

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE
E RECURSOS HÍDRICOS

**Crescimento inicial e associação micorrízica em milho transgênico (Bt) e não transgênico
em diferentes níveis de cádmio**

Ana Paula Silva Del Ducca

Itajubá

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE
E RECURSOS HÍDRICOS

Ana Paula Silva Del Ducca

Crescimento inicial e associação micorrízica em milho transgênico (Bt) e não transgênico em diferentes níveis de cádmio

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de Concentração: Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Orientadora: Profa. Dra. Eliane G. P. Melloni

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni

Itajubá

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE
E RECURSOS HÍDRICOS

Ana Paula Silva Del Ducca

Crescimento inicial e associação micorrízica em milho transgênico (Bt) e não transgênico em diferentes níveis de cádmio

Dissertação aprovada por banca examinadora em 02 de dezembro de 2013, conferindo à autora o título de *Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos*.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eliane G.P. Melloni (Orientadora)

Prof. Dr. Rogério Melloni (Co-orientador)

Profa. Dra. Fabrina Bolzan Martins

Prof. Dr. José Pereira da Silva Júnior

Itajubá

2014

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida: meu pai, minha mãe, meu irmão, meu namorado e minha vó.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus.

Aos Professores, Dra. Eliane G. P. Melloni, minha orientadora e Dr. Rogério Melloni, meu co-orientador, por me ensinarem muitas coisas, ensinamentos que levarei comigo para toda vida.

Ao Instituto de Recursos Naturais e à Universidade Federal de Itajubá, pela estrutura oferecida para meus estudos.

A CAPES, pela bolsa de estudos, pois sem este recurso financeiro não seria possível ter me dedicado exclusivamente ao desenvolvimento deste projeto.

A todos os professores com quem tive aulas, principalmente àqueles que contribuíram de forma efetiva para a realização deste trabalho, Prof. Dr. Marcelo de Paula Corrêa e Prof^ª Dr^ª Fabrina Bolzan Martins, por me elucidarem quanto à parte estatística do trabalho, à Prof Dr^ª Ana Lúcia Fonseca, por participar da minha banca de qualificação.

A todos os funcionários que, direta ou indiretamente, colaboraram com minha pesquisa, especialmente ao Técnico do Laboratório de Microbiologia, Paulo, que dedicou parte do seu tempo para me ensinar e auxiliar nas metodologias necessárias para confecção do trabalho. Também aos técnicos, João Vitor, Tânia, Josivaldo e Cláudio, que me auxiliaram durante as etapas de montagem do meu experimento e das análises laboratoriais.

Agradeço também às alunas de iniciação científica, Marina e Bruna, por me ajudarem nas várias etapas do trabalho e também contribuindo para meu aprendizado como futura acadêmica.

Agradeço de maneira muito especial, ao meu pai e a minha mãe, por todo o auxílio durante esses dois anos, sem o qual não seria possível concluir mais essa etapa.

Ao meu namorado, Tiago, por todo apoio pessoal, por estar sempre ao meu lado, por aguentar fases de mau humor, quando tive problemas, e por compartilhar comigo alegrias.

A minha tia Amélia e minha vó Ziza, pelas diversas refeições e por escutarem meus desabafos nas horas difíceis e sempre me apoiarem e estarem do meu lado.

Aos colegas que me apoiaram durante a execução do trabalho, me auxiliando ou simplesmente me ouvindo: Paula Ranzani, Maria Cláudia Oliveira, Luiza Barros, Luiz Fernando e Clara Faro.

RESUMO

Com o crescimento da população mundial, aumenta-se a necessidade da produção de alimentos, gerando consigo o uso indiscriminado de fertilizantes com o objetivo de manter os solos férteis e a produção em alta. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do cádmio como contaminante de superfosfato simples na rizosfera e no crescimento de milho (*Zea Mays* L.) transgênico e não transgênico sob condições controladas. Foi instalado um experimento fatorial em casa de vegetação com cinco doses crescentes de cádmio, três espécies de fungos micorrízicos arbusculares (mais o controle) e dois tipos de plantas (milho não transgênico e transgênico), com três repetições por tratamento, totalizando 160 vasos, com quatro sementes cada um. O experimento foi conduzido por 45 dias e cada vaso foi mantido com umidade a 60% de sua capacidade de campo. No vigésimo dia de cultivo foi realizado o desbaste para apenas uma planta por vaso. Após 45 dias, foi realizada a coleta e foram analisadas as variáveis-resposta: diâmetro do colo, matéria seca de raiz e de parte aérea, comprimento de micélio extrarradicular total, percentual de colonização de raiz e número de esporos. Os resultados foram submetidos a análises estatísticas com comparação de médias por Tukey a 5% e análise de regressão. A partir dessas análises percebeu-se que não houve resposta positiva de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em milho transgênico, pois os vasos controle sem inoculação de fungo foram os que apresentaram os maiores resultados nas variáveis de crescimento estudadas. Esse resultado pode ser confirmado pela variável microbiológica colonização de raiz, que se mostrou muito menor para esta espécie de hospedeiro do que para o milho não transgênico, o que pode ter ocorrido devido à transgenia, o que pode ter interferido no seu micotrofismo. Quanto ao milho não transgênico, a eficácia dos fungos estudados variou bastante, mas em âmbito geral, o que mais se destacou foi o *Scutellospora heterogama*, principalmente em doses mais altas de cádmio (142,5 e 285,0 mg kg⁻¹). Nas doses mais baixas (0, 28,5 e 71,25 mg kg⁻¹) seu comportamento apresentou semelhanças com o *Glomus clarum* que se mostrou também eficiente para essa situação. Com base nesses resultados, concluiu-se que os fungos micorrízicos podem não ser recomendados para a utilização em caso de plantio de milho transgênico, visto que a associação micorrízica nem sempre apresentou correlação positiva com o crescimento da planta. Já para milho não transgênico a utilização desses fungos pode ser indicada, pois existe a possibilidade de o agricultor obter benefícios da simbiose, mesmo em solos contaminados por cádmio.

