Angewandte Botanik**, v.61, p.85-95, 1987.
- SILVA, G.A. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. **Mycorrhiza**, v.15, p.46-53, 2005.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic, 1997. 589p.
- SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Phosphate and mycorrhizas on protection of a tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Environmental Pollution**, 2006. (No prelo)
- STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity an Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI, 2006. Cap. 10.
- WEISSENHORN, I.; LEYVAL, C. Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. **Plant and Soil**, v.175, p. 233-238, 1995.
- ZHU, Y.G.; CHRISTIE, P.; LAIDLAW, A.S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere**, v.42, p.193-199, 2001.

CAPÍTULO 3

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO CRESCIMENTO, EXTRAÇÃO DE METAIS E CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DE *Brachiaria decumbens* STAPF EM SOLO CONTAMINADO COM METAIS PESADOS

1 RESUMO

SILVA, Silvana. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados de um solo contaminado, pela *Brachiaria decumbens* Stapf In: _____. **Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento, extração de metais e características anatômicas de *Brachiaria decumbens* Stapf em solo contaminado com metais pesados.** 2006. Cap. 3, p.47-82. Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos da contaminação do solo por metais pesados e da inoculação com FMAs no crescimento, absorção de metais e algumas características anatômicas da *Brachiaria decumbens*. Avaliou-se em casa de vegetação a influência de 4 isolados de fungos micorrízicos arbusculares (*A. scrobiculata*, *S. pellucida*, *A. morrowiae* e *G. margarita*) no crescimento, extração de metais pesados e características anatômicas da *B. decumbens*. Plantas com e sem FMAs foram crescidas em vasos plásticos com 0,92 kg de solo não contaminado (controle) e uma mistura contendo (15% de solo contaminado). A contaminação afetou negativamente o crescimento da *B. decumbens*, sendo isto relacionado com o aumento da absorção de metais pelas plantas, sendo que o isolado o *S. pellucida* teve efeito amenizante da toxidez de metais e apresentou significativa retenção destes nas raízes. Esse fungo aumentou em 420, 445, 433 e 95% a matéria seca da parte aérea, da raiz, total e número de perfilhos, em relação às plantas não inoculadas. A contaminação causou alterações na anatomia foliar da *B. decumbens*, ocasionando redução no tamanho dos vasos e no número de células do parênquima, não sendo observada em plantas inoculadas com *S. pellucida* e *A. morrowiae*, indicando a proteção destas espécies. Os tecidos radiculares foram também alterados pelos tratamentos. De maneira geral, a contaminação do solo reduziu a espessura e a área proporcional do córtex e do cilindro e causou um aumento na epiderme, exoderme e parênquima lignificado. Como as alterações observadas são determinantes da translocação dos elementos na planta e foram mais evidentes nas plantas colonizadas pelos fungos eficientes, supõe-se que estas estejam envolvidas no mecanismos de proteção da *B. decumbens* induzido pelos FMAs.

¹ Orientador: José Oswaldo Siqueira – UFLA

2 ABSTRACT

SILVA, Silvana. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados de um solo contaminado, pela *Brachiaria decumbens* Stapf In: _____. **Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, metal extraction and anatomical characteristics of brachiaria decumbens in a soil contaminatede by heavy metals.** 2006. Cap. 3, p.47-82. Thesis (Doctorate on Soil and Plant Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.

In the present study the effects of soil contaminated by heavy metal and inoculation with mycorrhizal fungi on growth, metal uptake and some anatomical characteristics of *Brachiaria decumbens* were investigated. Four selected isolates of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were evaluated under greenhouse conditions in plastic pots with 0,92 kg of o soil mix containing 15% of a highly contaminated soil and 85% of a non-contaminated one. Soil contamination inhibited the growth of *Brachiaria decumbens* being such inhibition related to increased metal uptake by plants. *S. pellucida* exhibited an ameliorated effect on *Brachiaria decumbens*. Is has a growth increment of 420, 445, 433 and 95% over dry matter of shoots, roots, total and plant sprouts as compared to non-inoculated controls. Contamination caused significant modification in anatomy of foliar tissue of *Brachiaria decumbens*, reducing size of vessels and the number of parenchyma cells. However such adverse effects were not found in plants inoculated by *S. pellucida* and *A. morrowiae*. Therefore indicating a protecting activity of there isolates to *Brachiaria decumbens*. Root tissues were also affected by these treatments. In general, soil contamination reduced cortex width and cortical and cylinder areas. Is also caused an increase in the epidermis, exodermis and lignified parenchyma. Considering these modification influence elemental translocation in the plant and were quite evident in plant colonized by efficient fungi, it is resemble to suggest that these modifications are involved in AMF induced protection mechanisms in *Brachiaria decumbens*.

¹ Adviser: José Oswaldo Siqueira – UFLA

3 INTRODUÇÃO

Ao longo do processo de evolução, as plantas desenvolveram uma variedade de mecanismos para reagir a mudanças ambientais, destacando-se adaptações anatômicas e fisiológicas para o crescimento e sobrevivência em condições desfavoráveis, como em solos com excesso de metais pesados. No caso de estresse de solo, o sistema radicular é particularmente afetado devido ser a parte da planta em contato direto com o contaminante (Degenhardt & Gimmler, 2000). Por ser um órgão de absorção de água e de íons da solução do solo, as alterações induzidas na estrutura da raiz podem interferir na absorção de água, nutrientes e fatores tóxicos. É conhecido que as partes jovens do sistema radicular são ativas em absorver íons, sendo o ápice da raiz considerada a principal zona de absorção (Glass, 2002). Alguns estudos têm mostrado alterações na arquitetura e estrutura de raiz induzida por uma variedade de condições estressantes, tais como salinidade e metais pesados (Reinhardt & Rost, 1995; Lux et al., 2004; Ederli et al., 2004; Sridhar et al., 2005), e também alterações nas barreiras apoplásticas (North & Nobel, 1995; Perumalla & Peterson, 1986). Decréscimo no diâmetro de raízes e na área das células do córtex foi observado em plantas de trigo sob estresses de excesso de metais pesados (Setia & Bala, 1994). O movimento do metal da solução do solo para o apoplasto da raiz é um processo passivo, não metabólico e caracterizado por fluxo de massa ou difusão, resultado de um gradiente de concentração (Taiz & Zeiger, 2004). Os metais podem ficar retidos nos poros da rede de celulose da parede celular e, dependendo da densidade de cargas negativas, estes podem ser concentrados e transportados para o interior da célula por meio de gradiente de concentração (Taiz & Zeiger, 2004). Contudo, ainda não está perfeitamente definido o mecanismo pelo qual os elementos tóxicos atravessam a membrana

plasmática, sendo os diferentes canais de íons considerados como hipóteses. De acordo com Greger (1999), o canal de Ca^{2+} pode ser uma importante via de absorção celular para Cd^{2+} .

Existem vários fatores que interferem nos mecanismos de absorção dos elementos químicos pelas plantas (Prasad, 1995), conferindo a estas alguma tolerância, destacando-se: (i) fixação do íon na parede celular, (ii) redução do seu transporte através da membrana, (iii) efluxo ativo, (iv) compartimentalização e (v) complexação com fitoquelatinas. Quando os metais atingem concentração críticas (de toxidez) nas plantas, podem causar alterações na estrutura interna e na morfologia das raízes, ocasionando redução do seu alongamento, danos nas suas extremidades, redução do número de raízes absorventes e raízes laterais, redução na biomassa radicular, aumento da suberização e lignificação, redução no diâmetro dos vasos e alterações estruturais da hipoderme e endoderme (Barceló & Poschenrieder, 1999). Entretanto, estes aspectos têm sido muito pouco estudados.