Palavras-chave: Metal pesado. Micorrizas arbusculares. Fertilizantes comerciais. Fungos micorrízicos arbusculares.

ABSTRACT

With the growth of the world population the need for food production increases, generating the indiscriminate use of fertilizers in order to maintain fertile soils and high production. The aim of this study was to analyze the effect of cadmium as a contaminant of superphosphate in the rhizosphere and growth of corn (*Zea Mays* L.) transgenic and non-transgenic under controlled conditions. A factorial experiment was installed in a greenhouse with five increasing doses of cadmium, three species of mycorrhizal fungi (more control) and two types of plants (transgenic and non-transgenic corn), with three replicates per treatment, totaling 160 vessels, with four seeds each. The experiment was conducted for 45 days and each pot was kept with humidity at 60% of its field capacity. On the twentieth day of cultivation was conducted for roughing only one plant per vessel. After 45 days, we collected and analyzed the response variables: diameter, dry root and shoot length of extraradical mycelium total percentage of root colonization and number of spores. The results were submitted to statistical analysis with comparison of means by Tukey test at 5% and regression. From these analyzes, it was found that there was no positive response to inoculation with mycorrhizal fungi in transgenic corn, because the control vessels, without inoculation of the fungus, were those with the greatest results in the growth variables studied. This result can be confirmed by microbiological variable root colonization, which proved to be much smaller for this host species than for non-transgenic corn, which may be due to genetic changes made in this plant in order to get more resistance pests, which may also affect this species of corn, develop efficiency with the mycorrhizal association. As for the non-transgenic corn, the efficacy of the fungi studied varied widely, but in general scope, what stood out was the *Scutellospora heterogama*, especially at higher doses of cadmium. At lower doses their behavior showed many similarities with *Glomus clarum* that also proved effective in this situation. Based on these results, it is concluded that mycorrhizal fungi are not recommended for use in case of planting of transgenic corn, since the mycorrhizal association did not benefit the plant growth. For further details regarding this interaction and the reasons for it not to have positive characteristics, basic research will be needed in specific laboratories, within a PHD thesis, for example. As for non-transgenic corn the utilization of these fungi can be indicated because it is possible for the farmer to obtain the benefits of the symbiosis even in soils contaminated by cadmium.

Keywords: Heavy metal, arbuscular mycorrhiza, commercial fertilizers, arbuscular mycorrhizal fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista geral do experimento, após 15 dias da semeadura. À esquerda, milho transgênico e, à direita, milho não-transgênico	36
Figura 2 - Diâmetro de colo para milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).	44
Figura 3 - Matéria seca de raiz para milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).	47
Figura 4 - Matéria seca de parte aérea para milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).	50
Figura 5 - Comprimento de micélio extrarradicular total em substrato com milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).	53
Figura 6 - Colonização micorrízica de milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).	56
Figura 7 - Número de esporos e fungos micorrizicos arbusculares em milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de cádmio em fosfatos de rocha.....	19
Tabela 2 - Teor de cádmio permitido em diversos tipos de fertilizantes fosfatados.	20
Tabela 3 - Níveis naturais de cádmio no ambiente.....	23
Tabela 4 - Condições, fatores e mecanismos que determinam os benefícios das micorrizas arbusculares no crescimento vegetal e revegetação de áreas degradadas.	32
Tabela 5 - Matriz de Correlação de Pearson para o fungo <i>Glomus clarum</i>	41
Tabela 6 - Matriz de Correlação de Pearson para o fungo <i>Acaulospora scrobiculata</i>	41
Tabela 7 - Matriz de Correlação de Pearson para o fungo <i>Scutellospora heterogama</i>	42
Tabela 8 - Análise de variância para diâmetro do colo	42
Tabela 9 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável diâmetro de colo de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrizicos.	43
Tabela 10 - Análise de variância para matéria seca de raiz.....	45
Tabela 11 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável matéria seca de raiz de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrizicos.	45
Tabela 12 - Teste de variância para a variável matéria seca de parte aérea	49
Tabela 13 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável matéria seca de parte aérea de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrizicos.	49
Tabela 14 - Teste de variância para variável comprimento de micélio extra radicular total....	52
Tabela 15 – Comparação de médias pelo teste de tukey para variável comprimento de micélio extraradicular total em m/g de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrizicos.	52
Tabela 16 - Teste de variância para a variável percentual de colonização de raiz.....	54
Tabela 17 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável percentual de colonização de raiz de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrizicos.	55
Tabela 18 - Teste de variância para a variável número total de esporos	57
Tabela 19 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável número total de esporos de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrizicos.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Alimentos transgênicos com destaque para o milho	14
3.2 Contaminação do solo pela adubação.....	16
3.3 Cádmio no ambiente	22
3.4 Cádmio e o crescimento vegetal.....	25
3.5 Associação entre plantas e microrganismos e sua utilização em solos contaminados por metais pesados.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Variáveis de crescimento.....	42
5.2 Variáveis microbiológicas	51
5.3 Análise de correlação.....	40
6. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

A população mundial superou recentemente a marca de 7,2 bilhões de pessoas, segundo a ONUBR. Esse crescimento populacional traz consigo uma grande demanda no uso dos recursos naturais do planeta, como o consumo de alimentos cuja produção precisa suprir essa necessidade.

Por causa disso, os produtores rurais passaram a intensificar a sua produção, o que causou a expansão das áreas agrícolas e o consumo maior de fertilizantes químicos. Esses fertilizantes além de possuírem os nutrientes considerados essenciais para o crescimento das plantas possuem também, em sua composição química outros elementos como os metais pesados, que podem ser prejudiciais tanto para o meio ambiente quanto para o homem.

No Brasil, a maioria dos solos utilizados para a produção agrícola é extremamente pobre em fósforo disponível, considerado um macronutriente essencial às plantas. A utilização de fertilizantes fosfatados nas suas diversas formas como o superfosfato simples, superfosfato triplo, fosfato monoamoniado, termofosfato e fosfato natural, tem contribuído com a adição de cádmio dos solos e conseqüentemente aos animais e plantas.