Enstone et al., (2003) consideram que as raízes possuem barreiras fisiológicas que exercem papéis importantes, além das funções básicas, como proteção contra estresses diversos. Essas barreiras localizam-se na endoderme e exoderme que são camadas especializadas, com células, apresentando estrias de Caspary, podendo desenvolver lamelas de suberina e paredes terciárias. Barrowclough & Peterson (1994) verificaram que a formação dessas barreiras depende das condições de crescimento. No entanto, há controvérsia quanto à significância da exoderme para a absorção de água e íons (Ferguson & Clarkson, 1976; Clarkson et al., 1987) e, aparentemente, depende do elemento em questão, sua carga iônica e do mecanismo de entrada no apoplasto (Enstone & Peterson, 1992). Íons carregados positivamente concentram-se no Espaço Livre Donnan devido à atração por cargas negativas presentes nas paredes celulares (Sattelmacher, 2001).

Os metais pesados solúveis entram na raiz via rotas apoplástica e simplástica (Salt, et al. 1995; MacFarlane & Burchett, 2000), sendo que, na rota simplástica (absorção ativa), o metal para ser absorvido necessita de ligação específica com carregadores ou através de canais (Taiz & Zeiger, 2004). Os metais são também facilmente absorvidos pelas micorrizas (Joner & Leyval, 1997), mas os mecanismos envolvidos nesta rota alternativa de absorção não são ainda bem estudados. Os metais absorvidos pelas hifas podem ser imobilizados no tecido fúngico ou transferidos para as raízes, onde podem ser seqüestrados ou translocados para a parte aérea (Klauberger Filho et al., 2005). O aumento na razão da concentração de metais, na raiz/parte aérea em plantas micorrizadas, têm sido demonstrado e indica a existência de mecanismos que retardam o transporte de metal. Características biológicas dos FMAs, assim como a distribuição e quantidade de hifas internas, poderiam ter uma forte influência sobre a eficiência da barreira micorrízica à translocação de metais pesados, imobilizando estes nas raízes (Christie et al., 2004). Kaldorf et al. (1999) verificaram que, nas micorrizas, o Zn se concentra principalmente nos arbúsculos e, em outras estruturas do fungo, como hifas internas, ocasionando redução na transferência do metal para a planta. Não há dúvidas de que as micorrizas podem proteger a planta hospedeira de excesso de metais e vários mecanismos podem estar associados a esta proteção (Christie et al., 2004). Pode ocorrer a precipitação intracelular de cátions metálicos com fosfato, como demonstrado por Ma & Takahashi (1990) que verificaram diminuição da atividade de íons Mn^{2+} no interior da planta, por meio da formação de compostos insolúveis com íons fosfato, contribuindo para atenuar a fitotoxicidade de Mn. Além desse mecanismo, pode também ocorrer a complexação dos metais a grupos funcionais da parede celular de FMAs, como hidroxila, carboxila, amino e sulfídrico. Como sugerido por Wilkinson & Dickinson (1995) e Sarret et al. (1998), a complexação dos metais com proteínas ligantes, contendo

cisteínas presentes em FMAs representa um importante papel na tolerância das plantas ao excesso de metais pesados. Outro aspecto interessante é a produção de glomalinas que são glicoproteínas insolúveis produzidas em grande quantidade pelas hifas e que possuem elevada capacidade de seqüestrar metais (González-Chavéz et al., 2004; Wright & Upadhyaya, 1998). O micélio extraradicular dos FMAs também participa, seletivamente, excluindo elementos tóxicos e não tóxicos através da adsorção em quitina contidas na parede celular (Zhou, 1999) ou precipitação intracelular.

Diante da complexidade das respostas das plantas ao estresse, provocado pelo excesso de metais pesados, particularmente, quando se considera a presença de micorrizas, é interessante investigar o efeito da contaminação do solo por metais pesados e dos FMAs em características anatômicas e a possível relação dessas alterações com o crescimento e absorção de metais pelas plantas. No projeto, esses aspectos foram avaliados em *Brachiaria decumbens* inoculada ou sem inoculação com FMAs selecionados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período de outubro a dezembro de 2005 em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (DCS-UFLA), utilizando mistura de solo contaminado, proporção de 15%, conforme descrito no capítulo 2. A mistura foi colocada em vasos de plástico com capacidade de 0,92 kg, onde foram testados os tratamentos de inoculação com os seguintes FMAs: *Acaulospora morrowiae*-UFLA Spain & Schenck (pimenta), *Gigaspora margarita* Becker & Hall (milho), *Scutellospora pellucida* (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders (cerrado), *Acaulospora scrobiculata* Trappe (cafeeiro). Os isolados foram selecionados com base nos resultados obtidos no Capítulo 2, em função de efeitos contrastantes sobre o crescimento e extração dos metais pela *B. decumbens*. Os isolados *A. morrowiae* e *S. pellucida* favorecem o crescimento, enquanto que o *A. scrobiculata* e *G. margarita* colonizam, mas não protegem a planta do excesso de metais. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x5: com e sem contaminação e cinco tratamentos de inoculação (não inoculado-NI e 4 isolados de FMAs), dispostos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para a inoculação, aplicou-se solo-inóculo de modo a fornecer aproximadamente 600 esporos por vaso no transplântio das plântulas. Sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf foram tratadas com H₂SO₄ (18 mol L⁻¹) por 1 minuto e, seguidamente, lavadas em água corrente, visando eliminar microrganismos contaminantes e facilitar a germinação, a qual foi realizada em bandejas plásticas contendo vermiculita. O transplântio para os vasos foi realizado quando as plântulas atingiram aproximadamente 10 cm de altura, sendo colocado 3 plântulas por vaso. Os tratamentos sem inoculação receberam 50 mL de um filtrado de solo-inóculo ausente de propágulos de FMAs, visando equilibrar a microbiota nesses tratamentos. As plantas de

braquiária foram mantidas em casa de vegetação por 30 e 60 dias, recebendo irrigação adequada para o crescimento das mesmas, sendo realizados dois cortes das plantas aos 30 e 60 dias em cada época. As raízes foram coletadas do solo, lavadas e 1 g de raízes finas foi retirado e em seguida clarificadas e então foi feita a coloração com azul de tripano (Phillips & Hayman 1970) e a colonização micorrízica foi quantificada (Giovanetti & Mosse 1980). Ao final do experimento, a parte aérea e raiz foram lavadas e colocadas para secar em estufa de circulação forçada a 60 °C para posterior determinação do peso da matéria seca. Após a determinação da matéria seca da parte aérea e raízes, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley e submetidas à digestão nítrico-perclórica e posterior análise das concentrações de Zn, Cu, Cd, Pb e Fe nos tecidos por espectrofotometria de absorção atômica. A quantidade acumulada na parte aérea e raízes das plantas foi calculada com base nas concentrações e produção de matéria seca.

Nos dois períodos foram retiradas amostras de folha e raízes, as quais foram fixadas em álcool etílico 70% e armazenadas temperatura ambiente até a realização de estudos comparativos da anatomia. Estes foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA. As avaliações foram feitas na lâmina foliar da segunda folha totalmente expandida, sendo os cortes transversais realizados à mão livre, na região mediana do limbo foliar, com o auxílio de uma lâmina e inclusão do material em pecíolo de embaúba. As seções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50% por 15 minutos, em seguida, lavadas em água destilada, coradas com safranina e montadas em glicerina 50%. Para estudos anatômicos das raízes, foram retiradas amostras compostas de 4 cm a partir do ápice da raiz de cinco plantas por tratamento, sendo estas submetidas a cortes anatômicos efetuados à mão livre com o auxílio de uma lâmina e inclusão do material em pecíolo de embaúba. Os cortes foram submetidos à clarificação em solução de hipoclorito de sódio a 50%

de produto comercial, por um período de três a cinco minutos, seguido de três lavagens em água destilada. O material foi, em seguida, neutralizado com solução de ácido acético a 5% por um minuto, repetindo-se as lavagens. A coloração foi efetuada com imersão em corante Verde de Metila, por dois a três minutos, seguindo-se de três lavagens em água destilada e imersão em corante vermelho congo por três a cinco minutos, repetindo-se as lavagens (Dop & Gautié, 1907). Posteriormente foram montadas lâminas semi-permanentes com água glicerinada e feita a lutagem com esmalte. Em seguida, as lâminas foram observadas ao microscópio e fotomicrografadas para comparação. As características avaliadas nas raízes foram: espessura da epiderme, córtex e exoderme e diâmetro do cilindro vascular. Para essas medições, foram montadas três lâminas, sendo duas medições por lâmina, totalizando seis repetições por tratamento. Foram calculadas as áreas proporcionais de cada estrutura em relação à seção transversal do corte.

As análises ultra-estruturais de raízes foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME). Amostras de raízes de 4 cm a partir do ápice foram fixadas em solução KarnovisK's modificada a pH 7,2 e armazenadas em câmara fria para observação em microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram transferidas para glicerina (30 min) e foram efetuados os cortes transversais em nitrogênio líquido de segmentos de aproximadamente 2 mm. Os fragmentos foram lavados em água destilada e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ por 1-2 horas, para posterior desidratação em gradiente de acetona (25, 50, 70. 90 por 10 minutos e três vezes por 10 minutos em 100%). Em seguida, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico. Os fragmentos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com a ajuda de uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio e procedeu-se o processo de metalização em ouro. Em seguida, realizou-se a observação em microscópio eletrônico de

varredura modelo LEO Evo 40. Por meio do software LEOQUIF (Leo User Interface), realizaram-se medidas de espessura de parede de células da endoderme, exoderme, tamanho dos vasos do xilema e tamanho da endoderme.

Os resultados de produção de matéria seca, concentração de metais na parte aérea e raiz e os de anatomia da *B. decumbens* foram submetidos à análise de variância e testes de médias (Tukey 5%) por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Matéria seca e colonização micorrízica

Os dados de produção de matéria seca e perfilhamento da *B. decumbens* encontram-se na Tabela 1. No solo não contaminado, observa-se que todos os isolados de FMAs favoreceram a produção de matéria seca total (MST) e matéria seca de raiz (MSR) em relação ao controle sem inoculação. Enquanto isso, apenas *S. pellucida* favoreceu a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e número de perfilhos (NP), obtendo-se aumentos de 52 e 55% em relação ao controle, respectivamente. Independente do tratamento de inoculação, a contaminação causou uma queda na produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST) e número de perfilhos (NP) da *B. decumbens*, com redução média de 83%. Enquanto isso, nas plantas com *S. pellucida* a redução média na produção de matéria seca foi menor (50%) e de apenas 15% no NP devido à contaminação. Em solo contaminado, a inoculação com *S. pellucida* aumentou em 420, 445, 433 e 95% a MSPA, MSR, MST e NP, em relação às plantas não inoculadas, respectivamente, evidenciando os benefícios deste fungo para o crescimento da *B. decumbens* nas condições de solo estudadas.

A colonização micorrízica da *B. decumbens* não foi influenciada pela contaminação do solo, apresentando taxa de colonização média de 23%, valor comumente encontrado para esta espécie em solo com excesso de metais pesados (Klauber-Filho et al., 2002; Carneiro et al., 2001; Soares e Siqueira, 2006) Apesar de não haver efeito significativo entre os fungos, observa-se colonização mais elevada no *S. pellucida* (51%).

TABELA 1 Matéria seca da parte aérea e de raízes e número de perfilhos da *B. decumbens* não inoculada e inoculada com diferentes FMAs em solo contaminado com metais pesados.

Tratamentos	Matéria seca (g)							
	P. aérea		Raiz		MS Total		Número de Perfilhos	
	S/metál	C/metál	S/metál	C/metál	S/metál	C/metál	S/metál	C/metál
NI	5,43**B	0,82 B	1,91**B	0,49 B	7,34**B	1,31 B	6,8**C	4,6 B
<i>A. scrobiculata</i>	6,56**B	0,84 B	3,79**A	0,43 B	10,35**A	1,27 B	8,6**BC	4,6 B
<i>S. pellucida</i>	8,27**A	3,45 A	3,6**A	2,18 A	11,87**A	5,63 A	10,6**A	9,0 A
<i>A. morrowiae</i>	6,49**B	1,35 B	4,21**A	0,94 B	10,7**A	2,29 B	9,8**AB	5,2 B
<i>G. margarita</i>	6,5**B	1,04 B	4,03**A	0,55 B	10,53**A	1,59 B	8,6**BC	5,2 B

Os * indicam diferenças entre os tratamentos de contaminação e controle e as letras maiúsculas comparam na coluna os tratamentos de inoculação.

Teores e quantidades acumuladas de metais pesados

Os teores de metais pesados na parte aérea da *B. decumbens* encontram-se na Tabela 2. Plantas desenvolvidas no solo contaminado apresentaram teores elevados de todos os metais. Os teores de Zn na parte aérea elevaram-se em média de 1800%, atingindo 756 mg kg⁻¹ (*A. scrobiculata*). Teores de Cd também sofreram grande aumento, passando de menos de 1,0 mg kg⁻¹ para mais de 100 mg kg⁻¹ nas plantas com *G. margarita*. Tanto os valores de Zn quanto de Cd foram superiores à faixa fitotóxica de 100-400 de Zn e 5-30 de Cd em mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias & Pendias, 2001), sendo, portanto, responsáveis pela acentuada redução no crescimento da *B. decumbens* em solo contaminado. A inoculação afetou de maneira diferenciada os teores de metais na parte aérea, apresentando comportamento distinto para cada metal. Para o Zn, somente *A. scrobiculata* diferiu do controle, tendo aumento no teor desse elemento de 16%, enquanto que, para o Cd, foi o isolado *G. margarita* que apresentou aumento de 32% em relação ao controle (NI). Os teores de Cu não diferiram entre as plantas não inoculadas e inoculadas, mas diferiram entre aquelas com *A. scrobiculata* e *S. pellucida* que apresentam os menores teores deste metal na parte aérea. Os teores de Pb foram baixos, porém destacando-se a *A. scrobiculata* que apresentou teores próximo de 30 mg kg⁻¹.

Semelhante ao que foi observado para a parte aérea, houve um aumento acentuado nos teores de Zn, Cd, Cu e Pb nas raízes das plantas em solo contaminado (Tabela 3), atingindo valores médios de aumento de 4000, 6000, 1600 e 250%, respectivamente. Houve também efeito da inoculação. Plantas colonizadas pela *S. pellucida* apresentaram teores maiores de todos os metais, em relação ao controle, enquanto *A. morrowiae* aumentou os de Zn. Os efeitos de *S. pellucida* foram de 34, 36, 66 e 24% respectivamente para Zn, Cd, Cu e Pb.

TABELA 2. Teores de Zn, Cd, Cu e Pb na matéria seca da parte aérea da *B. decumbens*, não inoculada e inoculada com diferentes FMAs.