Outra questão que está sempre em discussão é a introdução de alimentos transgênicos na alimentação da população. A maioria das pessoas apresentam muitas desconfianças e dúvidas e tem receio de utilizar este tipo de alimento, pois como se tratam de produtos com alterações genéticas, existem suspeitas de que os mesmos possam causar danos à saúde.

Sabe-se que dentro dos produtos agrícolas. As alterações ocorrem na maioria das vezes com o objetivo de deixar a planta mais resistente a ação de agrotóxicos, microrganismos patogênicos e pragas. Mas será que essas alterações também deixam essas plantas resistentes também as ações de organismos benéficos que podem contribuir para o seu crescimento e sobrevivência tais como os fungos micorrízicos arbusculares?

A associação entre plantas e microrganismos do solo, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode contribuir para a proteção dos efeitos negativos do cádmio no seu crescimento. Uma das mais comuns é a micorriza arbuscular, formada entre as raízes de certas espécies de plantas e FMAs.

Tais fungos formam simbiose com cerca de 80% das espécies vegetais, sendo prioritariamente caracterizada por uma relação benéfica para ambos, com a planta fornecendo nutrientes para manutenção do metabolismo e sobrevivência do fungo e o fungo oferecendo à planta proteção contra estresses diversos e doenças.

Diversos estudos já foram realizados a fim de se avaliar a influência da contaminação por metais pesados na formação de micorriza e no crescimento de plantas hospedeiras, mas muito pouco foi estudado em como se dá essa relação com plantas transgênicas (PAWMOWSKA; CHARVAT, 2004; KIM et al. ,2004; SIQUEIRA et al.,1999; SILVA et al., 2006).

O presente trabalho objetiva conhecer a relação entre fungos micorrizicos arbusculares e hospedeiros de milho transgênico, que é resistente a ação de insetos da ordem Lepidótera e não transgênico mediante doses crescentes de cádmio como contaminante de fertilizante fosfatado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do cádmio no crescimento e na rizosfera de milho transgênico e não transgênico inoculado com fungos micorrízicos arbusculares, sob condições controladas.

2.2 Objetivos específicos

Registrar o efeito do cádmio no crescimento inicial de milho transgênico e não transgênico inoculado com fungos micorrízicos arbusculares, em condições controladas, por meio das variáveis resposta diâmetro de colo, matéria seca de raízes, matéria seca da parte aérea.

Identificar o efeito do cádmio na formação de propágulos na rizosfera e micorrização de milho transgênico e não transgênico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Alimentos transgênicos com destaque para o milho

Organismos transgênicos, ou geneticamente modificados, possuem material genético alterado pelo homem, feita através da transferência de genes de uma espécie para outra. Essas alterações começaram a ser feitas na década de 70 e atingiram o mundo todo, principalmente os alimentos (ALMEIDA; LAMOUNIER, 2005).

Na agroindústria, os organismos geneticamente modificados são considerados um grande avanço científico, pois caminham para a busca da melhoria e para o aumento do processo produtivo tão perseguido pelos produtores agrícolas da atualidade, pois pela tecnologia do DNA recombinante, conferem características que não são obtidas com o melhoramento das plantas por métodos convencionais, ou seja, pode conferir às culturas, melhor resistência a diversas condições consideradas críticas, e que em organismos normais causariam drásticas quedas produtivas (ALVES, 2004).

Mas, a introdução deste tipo de produto no mercado mundial gera inúmeras discussões, dúvidas e insegurança a respeito de riscos que os mesmos possam trazer quando adicionado à cadeia alimentar, mesmo porque, quando se diz respeito à utilização dessas biotecnologias em longo prazo, os riscos, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde, ainda são pouco conhecidos e um tanto quanto controversos. Essas incertezas acabam gerando conflitos e polêmicas dentre os grupos da sociedade favoráveis e daqueles contrários à utilização deste tipo de prática (RIBEIRO; MARIN, 2012).

Sendo assim, em 2000, estabeleceu-se pelo Protocolo de Cartagena o princípio da precaução, que visa à proteção da diversidade biológica e da saúde humana em relação aos danos que possam ser advindos da liberação dos organismos geneticamente modificados. Este princípio ainda estabelece normas-padrão de biossegurança e institui a utilização de rotulagem para os alimentos geneticamente modificados, para que os produtos possam ser rastreados e acompanhados de perto. A avaliação dos riscos de consumo desses tipos de alimentos deve ser realizada, bem como, normas de biossegurança a fim de que os mesmos sejam consumidos de maneira segura para a população (PRUDENTE 2004).

Segundo Mosquero (2005), a FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, afirma que os primeiros experimentos de campo realizados ocorreram em

1986 nos Estados Unidos e na França, mas, o primeiro país a dar início à comercialização de plantas transgênicas foi a China no início da década de 90, pela introdução do fumo resistente a vírus e, posteriormente, do tomate também resistente a vírus.

No Brasil, o primeiro produto a ter sua produção liberada foi à soja *Roundup Ready*, cuja patente pertence à multinacional norte americana Monsanto, que a desenvolveu pela introdução de um gene de uma bactéria do gênero *Agrobacterium*, que pertence ao solo, a fim de se aumentar a tolerância da soja ao herbicida glifosfato. Isso se deu no ano de 1995 por meio da lei de biossegurança número 8.974 (RIBEIRO; MARIN, 2012)(ALMEIDA; LAMOUNIER, 2005).

Após a concessão dessa autorização, organizações não governamentais, como o Greenpeace e o Instituto Nacional de Defesa do Consumidor – IDEC entraram com um processo contra a empresa Monsanto e o Governo Federal, com o intuito de proibir a comercialização deste tipo de produto. Com isso, essa comercialização ficou suspensa entre 1998 e 2003, quando o então presidente Luís Inácio Lula da Silva autorizou a medida provisória 113 em 26 de março de 2003 que permitia o uso comercial da soja transgênica para consumo humano e animal até janeiro de 2004. Mas, apenas em março de 2005 a lei 11.105 foi sancionada, regulamentando definitivamente a comercialização de produtos transgênicos no Brasil e revogando a lei número 8.974. A lei número 11.105 do ano de 2005 estabelece as normas de segurança e os mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados e seus derivados. Também cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, e dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB (PELAEZ, 2007).