Teor de metais na parte aérea da <i>B. decumbens</i> (mg kg ⁻¹)								
Tratamentos	Zn		Cd		Cu		Pb	
	S/metal	C/metal	S/metal	C/metal	S/metal	C/metal	S/metal	C/metal
NI	41,42 A	649,20**B	0,61 A	89,70**B	11,03 A	26,71**AB	4,60 A	10,22 B
<i>A. scrobiculata</i>	40,75 A	756,00**A	0,73 A	99,44**B	12,72 A	42,29**A	4,49 A	29,61**A
<i>S. pellucida</i>	32,53 A	668,40**AB	0,97 A	75,30**B	12,74 A	23,73 B	6,50 A	14,81B
<i>A. morrowiae</i>	35,93 A	672,90**AB	1,03 A	75,48**B	12,47 A	28,63**AB	6,07 A	14,25 B
<i>G. margarita</i>	36,32 A	740,70**AB	0,86 A	118,56**A	11,32 A	32,53**AB	6,16 A	10,56 B

Os * indicam diferenças entre os tratamentos de contaminação e controle e as letras maiúsculas comparam na coluna os tratamentos de inoculação.

TABELA 3 Teores de Zn, Cd, Cu e Pb na matéria seca da raiz da *B. decumbens*, não inoculada e inoculada com diferentes FMAs.

Tratamentos	Teor de metais na raiz da <i>B. decumbens</i> (mg kg ⁻¹)							
	Zn		Cd		Cu		Pb	
	S/metal	C/metal	S/metal	C/metal	S/metal	C/metal	S/metal	C/metal
NI	72,30 A	2300,60**B	8,44 A	202,89**BC	25,78 A	313,20**B	14,75 A	34,45**BC
<i>A. scrobiculata</i>	31,80 A	2345,00**B	1,70 A	214,08**BC	25,45 A	355,72**B	12,65 A	26,77**C
<i>S. pellucida</i>	42,00 A	3093,90**A	1,40 A	276,12**A	20,03 A	520,20**A	11,81 A	45,82**A
<i>A. morrowiae</i>	103,20 A	3166,80**A	2,61 A	240,18**AB	24,65 A	332,46**B	15,20A	40,02**AB
<i>G. margarita</i>	55,50 A	2295,65*B	3,72 A	191,18**C	19,87 A	340,49**B	15,40 A	32,75 BC

Os * indicam diferenças entre os tratamentos de contaminação e controle e as letras maiúsculas comparam na coluna os tratamentos de inoculação.

A razão dos teores entre parte aérea e raízes revela valores bastante variáveis para os metais e tratamentos (Tabela 4). Nas plantas não inoculadas destacam-se os valores elevados para o Cd (0,43) e baixos para o Cu. Isto reflete a mobilidade diferenciada destes metais na planta. Portanto, enquanto o Cd se distribui em termos de concentração igualmente entre as duas partes, o Cu, como já demonstrado no estudo anterior, tende a concentrar-se nas raízes. Para inoculação, observa-se que *S. pellucida* apresenta menores razões para Zn, Cd e Cu, enquanto o *A. morrowiae* também teve menores razões para Zn e Cd. Isto portanto, evidencia que estes isolados restringem o transporte destes metais das raízes para a parte aérea e, assim, contribuem para menor translocação destes na *B. decumbens*, o que pode representar um mecanismo de proteção. Ao contrário destes, a *A. scrobiculata* e *G. margarita* não apresentam estes efeitos e, por isso, não tem ação protetora do excesso de metais no solo. No caso do Cu, verifica-se um valor elevado (0,12) para *A. scrobiculata* e muito baixo para *S. pellucida* (0,04). Portanto, o *S. pellucida* apresenta capacidade elevada de reter o Cu. Conforme abordado por González-Chavéz et al., (2004) isso pode ser atribuído à ação adsorvente da glomalina, uma glicoproteína de alta afinidade por este metal. A produção de glomalina difere entre isolados de FMAs e isto pode explicar o comportamento variado dos FMAs em relação aos metais.

TABELA 4 Razão dos teores entre a parte aérea e raízes (PA/R) da *B. decumbens*, não inoculada e inoculada com diferentes FMAs, de Zn, Cd, Cu e Pb em solo contaminado com metais pesados.

Tratamentos	Razão dos teores de metais na PA/R da <i>B. decumbens</i>			
	Zn	Cd	Cu	Pb
NI	0,28	0,43	0,08	0,29
<i>A. scrobiculata</i>	0,32	0,45	0,12	1,1
<i>S. pellucida</i>	0,21	0,27	0,04	0,32
<i>A. morrowiae</i>	0,21	0,31	0,08	0,35
<i>G. margarita</i>	0,32	0,62	0,09	0,32

A quantidade total extraída de metal pela *B. decumbens* apresentada na Figura 1, mostra o comportamento semelhante dos FMAs para Zn, Cd, Cu e Pb, sendo que as plantas com *S. pellucida* apresentaram maior acúmulo de todos os metais. O acúmulo nas plantas com este isolado foi maior em 629, 479, 550 e 428% para Cu, Zn, Pb e Cd respectivamente, confirmando os resultados do estudo anterior Capítulo 2. A superioridade deste isolado *S. pellucida* em acumular os metais é devido a maior produção de matéria seca em consequência do efeito protetor e a maior concentração de metais (Tabela 3). Enquanto isso, plantas inoculadas com *A. scrobiculata* e *G. margarita* apresentaram baixa quantidade acumulada para todos os metais, devido, principalmente, à baixa produção de matéria seca, pois não houve proteção destes isolados para a planta, de modo que estas se comportam como as plantas sem inoculação. Observa-se na Figura 1 as porcentagens de metais acumulados nas raízes da *B. decumbens*. De maneira geral, os metais encontram-se em média 72% acumulado nas raízes, com exceção do Pb, onde raízes de plantas inoculadas com *A. scrobiculata* acumulam somente 35% desse elemento nas raízes. Como já foi mencionado, o Cu é o elemento mais acumulado nas raízes, sendo em média 88%, atingindo

93% para o *S. pellucida*, confirmando a alta capacidade deste isolado em reter esse elemento nas raízes.

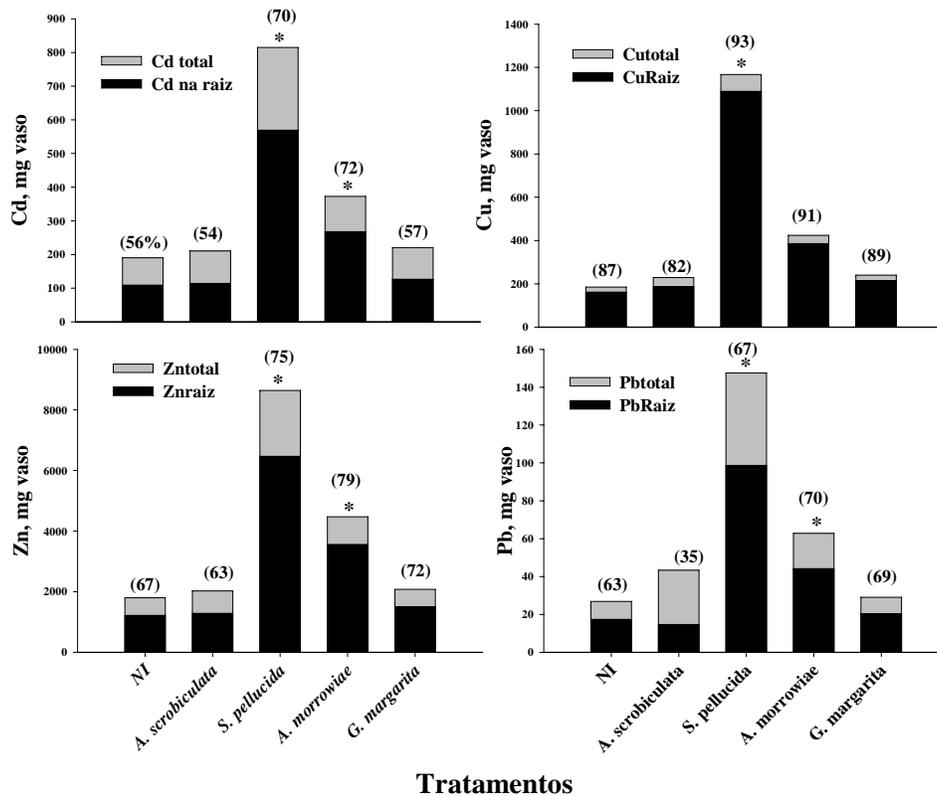


FIGURA 1 Acúmulo total de Cd, Zn, Cu e Pb nas plantas de *B. decumbens* nos diferentes tratamentos. Valores entre parênteses indicam a porcentagem de metal acumulado nas raízes. * indica os tratamentos que diferenciaram estatisticamente do controle (NI).

Características anatômicas

Os estudos anatômicos realizados em tecidos foliares e radiculares revelam alterações causadas pela contaminação e inoculação com FMAs. O

limbo foliar de plantas que cresceram em solo não contaminado apresenta parênquima clorofiliano, variando de 2 a 3 camadas de células e feixes vasculares de forma poligonal envolvidos por uma endoderme bastante desenvolvida e contínua (Figura 2 a-e). Observa-se nos feixes maiores, em média três calotas esclerenquimáticas na face abaxial, sub-epidérmicas, compostas pelas camadas de células, além de feixes menores envoltos pela endoderme. A endoderme dos feixes apresenta-se com células bastante desenvolvidas e de tamanho uniforme. O limbo é composto por epiderme unisseriada tanto na face abaxial como adaxial com células achatadas, com formato retangular, e cobertas por uma cutícula bem mais espessa na face adaxial. Nota-se um periciclo bastante espesso no feixe maior. No limbo das plantas que cresceram em solo contaminado (Figuras 2 a'-e'), observam-se alterações no número de camadas de células do parênquima clorofiliano, com exceção das plantas inoculadas com os isolados *S. pellucida* e *A. morrowiae*. Esses isolados apresentam anatomia assemelhante à das plantas do solo não contaminado, evidenciando um efeito sobre a planta hospedeira e que pode estar relacionado à ação protetora destes isolados para a *B. decumbens*. A contaminação reduziu o tamanho dos feixes vasculares e a espessura do periciclo e da cutícula. Houve também alterações com relação ao número e tamanho das células da endoderme. Essas alterações são mais evidentes nas plantas com menor crescimento devido à contaminação, assim como àquelas inoculadas com os isolados ineficientes e no controle sem inoculação. Plantas não inoculadas e inoculadas com *S. pellucida* e *A. morrowiae* apresentaram teores similares de Zn na parte aérea, mas apresentaram tendências de menores teores de Cd. Entretanto, essas plantas não apresentaram alterações anatômicas típicas do excesso de metais, na folha, evidenciando o efeito desses isolados na proteção à *B. decumbens*. Estes resultados são inéditos para plantas tropicais com a *B. decumbens*, e pelo menos em parte, têm sido relatada a ocorrência em outra

espécie. Sridhar et al. (2005), observaram que, em plantas submetidas a estresse do excesso de Zn, houve redução das células da epiderme acompanhada de colapso de células do parênquima paliçádico e esponjoso das folhas. Portanto, os resultados do presente estudo indicam que a colonização da *B. decumbens* por isolado de FMA, eficiente na proteção, reduz o dano que o excesso de Zn e Cd causam ao tecido foliar da *B. decumbens*.

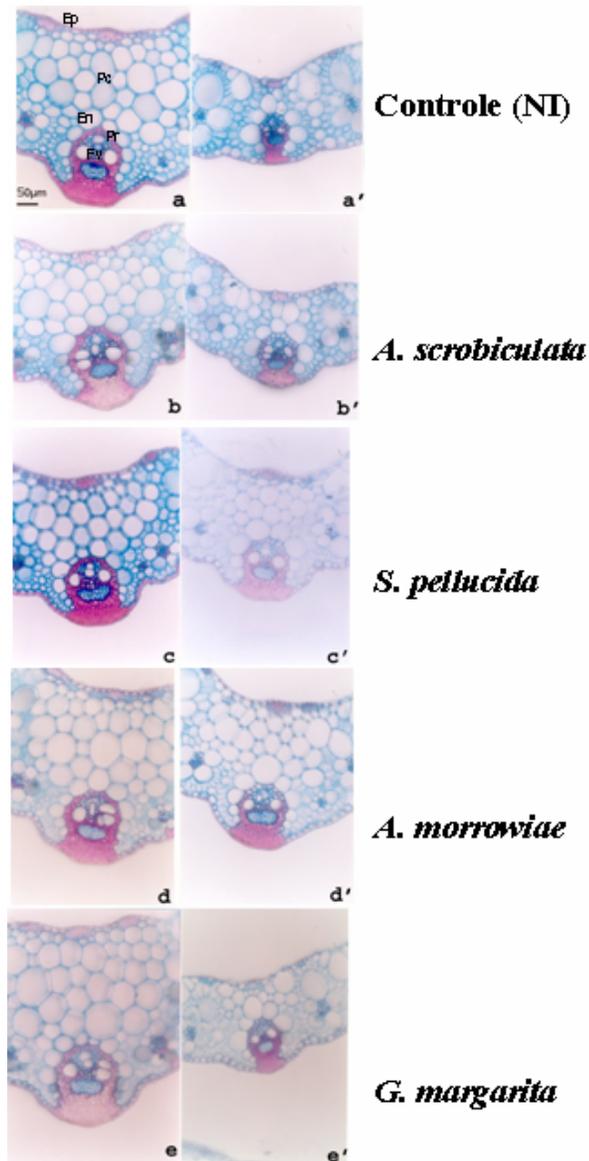


FIGURA 2 Fotomicrografias de secções transversais de folhas *B. decumbens* inoculada com diferentes FMAs em condições controle (a, b, c, d, e) e de contaminação (a', b', c', d', e'). Ep- epiderme, Pc- parênquima clorofiliano, En- endoderme, Pr- periciclo, Fv- feixes vasculares.

Os estudos sobre avaliações anatômicas das raízes em microscopia eletrônica de varredura foram realizados, visando caracterizar melhor as diferenças causadas pelo excesso de metais e inoculação com FMAs nas raízes de *B. decumbens*. Como pode ser observado na Figura 3, as raízes de *B. decumbens* apresentam alta densidade de tricomas e a contaminação interfere nesta característica, reduzindo a densidade dos mesmos, especialmente nas plantas sem inoculação e inoculadas com *A. scrobiculata* (Figura 3 a, a', b, b'). O efeito mais evidente dos FMAs se observa nas plantas inoculadas com *S. pellucida*, nas quais a densidade de tricomas não foi reduzida pela contaminação (Figura 3 c, c'). O efeito negativo dos metais sobre raízes absorventes já foi relatado conforme Barceló & Poschenrieder (1999), que relatam redução do número de raízes absorventes e raízes laterais em condições de contaminação com metais. Merece destacar o efeito observado para *S. pellucida*, mas que aparentemente não apresenta qualquer relação com a proteção desse fungo à planta. Este aspecto merece estudos adicionais.