Atualmente, além da soja, também são comercializados no Brasil o milho e o algodão transgênicos, juntos dominam cerca de 15,8 milhões de hectares de terras destinadas à produção agrícola, tornando o Brasil o terceiro país no mundo em produção de organismos transgênicos (RIBEIRO; MARIN, 2012).

O milho (*Zea Mays L.*) é uma gramínea anual, monocotiledônea pertencente à família Poaceae, gênero *Zea Mays L.* que teve origem nas Américas, possivelmente no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Logo após, o milho foi levado para a Europa onde passou a ser cultivado em jardins até que seu valor alimentício foi descoberto e a partir daí tornou-se conhecido. Desde então, passou a ser plantado em escala comercial e espalhou-se pelo mundo (OKUMURA et al., 2011).

O milho possui ampla adaptação a diferentes condições ambientais. É uma planta que armazena bastante energia, e a partir de uma semente que pesa pouco mais de 0,3 g, surge

uma planta com cerca de dois metros de altura em um curto espaço de tempo (PEREIRA FILHO, 2003).

A produção mundial de grãos de milho em 2009 ficou em torno de 817 milhões de toneladas, onde os Estados Unidos foram responsáveis por 333 milhões de toneladas, a China por 163 milhões de toneladas e o Brasil por 51 milhões de toneladas (OKUMURA et al., 2011).

Essas altas produtividades de milho têm sido garantidas em função da adaptação de cultivares às diversas variedades de situações, tais como, o clima, o solo, o melhoramento genético e a utilização de fertilizantes químicos (OKUMURA et al., 2011).

Em países como Canadá, Estados Unidos e França, o rendimento médio do milho chega a ultrapassar os 12.000 kg ha⁻¹ de grãos, o que é bastante expressivo quando comparados ao Brasil que fica em torno de 3.000 kg ha⁻¹ de grãos (ALVES et al., 2002).

No Brasil, o milho é cultivado por todo o território, com produção razoável em função da utilização de baixa tecnologia devido a pouca capitalização dos pequenos produtores que respondem por aproximadamente 60 % da produção nacional. Acredita-se que uma das formas de aumentar essa produção seria a utilização de programas de adubação que considerem, além da quantidade de fertilizantes fornecidos, o balanço entre os nutrientes requeridos, aliado às condições climáticas adequadas, principalmente em termos de precipitação, ou do manejo de água no solo, através da irrigação (ALVES et al., 2002).

Na indústria o milho é empregado como matéria prima na fabricação de amido, óleo, farinha, produtos químicos e rações de animais. Estima-se que hoje esse cereal participe como matéria prima de cerca de 600 produtos, além de outras áreas como explosivos, baterias, cabeças de fósforo e borrachas (PEREIRA FILHO, 2003).

3.2 Contaminação do solo pela adubação

Uma das limitações para a produção de milho, no Brasil, tem causa na fertilidade do solo, principalmente nos teores disponíveis de P. A maioria dos solos brasileiros tem deficiência de fósforo, possuindo uma forte interação com este, e para que se mantenham as produções em níveis altos, a adubação fosfatada é muito utilizada, sendo que no Brasil em maior quantidade do que em outros países (ALVES et al., 2002).

Essa adubação fosfatada promove então, aumentos significativos na produção de grãos de milho e também nos teores de fósforo disponíveis no solo. A resposta das culturas de milho a esse tipo de adubação tem sido altas e cada vez mais frequente (ALVES et al., 2002).

O que acaba se tornando preocupante, é a utilização desse tipo de adubação acima dos limites julgados necessários ao desenvolvimento adequado da cultura, podendo causar no solo e na própria planta, acúmulos de substâncias tóxicas tanto para as plantas quanto para quem dela se alimentar.

De acordo com Gonçalves Junior e Pessoa (2002), existe uma crescente preocupação com a deficiência de nutrientes em solos agricultáveis, pois o cultivo em solos com baixa fertilidade, sem a prática de correção do solo, aliado ao aumento da produtividade tem contribuído cada vez mais com a deficiência de nutrientes. Por isso, o uso de adubos ou fertilizantes tem se tornado cada vez mais intenso e, freqüentemente feito de maneira indiscriminada por agricultores do país todo, a fim de, suprir os problemas da produção agrícola atual. Mas esses fertilizantes possuem em sua composição química além de micronutrientes, outros compostos dentre os quais, os mais preocupantes são os metais pesados.

O aumento da concentração de metais pesados nos solos agricultáveis resulta da deposição atmosférica, aplicação de agrotóxicos, resíduos orgânicos e inorgânicos urbanos e industriais, fertilizantes e corretivos (GONÇALVES JUNIOR; PESSOA, 2002).

No mundo todo existem órgãos governamentais que estabelecem limites com o objetivo de se controlar a quantidade de metais pesados presentes na composição química dos fertilizantes, como por exemplo, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) que é uma organização internacional com 34 países, a Associação Americana de Controle Oficial de Fertilizantes, nos Estados Unidos, entre outras.

No Brasil a Instrução Normativa SDA nº27 de 05 de julho de 2006, elaborada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabelece os limites para os contaminantes na composição química dos fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes para serem produzidos, importados ou comercializados.

Segundo o artigo 2º, os estabelecimentos que produzem ou importam fertilizantes devem manter um controle periódico de matérias-primas e dos seus produtos. Já o artigo 3º estabelece que nos resultados analíticos obtidos, são admitidas tolerâncias limitadas a 30% dos valores que são definidos pela Norma. São estabelecidos valores, através de tabelas, para cada tipo de fertilizante e também para substratos para plantas e condicionadores de solo.

No Brasil trabalhos vêm sendo realizados continuamente, a fim de se determinar os teores de metais pesados presentes em fertilizantes comerciais, quantificando a contribuição dos mesmos à contaminação de solos e águas, que trazem sérias consequências negativas ao meio ambiente e, conseqüentemente, para as plantas, animais e seres humanos.