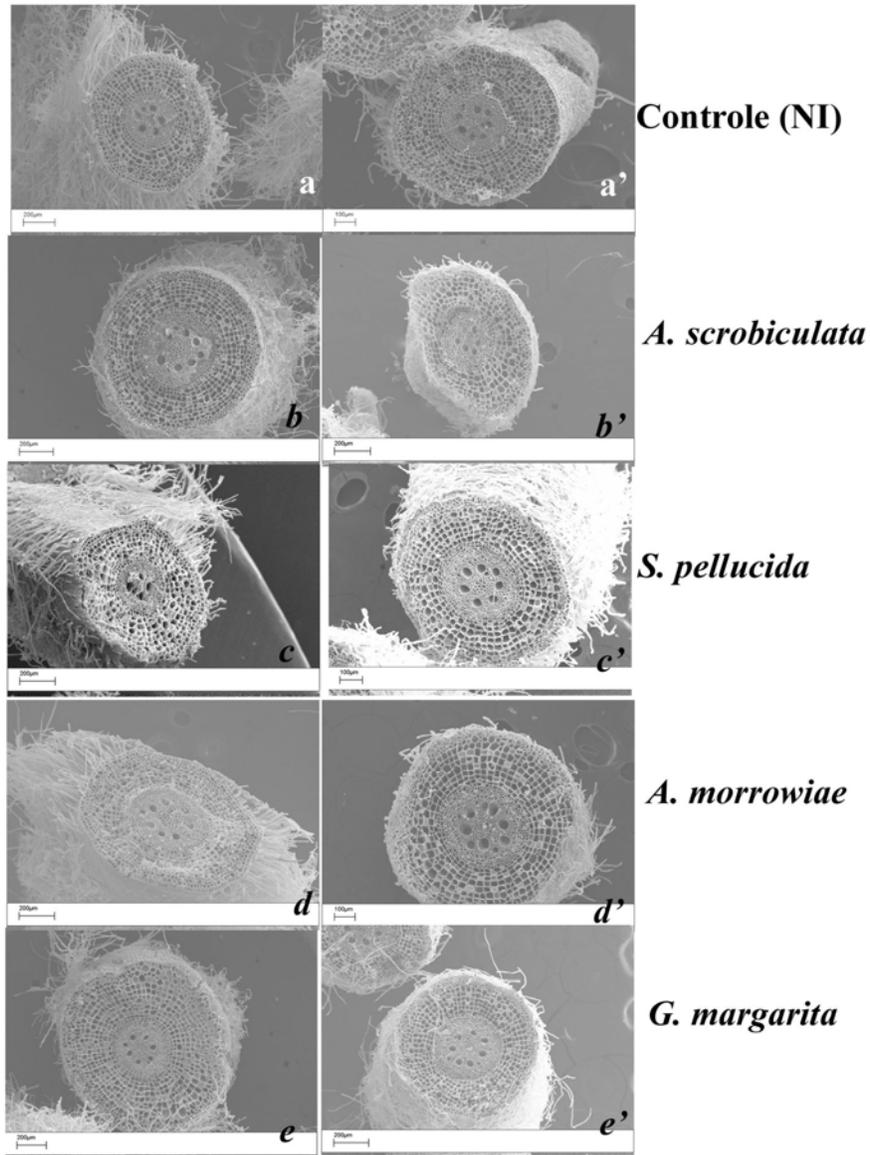


FIGURA 3 Micrografias de varredura de seções transversais de raízes de *B. decumbens* sem inoculação e inoculada com *A. scrobiculata* e *S. pelucida* em condições controle (*a*, *b*, *c*) e de contaminação (*a'*, *b'*, *c'*).

A avaliação anatômica por microscopia de luz em seções transversais de raízes, submetida aos tratamentos estudados, é apresentada nas Figura 4. Nota-se que as raízes da *B. decumbens* apresentam uma epiderme unisseriada, com células de tamanho bastante uniforme e uma exoderme com uma camada de célula e duas camadas de parênquima lignificado, com células heterodiamétricas (Figura 4 a, b, c, d, e). Observa-se uma endoderme com espessamento em forma de “U”, um periciclo lignificado e um parênquima medular com espessamento secundário de parede celular. Verifica-se que a contaminação causou grande redução no volume do tecido cortical das raízes e causa alterações na organização da epiderme, exoderme e no parênquima, com mudanças no tamanho e forma das células (Figura 4 a'-e'). Entretanto, nas raízes de plantas inoculadas com os isolados eficientes (*S. pellucida* e *A. morrowiae*) pode-se observar (Figura 4 c') que não ocorreram reduções no volume do córtex, mas as células da exoderme e do parênquima apresentam um encaixamento bastante diferenciado para o *S. pellucida* em relação aos demais tratamentos de inoculação. Embora com certa desorganização, observa-se um tamanho mais uniforme das células tanto no controle como na contaminação (Figura 4 c, c'). As plantas inoculadas com o isolado *A. morrowiae* também apresentaram alterações distinta das demais, com células da exoderme e do parênquima com formato mais alongado (Figura 4 d'). Plantas inoculadas com o isolado *G. margarita* apresentaram um aumento no tamanho das células da exoderme, entretanto mantendo as células mais organizadas, inclusive na epiderme (Figura 4 e').

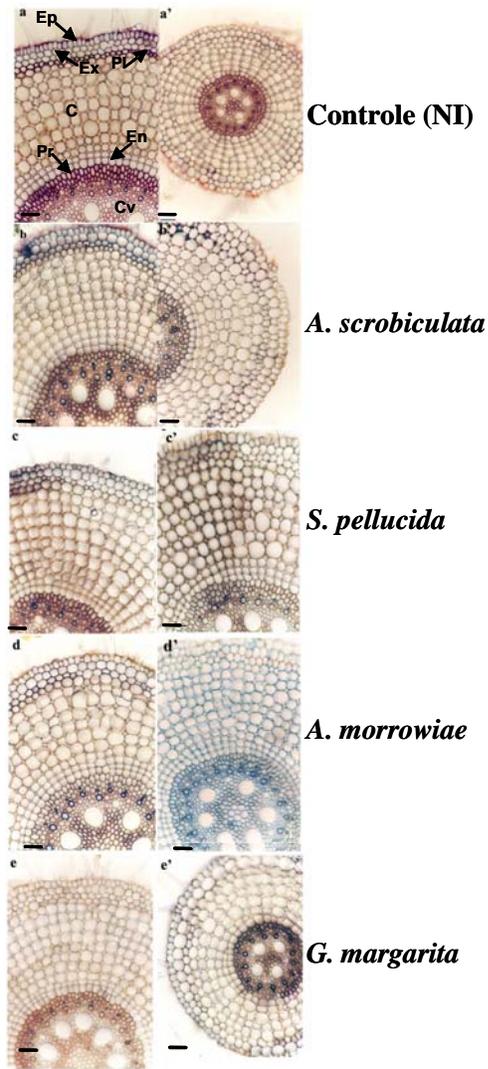


FIGURA 4 Fotomicrografias de secções transversais de raízes de *B. decumbens* sem inoculação, inoculada com *S. pellucida*, *A. scrobiculata*, *A. morrowiae* e *G. margarita* em condições controle (a, b, c, d, e) e de contaminação (a', b', c', d', e'). Ep- epiderme, Ex- exoderme, Pl- parênquima lignificado, C- córtex, En- endoderme, Pr- periciclo, Cv- cilindro vascular. A barra corresponde a 50µm.

Nas plantas com *S. pelucida* em condições de contaminação, ocorreram alterações na endoderme comparadas ao controle e há também alterações no encaixamento celular, sendo este e com projeções laterais tipo bráquiforme (Figura 5). Como a exoderme funciona com uma barreira à entrada de água e íons, essas alterações no encaixamento das células, observadas nas raízes colonizadas por *S. pelucida*, podem ter contribuído para reduzir a mobilidade dos metais por tecido da planta.