Segundo Mc Bride e Spiers (2001), os fertilizantes fosfatados possuem maiores concentrações de metais pesados em sua composição química do que os nitrogenados e potássicos, por consequência, o cádmio, apresentando uma maior propensão à contaminação dos solos.

O fósforo, que é um macronutriente de extrema importância para os processos metabólicos das plantas, é um dos maiores responsáveis por queda de produtividade em culturas agrícolas e a fim de se evitar esse problema, os agricultores fazem uso tanto de fosfatos naturais como de fosfatos parcialmente acidulados e fosfatos solúveis. (BIZARRO, 2007).

Esses fosfatos, mais utilizados na agricultura são obtidos a partir das rochas fosfáticas e podem apresentar, portanto, diversas concentrações de cádmio, dependendo da origem da rocha utilizada (McLAUGHLIN et al., 1999).

De acordo com Teixeira et al. (2000) as rochas são produtos consolidados resultantes da união natural de minerais, onde seus cristais ou grãos constituintes são muito bem unidos. Da maneira que ocorre o processo de formação dessas rochas, a força de ligação desses grãos varia resultando em rochas “duras” e rochas “brandas”. Essas rochas podem ser magmáticas ou ígneas, metamórficas ou sedimentares, que se dão de acordo com a maneira que são encontradas na natureza.

As rochas ígneas podem ser intrusivas, quando o resfriamento do magma acontece no interior do globo terrestre e extrusiva ou vulcânica, quando ocorre na superfície, sendo a mais comum o basalto. As rochas metamórficas resultam da transformação de uma rocha pré-existente no estado sólido. Já as sedimentares são formadas a partir da compactação e/ou cimentação de fragmentos produzidos pela ação dos agentes e intemperismo e pedogênese sobre uma rocha pré-existente, e após serem transportados pela ação dos ventos, das águas que escoam pela superfície, ou pelo gelo, do ponto de origem até o ponto de deposição (TEIXEIRA et al., 2000).

Ainda segundo Teixeira et al. (2000), as rochas sedimentares podem ser clásticas, quando é constituída por partículas pré-existentes, ou químicas e não clásticas que são formadas pela precipitação dos radicais salinos que foram produzidos pelo intemperismo químico e agora encontram-se dissolvidos nas águas dos rios, lagos e mares. Entre os

principais ânions salinos estão os carbonatos, cloretos e sulfatos, e os principais cátions são os mais solúveis os alcalinos, como sódio e fósforo e os alcalinos terrosos magnésio e cálcio.

É desse grupo que se tem origem as rochas fosfáticas mais utilizadas para a obtenção de fertilizantes fosfatados.

O cádmio que se encontra presente na composição química desses fertilizantes se encontra em posição de impureza, e em muitos solos destinados a agricultura esse metal pesado pode se acumular podendo ficar em concentrações maiores do que o dobro das encontradas em áreas com vegetação nativa, devido ao uso em excesso desses produtos (GIMENO-GARCIA et al., 1996 ; MARQUIORU JR, 2003).

A tabela 1 mostra concentrações de cádmio em fosfatos de rocha no mundo.

Tabela 1 - Concentrações de cádmio em fosfatos de rocha.

Origem	Teor de cádmio (mg kg ⁻¹)
China	05
México	08
Egito	09
Peru	11
Israel	12
Marrocos	24
Tunísia	38
Estados Unidos (oeste)	60-340

Fonte: Adaptado de Bizarro (2007)

Já a tabela 2 mostra o teor de cádmio permitido em diversos tipos de fertilizantes fosfatados em diversos países.

Tabela 2 - Teor de cádmio permitido em diversos tipos de fertilizantes fosfatados.

Instituição	País	Material	Teor de Cádmio mg kg ⁻¹
	Suíça	Fertilizante	50
	Suécia	Fertilizante	100
OEDC	Alemanha	Fertilizante	210
	Áustria	Fertilizante	275
AAPFCO	Estados Unidos	Fertilizante	10*
	-----	91% da rocha fosfática	4*
MAPA	Brasil	Fertilizante	0,75*
-----	Austrália	Fertilizante	300
-----	Japão	Fertilizante	8

OEDC – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

AAPFCO – Associação Americana de Controle Oficial de fertilizantes

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

*mg de Cd por 1% de P₂O₅

Fonte: Adaptado de Bizarro (2007)

Alguns trabalhos já foram realizados no Brasil a fim de se determinar as concentrações de cádmio nos fertilizantes comercializados.

Campos et al. (2005) verificaram que em fertilizantes fosfatados as concentrações de cádmio variam de 0,5 a 170 mg kg⁻¹. Já Gonçalves e Pessoa (2002) estudaram cinco tipos de fertilizantes e encontraram concentrações de cádmio de 4 a 323 mg kg⁻¹, ao passo que Marçal et al. (2003) encontraram uma variação de 0,8 a 18,8 mg kg⁻¹ (BIZARRO, 2007).

Já Malavolta e Moraes (2006) fizeram uma revisão bibliográfica sobre trabalhos que estudavam teores de cádmio em fertilizantes comerciais brasileiros e os autores por eles citados encontraram que no grupo de fertilizantes fosfatados o teor de cádmio variou de 0 a 77 mg de Cd por kg⁻¹ de fertilizante. Como se pode perceber, existe bastante dispersão nos resultados obtidos pelos pesquisadores. Portanto, estudos como esses são cada vez mais necessários, a fim de se evitar que o uso exagerado desse produto possa causar graves consequências ambientais.

Gonçalves Junior et al. (2000), estudaram cinco tipos de fertilizantes comerciais utilizados aqui no Brasil, a fim de se avaliar a fitodisponibilidade dos metais cádmio, chumbo e crômio na cultura de soja (*Glycine max L.*), que foram cultivadas em um latossolo vermelho

escuro. A aplicação desses fertilizantes no solo utilizado no experimento foi feita de acordo com a recomendação dos fabricantes. Os autores concluíram que a aplicação dos fertilizantes mostrou uma efetiva disponibilização de Cd, Pb e Cr para as plantas de soja. Em relação ao cádmio, os fertilizantes que mais o disponibilizaram para a cultura foram o BR-12 especial e FTE – Cerrado, que conseqüentemente apresentam maior quantidade de cádmio em sua composição química.

Ramalho et al. (1999) avaliaram a influência da adubação fosfatada na contribuição do aumento da concentração de metais pesados em solos. Este estudo foi realizado em solos de Campos dos Goytacazes no Rio de Janeiro na Usina Santa Cruz, onde se cultiva cana-de-açúcar em um solo podzólico amarelo e dois latossolos amarelos que vêm recebendo adubação fosfatada desde 1968. Percebeu-se, então, que a utilização deste tipo de fertilizante por mais de 25 anos causaram um aumento significativo dos teores de cádmio, mas sem elevá-los a níveis críticos.

Foi realizado também por Gonçalves et al. (2008), um estudo que objetivou descobrir a biodisponibilidade do Cd em fertilizantes fosfatados por meio do seu acúmulo em plantas de aveia preta. Neste trabalho foram estudados cinco tipos de fertilizantes e constatou-se que o Cd ficou biodisponível para os cinco fertilizantes analisados, pois foi encontrado tanto nas raízes quanto na parte aérea das plantas.

Já Bizarro et al. (2008) estudaram fertilizantes nacionais e importados que são mais utilizados no Brasil e concluíram que os materiais fosfatados de origem brasileira não possuem tanta concentração de Cd em sua composição quanto os materiais encontrados em outros países, corroborando com diversos outros autores, segundo eles, Alloway (1995) e Sauerbeck (1984). Portanto, os fertilizantes que mais apresentaram concentração de Cd foram os importados, ou seja, precisa-se desenvolver maior rigor na entrada deste tipo de produto no Brasil.

Campos et al. (2005) também chegaram a conclusão de que os fosfatos de rochas brasileiras possuem menor quantidade de Cd do que as estrangeiras. Neste caso foi determinado os teores de Cd, Cr, Ni, Pb e Zn, e concluiu-se que os fosfatos de rocha estrangeiros chegam a apresentar nove vezes mais cádmio do que os brasileiros, o que reforça a observação feita por Bizarro et al. (2008).

De acordo com Bizarro (2007), mesmo que nos solos não sejam encontrados elevados teores de cádmio, ele pode permanecer em forma biodisponível por muitos anos, sendo que a sua meia vida é estimada de 15 a 1100 anos.

Portanto, quanto mais informações forem obtidas sobre o cádmio e os efeitos que o mesmo possa provocar tanto para o meio ambiente quanto para a saúde dos seres humanos, mais as consequências negativas poderiam ser evitadas.

3.3 Cádmi

O cádmio é um metal pesado muito abundante na natureza, mas não muito encontrado em estado livre na natureza, pertence ao grupo IIB da Tabela Periódica, juntamente com o zinco (Zn) e o mercúrio (Hg). Está normalmente associado a sulfetos em minérios de zinco, chumbo e cobre. Sua primeira purificação aconteceu no ano de 1817, mas sua utilização em produção comercial se tornou importante somente no século 20 (PERNIA et al., 2008; CARDOSO; CHASIN, 2001).

Bizarro (2007) afirmou que a concentração de cádmio na crosta terrestre fica em torno de 0,17 mg kg⁻¹. Altas concentrações do mesmo podem ser encontradas em rochas sedimentares e fosfatos marinhos, que geralmente contém cerca de 15 mg de cádmio por kg de rocha.

As condições climáticas são fortemente influentes no transporte deste metal na natureza, levando o mesmo aos rios e oceanos. Um cálculo grosseiro estima que cerca de 15.000 toneladas/ano de cádmio participam do ciclo natural dessa maneira (CARDOSO; CHASIN, 2001).

As altas concentrações encontradas em solos são normalmente próximas a áreas de depósito de minérios de zinco, chumbo e cobre. Essas áreas são frequentemente caracterizadas pela contaminação local tanto do solo quanto da água (CARDOSO; CHASIN, 2001).

Ainda segundo Cardoso e Chasin (2001) em áreas que se encontram distantes destes locais, onde o cádmio ocorre de maneira natural no solo, a concentração do mesmo varia de 0,1 a 0,4 mg kg⁻¹, sendo que sua principal fonte natural se dá através de atividade vulcânica onde as emissões ocorrem tanto em períodos de erupção quanto durante os períodos de baixa atividade, a tabela 3 ilustra os níveis naturais de cádmio no ambiente.

Tabela 3 - Níveis naturais de cádmio no ambiente.

Meio	Concentração	Referência
Atmosfera	0,1 a 4 ng/ m ³	WHO (1992)
Crosta Terrestre	0,01 a 0,4 ppm	WHO (1992)
Solos Vulcânicos	4,5 ppm	ATSDR (1997)
Rochas Sedimentares	Até 15 ppm	WHO (1992)
Água do mar	< 0,5 ng/L (água superficial)	ATSDR (1997)
Água doce	~ 0,1 µg/L	ATSDR (1997)
Gelo	5 pg/g (Ártico) 0,3 pg/g (Antártico)	WHO (1992)

Fonte: adaptada de Cardoso e Chasin (2001)

De todos os metais pesados tóxicos encontrados no meio ambiente que possuem utilização na indústria, o cádmio é o que possui maior interesse clínico porque as intoxicações provocadas por ele são de difícil tratamento (LUCHESE, 2007).

A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos colocou o cádmio em 7º lugar no *ranking* das 20 substâncias mais perigosas e também está classificada como um dos 11 metais mais tóxicos, persistentes e biocumulativos no meio ambiente (LUCHESE, 2007).

As emissões de cádmio, tanto de fontes naturais quanto antropogênicas, ocorrem para o ar, água e solo, e o intercâmbio que ocorre entre eles é de extrema importância. O cádmio emitido no ar tem maior mobilidade que na água que por sua vez é maior que no solo (CARDOSO; CHASIN, 2001).