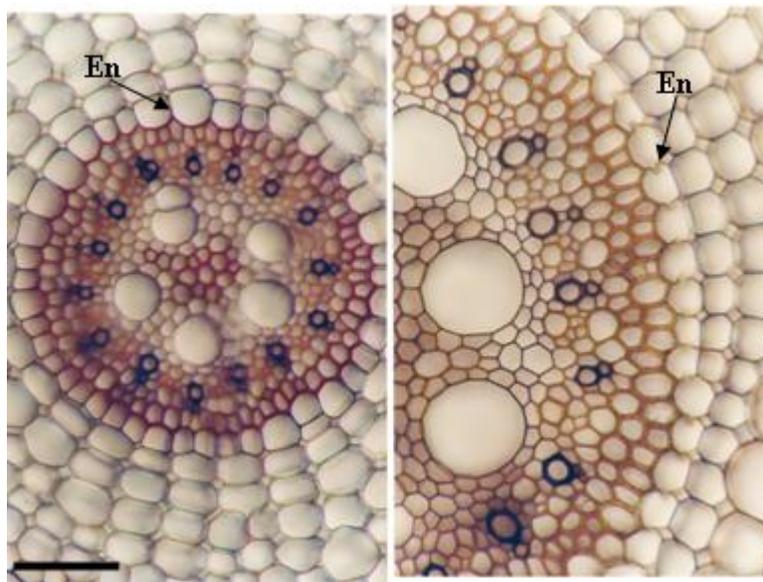


FIGURA 5 Fotomicrografias de seções transversais de raízes de *B. decumbens*, não inoculada e inoculada com *S. pelucida* em condições de contaminação. Seta à direita mostra as projeções celulares e detalhes do arranjo destas. Seta à esquerda mostra células sem alterações. A barra corresponde a 50 μ m.

Os resultados das avaliações realizadas nas raízes da *B. decumbens* para os diferentes tratamentos de inoculação encontram-se nas tabelas 5 e 6. Observa-

se, de maneira geral, uma tendência de menor espessura do córtex e do cilindro nas raízes das plantas em condições de contaminação nas duas épocas avaliadas, sendo essa redução em média de 15 e 30%, respectivamente para córtex e cilindro. Esta redução foi significativa apenas no controle (NI) e nos isolados *G. margarita* e *S. pellucida* no primeiro e segundo mês, respectivamente. Observa-se também uma tendência de aumento em média de 23% na espessura da epiderme, somente no segundo mês, sendo esse aumento significativo apenas para os isolados *A. scrobiculata* e *A. morrowiae*. Já para a exoderme e parênquima lignificado, embora tenham sido verificadas mudanças no tamanho e forma das células, somente o isolado *S. pellucida* e *A. morrowiae* apresentaram aumentos significativos nos valores destas variáveis. Ao contrário do que é observado para estas características, a contaminação do solo e a inoculação não influenciaram o tamanho da endoderme. De maneira geral, verifica-se que os vasos do xilema tiveram menor diâmetro, em média de 19%, no tratamento com contaminação, sendo diferentes estatisticamente somente nos isolados *A. morrowiae* e *S. pellucida* (Tabela 6). É de se esperar que plantas com parênquima lignificado e menor tamanho de vasos xilemáticos tenham menor translocação e isto pode estar relacionado à proteção da planta. De fato, Sridhar et al (2005) consideram que o menor tamanho dos vasos do xilema pode estar relacionado com espessamentos causados por deposições de metais nas paredes dos vasos e este fato afeta a translocação de metais e água para a parte aérea.

Os resultados da proporção ocupada por cada estrutura são encontrados nas Tabelas 7 e 8. Como verificado para o tamanho, observa-se uma tendência de menor área ocupada pelo córtex e cilindro em média de 7 e 12%, respectivamente, nas raízes das plantas em condições de planta crescidas na presença de contaminação, ambas épocas de cultivo. Esta diminuição foi significativa para *A. morrowiae* nos dois períodos e *A. scrobiculata* no primeiro mês.

TABELA 5 Espessura em μm do córtex, cilindro, epiderme, exoderme e parênquima lignificado (Exoderme + PL) de raízes de *B. decumbens* inoculadas com diferentes FMAs, submetidas ao tratamento com e sem contaminação com metais pesados por um período de um mês.

Tratamentos	Córtex		Cilindro		Epiderme		Exoderme + PL	
	μm							
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
NI	315 A**	168 A	412 A*	298 A	23 A	23 A	47 A	52 A
<i>A. scrobiculata</i>	223 B	171 A	302 ABC	261 AB	23 A	20 A	47 A	52 A
<i>S. pellucida</i>	218 B	197 A	293 BC	279 A	23 A	20 A	48 A	63 A**
<i>A. morrowiae</i>	192 B	208 A	270 C*	156 B	25 A	23 A	55 A	57 A
<i>G. margarita</i>	259 AB*	171 A	407 AB**	213 AB	24 A*	20 A	53 A	52 A

75

TABELA 6 Espessura em μm do córtex, cilindro, Epiderme, exoderme e parênquima lignificado (Exoderme + PL) de raízes de *B. decumbens* inoculadas com diferentes FMAs, submetidas ao tratamento com e sem contaminação com metais pesados por um período de dois meses.

Tratamentos	Córtex		Cilindro		Epiderme		Exoderme + PL		Endoderme		Vasos Xilema	
	μm											
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
NI	319 A**	221 A	477 A**	312 A	24 A	25 B	42 B	58 B	24,8 A	23,6 A	56,7 A	49,0 A
<i>A. scrobiculata</i>	249 AB	189 A	403 AB*	281 A	19 A	25 B**	56 AB	73 B	27,3 A	23,5 A	56,3 A	50,0 A
<i>S. pellucida</i>	337 A*	262 A	452 A	385 A	22 A	25 B	74 A	68 B	24,6 A	22,5 A	57,6*A	44,7 A
<i>A. morrowiae</i>	225 BC	270 A	440 A	379 A	19 A	32 A**	56 AB	101 A**	24,2 A	22,3 A	59,8*A	48,1 A
<i>G. margarita</i>	142 C	193 B	257 B	312 A	22 A	23 B	62 AB	59 B	26,1 A	22,9 A	58,0 A	50,2 A

Os * indicam diferenças entre os tratamentos de contaminação e controle e as letras maiúsculas comparam na coluna os tratamentos de inoculação.

Foi verificada uma tendência de aumento em média de 17 e 28%, respectivamente, da área ocupada pela epiderme, exoderme e pelo parênquima lignificado. O aumento na epiderme foi significativo apenas para tratamento sem inoculação no primeiro mês, enquanto no segundo mês houve aumento na área ocupada pela epiderme, exoderme e pelo parênquima lignificado para todos os tratamentos, exceto para *G. margarita*. O aumento da área da epiderme, exoderme e parênquima lignificado, as quais apresentam maior concentração de cargas negativas, pode ser uma resposta das plantas à contaminação, funcionando como filtro no processo de absorção. De fato, maiores concentrações de metais nas barreiras apoplásticas foi observada por Chabbi (2002) em de raízes de *Juncus bulbosus*, reduzindo a concentração destes em regiões do parênquima cortical. Já para a exoderme foi observado aumento significativo para todos os tratamentos de inoculação, exceto para *A. morrowiae* e *S. pellucida*. Como a endoderme e exoderme são barreiras apoplásticas, o aumento destas pode contribuir para redução da translocação dos metais. Segundo Lux et al (2004) este pode ser um importante mecanismo de proteção dos tecidos contra os efeitos tóxicos dos metais.

Os resultados dos estudos anatômicos indicam que os isolados de FMAs, capazes de exercerem proteção à *B. decumbens* contra o excesso de metais, reduzem os danos destes metais aos tecidos foliares e radiculares, aumentam o parênquima lignificado, exoderme e endoderme que são barreiras naturais apoplásticas e diminuem os vasos xilemáticos. Estas alterações têm relações diretas com os processos de translocação dos elementos na planta é ocorrem no sentido de reduzir esta translocação, sendo que essas não foram observadas nos isolados ineficientes. É razoável sugerir que estas alterações estejam envolvidas na proteção da *B. decumbens* ao excesso de metais pesados.