A contaminação do solo por cádmio se dá a partir de resíduos sólidos, dentre os quais os principais são os que resultam de manufatura de artigos que contenham Cd, resíduos de cinzas de incineradores, cinzas da queima de combustíveis sólidos, resíduos de cimento, lixo municipal e de esgoto. São também importantes contribuintes para a contaminação de solos por cádmio, minas de metais não ferrosos e fundições e aplicação de fertilizantes fosfatados, que representam uma contaminação em solo arável. A quantidade de Cd presente neste tipo de produto varia muito, dependendo da rocha fosfática que deu origem ao mesmo e, sob contínua aplicação, tem causado aumento gradativo na contaminação por cádmio (CARDOSO; CHASIN, 2001).

Cardoso e Chasin (2001) ainda afirmaram que o Cd pode ser removido da atmosfera através de deposição seca ou precipitação. O pH, reações de oxi-redução e formação de complexos se tratam de fatores importantes que afetam a mobilidade do Cd, que pode participar de trocas iônicas em superfícies negativamente carregadas de minerais argilosos.

O cádmio também pode precipitar como compostos insolúveis ou formar complexos ou quelatos pela interação com a matéria orgânica sendo, neste caso, mais efetiva na captação e imobilização de Cd (ASTDR, 1997).

Os níveis de contaminação existentes no ar influenciam diretamente na contaminação da superfície do solo através de deposição e precipitação.

Com respeito à biodegradação e a degradação abiótica de Cd no solo, os processos de transformação ocorrem através de absorção e dessorção por água, que incluem precipitação, dissolução, complexação e troca iônica. Os fatores mais importantes que influenciam diretamente em sua transformação são capacidade de troca iônica, pH e o conteúdo de argilas e carbonatos minerais e óxidos, matéria orgânica e água (CARDOSO; CHASIN, 2001).

Estima-se que uma vez no solo, a vida média do cádmio do mesmo gira em torno de 15 – 30 anos, dependendo da forma em que ele se encontra (PERNIA et al., 2008).

Já sua bioacumulação se dá de diversas maneiras nos diferentes tipos de organismos presentes em um ecossistema. Nos microrganismos o cádmio inibe a mineralização de nitrogênio e fósforo e particularmente com os fungos inibe a germinação de esporos, prejudica o crescimento e funcionamento correto das hifas, afeta o potencial de colonização radicular, atua diretamente na composição da comunidade de fungos e também sofrem todos os efeitos negativos que o metal ocasiona nas plantas (NOGUEIRA; SOARES, 2010).

Nas plantas a quantidade de cádmio absorvida se deve ao pH e a sua quantidade presente no solo. A habilidade de um solo de realizar adsorção está diretamente ligada a diversas características, dentre as quais cabe destacar a natureza da sua fase sólida inorgânica, pH, teor de matéria orgânica, capacidade de troca de cátions e a presença de outros íons (LINHARES et al., 2009). Quanto maior o pH do solo menos cádmio fica disponível em solução sendo, portanto, menos absorvido pelas plantas, ou seja, a adsorção de cádmio por partículas do solo é maior em pH neutro e alcalino do que em pH ácido (CARDOSO; CHASIN, 2001).

Inicialmente, os contaminantes são adsorvidos nos solos através de trocas iônicas ou interações eletrostáticas, forças de Van der Waals ou ligações químicas estáveis. À medida que esses solos vão envelhecendo os metais podem vir a fazer parte da estrutura de alguns minerais (ARAÚJO et al., 2000). Esses fatores se comportam da mesma maneira em solos contaminados ou não. Essa disponibilidade para as plantas pode variar com o decorrer do tempo, afinal, tanto tratamentos naturais quanto antropogênicos como a adubação, por exemplo, podem alterar o pH do solo (CARDOSO; CHASIN, 2001).

Cardoso e Chasin (2010) também discorrem que conhecendo a concentração de cádmio em solos agricultáveis e utilizando-se de modelos matemáticos, cientistas puderam constatar que devido à utilização de fertilizantes fosfatados e deposição atmosférica deverá ocorrer na Dinamarca um aumento em torno de 0,6 % ao ano de concentração de cádmio no solo, o que corresponde a um aumento de 70% na presença de cádmio na dieta da população durante os próximos 100 anos. Esta relação tem grande importância, afinal a maior fonte de contaminação dos seres humanos por cádmio se dá devido ao consumo alimentar e ao hábito de fumar.

3.4 Cádmio e o crescimento vegetal

As plantas se comportam tanto como um mecanismo de transferência como uma importante barreira, podendo restringir ou não a adsorção deste elemento pelo solo. A solubilização pelos exsudados de raízes é o principal mecanismo de absorção de metais pelas plantas.

O cádmio pode influenciar na absorção pelas plantas de outros elementos presentes no solo que são necessários para o seu crescimento, entre eles, os elementos minerais essenciais, especialmente cátions potencialmente competidores como Zn, Mn, Fe e Cu (NASCIMENTO; PEREIRA, 1997).

Clemens (2006) afirma que o cádmio também se utiliza de outras substâncias como transporte para poder entrar nas plantas, afinal é de sua natureza estar sempre atrelado a outro metal, dentre os quais podem ser citados Ca^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . A principal causa da toxidez por Cd parece acontecer devido a sua combinação com grupos tiólicos (- SH) de enzimas e proteínas o que provoca problemas no metabolismo vegetal, por exemplo, o Cd acaba substituindo o Zn em diversas metaloenzimas, alterando as suas atividades (PAIVA et al., 2001).

Quando os metais são mobilizados e capturados pelas células das raízes das plantas, se concentram inicialmente na parede celular de células epidérmicas, mas posteriormente são translocados através de troca iônica para o resto da planta (PERNIA et al., 2008).