TABELA 7 Área proporcional do córtex, cilindro, epiderme, exoderme e parênquima lignificado (Exoderme + PL) em seções transversais de raízes de *B. decumbens* inoculadas com diferentes FMAs, submetidas ao tratamento com e sem contaminação com metais pesados por um período de um mês.

Tratamentos	Córtex		Cilindro		Epiderme		Exoderme + PL	
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
Não Inoculado	53**A	41 A	35 A	37 A	3,8 B	5,6 A*	7,9 B	12,9 A**
<i>A. scrobiculata</i>	52 A	48 A	35 A	37 A	5,3 AB	5,8 A	11,2 AB	15,0 A**
<i>S. pellucida</i>	50 A	46 A	34 A	33 A	5,3 AB	4,8 A	11,0 AB	14,7 A**
<i>A. morrowiae</i>	50 A	48 A	35 A*	18 B	6,1 A	5,6 A	14,5 A	13,7 A
<i>G. margarita</i>	51 A	50 A	40 A	31 AB	4,6 AB*	5,9 A	10,4 AB	15,2 A**

TABELA 8 Área proporcional do córtex, cilindro, epiderme, exoderme e parênquima lignificado (Exoderme + PL) em seções transversais de raízes de *B. decumbens* inoculadas com diferentes FMAs, submetidas ao tratamento com e sem contaminação com metais pesados por um período de dois meses.

Tratamentos	Córtex		Cilindro		Epiderme		Exoderme + PL	
	SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
Não Inoculado	54 A	49 A	39 AB	35 A	4,1 B	5,6 A**	7,2 B	12,9 A*
<i>A. scrobiculata</i>	49 AB	43 A	39 AB**	32 A	3,9 B	5,7 A**	11,5 B	16,7 A*
<i>S. pellucida</i>	50 AB	52 A	34 B	38 A	3,4 B	4,9 A**	11,1 B	13,6 A
<i>A. morrowiae</i>	49 AB	45 A	42 A**	32 A	3,6 B	5,5 A**	10,7 B	17,2 A**
<i>G. margarita</i>	43 B	47 A	38 AB	37 A	6,8 A	5,8 A	18,6 A	14,2 A

Os * indicam diferenças entre os tratamentos de contaminação e controle e as letras maiúsculas comparam na coluna os tratamentos de inoculação

6 CONCLUSÕES

Os isolados estudados comportaram-se como se previa: *S. pellucida* e *A. morrowiae* exerceram proteção a *B. decumbens*, enquanto *G. margarita* e *A. scrobiculata* foram ineficientes nesta proteção.

De maneira geral, a contaminação do solo reduziu a espessura e a área proporcional do córtex e cilindro e aumentou a epiderme, exoderme e parênquima lignificado.

Os metais pesados causam danos aos tecidos do mesofilo foliar como redução do número de camadas de células do parenquimáticas e do tamanho dos feixes vasculares, aumento na espessura do periciclo e da cutícula e nas raízes absorventes reduzem o volume do tecido cortical, aumento da espessura da epiderme, do parênquima lignificado e redução no tamanho dos vasos xilemáticos.

As alterações anatômicas causadas pelo excesso de metais foram compensadas pela colonização das plantas pelos fungos protetores do excesso de metais.

Como as alterações observadas são determinantes da translocação dos elementos na planta e foram mais evidentes em plantas colonizadas pelos fungos eficientes, supõe-se que estas estejam envolvidas no mecanismos de proteção da *B. decumbens* induzido pelos FMAs.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, Ch. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: PRASAD, M.N.V; HAGEMEYER, J. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems**. Berlin: Springer, 1999. p.183–206.

BARROWCLOUGH, D.E.; PETERSON, C.A. Effects of conditions and development of the underlying exodermis on the vitality of the onion root epidermis. **Physiologia Plantarum**, v.92, p.343-349, 1994.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solos com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1443-1452, 2001.

CHABBI, A. Metal concentrations pore water of the lusitan lignite mining sediments and internal metal distribution in *Juncus*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.3, p.105-117, 2002.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v.261, p.209-217, 2004.

CLARKSON, D.T. et al. Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots: development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. **Plant, Cell and Environment**, v.10, p.83-93, 1987.

DEGENHARDT, B.; GIMMLER, H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.595-603, 2000.

DOP, P.; GAUTIÉ, A. **Manuel de technique: botanique**. Paris: J. Lamane, 1907. 534 p.

EDERLI, L. et al. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. **Physiologia Plantarum**, v.21, p.66-74, 2004.

ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A. The apoplastic permeability of root apices. **Canadian Journal Botany**, v.70, p.1502-1512, 1992.

ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. **Journal Plant Growth Regul.**, v.21, p.335-351, 2003.

FERGUSON, I.B. CLARKSON, D.T. Ion uptake in relation to development of a root hypodermis. **New Phytologist.**, v.77, p.11-14, 1976.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.235.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. **New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.

GLASS, A.D.M. Nutrient absorption by plant roots: regulation of uptake to match plant demand. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant roots: the hidden half**. 3rdedn. New York: Marcel Dekker, 2002. p.571-586.

GONZÁLEZ CHÁVEZ, M.C. et al. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environ. Pollut.**, v.130, p.317-323, 2004.

GREGER, M. Metal availability and bioconcentration in plants. In: PRASAD, M.N.V.; HAGEMeyer, J. **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p.1-28.

JONER, E.J.; LEYVAL, C. Uptake of ¹⁰⁹Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae* / *Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. **New Phytologist**, v.135, p.353-360, 1997.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC, 2001. 413p.

KALDORF, M. et al. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal of Plant Physiology**, v.154, p.718-728, 1999.

KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.125-134, 2002.

LUX, A. et al. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity.

Physiologia Plantarum, v.120, p.537-545, 2004.

MA, J.; TAKAHASHI, E. The effect of silicic acid in a P-deficient soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.126, p.121-125, 1990.

MACFARLANE, G.R.; BURCHETT, M.D. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Australian Botany**, v.68, p.45-59, 2000.

NORTH, G.R.; NOBEL, P.S. Hydraulic conductivity of concentric root tissues of *Agave deserti* Engelm. Under wet and drying conditions. **New Phytologist**, v.130, p.47-57, 1995.

PERUMALHA, C.J.; PETERSON, C.A. Deposition of Caspary bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of Young corn and onion roots. **Canadian Journal of Botany**, v.64, p.1873-1878, 1986.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v.55, p.158-160, 1970.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 525-545, 1995.

REINHARDT, D.H.; ROST, T.L. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. **Environmental and Experimental Botany**, v.35, p.563-574, 1995.

ROSS, I.S. Effect of copper, cadmium and zinc on germination and mycelial growth in *Candida albicans*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.78, p.543-545, 1982.

SALT, D.E. et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian mustard*. **Plant Physiology**, v.109, p.1427-1433, 1995.

SARRET, G. et al. Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution. **Environ. Sci. Technol.**, v.32, p.3325-3330, 1998.

SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, v.149, p.167-192, 2001.

SETIA, R. C.; BALA, R.. Anatomical changes in root and stem of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to different heavy metals. **Phytomorphology**, v. 44, p.95–104, 1994

SHRIDHAR, B.B.M. et al. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental of Experimental Botany**, v.54, p.131-141, 2005.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Phosphate and mycorrhizas on protection of a tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Environmental Pollution**, 2006. No prelo

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

ZHOU, J. L. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.686-693, 1999.

WILKINSON, D.M.; DICKINSON, N.M. Metal resistance in trees: the role of mycorrhizae. **Oikos**, v.72, p.298-300, 1995.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v.198, p.97-107, 1998.