Os efeitos mais observados por diversos autores da intoxicação de plantas por cádmio são redução do crescimento e do alongamento das raízes, inibição da abertura estomática, inibição da síntese de clorofila, inibição da fotossíntese, clorose, diminuição da quantidade de carotenoides, diminuição da taxa de transpiração, inibição da formação de pólen e do

crescimento do tubo polínico, aumento dos níveis de peroxidação lipídica, estresse oxidativo e enzimas antioxidantes, inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial, interferência com a absorção, transporte e uso de vários macro e micronutrientes, especialmente Fe, Mn e Zn, distúrbio do controle redox entre outros (GUIMARÃES et al., 2008; PERNIA et al., 2008; BAPTISTA, 2009).

Já os animais herbívoros se contaminam através do consumo de plantas que contenham esse metal, e assim se dá a introdução do mesmo a níveis mais altos da cadeia alimentar. Em mamíferos e pássaros, o cádmio é normalmente encontrado nos rins e fígado. Nos mamíferos de vida longa tais como o cavalo e o alce, o cádmio se acumula em grande quantidade, demonstrando que existe uma bioacumulação à medida que a idade dos mesmos aumenta (CARDOSO; CHASIN, 2001).

A toxicidade por cádmio é similar em humanos e animais, portanto, estudos realizados com ratos, camundongos, coelho e macacos podem ser utilizados como base para se extrapolar os efeitos negativos do metal para seres humanos. As intoxicações agudas podem ocorrer através da ingestão de concentrações consideradas altas por meio de bebidas ou comidas que contenham cádmio em sua composição. Sintomas gastrointestinais como náuseas, vômitos, diarreias agudas e dores abdominais são observados quando se consome bebidas com aproximadamente 16 mg/mL de Cd (CARDOSO; CHASIN, 2001).

Devido a esses efeitos extremamente negativos, nas últimas décadas surgiram em diversos lugares do mundo legislações com o objetivo de reduzir a utilização de cádmio, principalmente nos países desenvolvidos.

No Brasil, existem algumas resoluções voltadas para o controle ambiental e ocupacional do cádmio. Com relação ao meio ambiente, em nível federal existem várias resoluções CONAMA, das quais se pode exemplificar:

- Resolução CONAMA nº257 de 30 de junho de 1999 – estabelece a devolução de baterias ao fabricante, importador ou distribuidor;
- Resolução CONAMA nº20, de 18 de junho de 1986 – estabelece a classificação das águas e estabelece indicadores específicos, de modo a assegurar seus usos preponderantes;
- Resolução CONAMA nº264, de 26 de agosto de 1999 – define procedimentos, critérios e aspectos técnicos específicos de licenciamento ambiental para coprocessador de resíduos em fornos rotativos de clínquer, para a fabricação de cimento.

Segundo Cardoso e Chasin (2001), a legislação brasileira ainda é precária no que diz respeito ao cádmio, ainda sendo necessárias ações sistemáticas mais efetivas.

No Brasil diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de se obter com mais exatidão os efeitos que uma contaminação por cádmio pode gerar em um ecossistema, e mostram tanto reações dos diferentes tipos de solo, como de diversos tipos de plantas.

Nascimento e Pereira (1997) estudaram a absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em duas espécies de feijão, Ouro negro e Carioca, e concluíram que o aumento da concentração de Cd em solução provoca aumento no conteúdo do elemento nas raízes e na parte aérea das duas espécies estudadas. Concluíram também que à medida que as doses de cádmio aumentavam na solução nutritiva, os conteúdos de zinco (Zn) e manganês (Mn) diminuía nas plântulas de ambas as espécies cultivadas e esse efeito é mais pronunciado na raiz do que na parte aérea.

Em Latossolos brasileiros o que influencia na adsorção e dessorção de cádmio, além dos atributos físicos, químicos e mineralógicos é o pH da solução do solo. Pierangeli et al. (2005), realizou este estudo, e os resultados apontaram que quando o pH aumentou de 4,5 para 6,5 a adsorção de Cd aumentou em 30 %.

Já Linhares et al. (2009) estudaram a adsorção de cádmio e chumbo em solos tropicais altamente intemperizados e descobriram que nos solos estudados, quatro tipos de Latossolo e um tipo de Argissolo, a adsorção do cádmio é caracterizada através de mecanismos predominantemente eletrostáticos, com adsorção não específica, e o pH e a CTC são os atributos do solo mais influentes.

Oliveira et al. (2010) avaliaram a adsorção e deslocamento do íon cádmio em Latossolo vermelho acriférico, Argissolo vermelho eutrófico, Nitossolo vermelho eutrófico e Neossolo quartzarênico, e afirmaram que de um modo geral, o Neossolo quartzarênico apresentou maior propensão ao deslocamento do cádmio, seguido pelo Latossolo, Argissolo e Nitossolo. Isso pode ter uma relação direta com as características já abordadas que interferem diretamente na adsorção do cádmio pelo solo, tais como pH, presença de matéria orgânica e de óxidos de ferro e alumínio, sendo que quanto maior uma dessas concentrações, maior é a adsorção de metais pelo solo.

Gonçalves et al. (2009) estudaram o crescimento *in vitro* de plântulas de duas cultivares de batata em diferentes doses de cádmio, e observaram que com o aumento das doses de cádmio o crescimento das duas cultivares foi bastante afetado, o que demonstra que ambas possuem sensibilidade a este metal.

Paiva et al. (2001) verificaram o efeito da aplicação de doses crescentes de cádmio sobre o teor de nutrientes e de cádmio na raiz, no caule e nas folhas de mudas de cedro, cultivadas em solução nutritiva. Certificou-se que em mudas de cedro a aplicação de Cd promove um aumento no teor de P, S e Ca, já com relação aos micronutrientes houve um aumento no teor de Cu e Fe e uma redução nos teores de Mn e Zn na raiz; no caule ocorreu um aumento no teor de Cu e Zn e uma redução de Fe e Mn; nas folhas o teor de Fe sofreu um aumento e uma redução nos outros. Portanto, pode-se concluir que o Cd em mudas de cedro afeta principalmente o teor de micronutrientes.

Com relação à contaminação de solos e plantas pelo uso de fertilizantes, Gonçalves Junior et al. (2000) avaliaram a fitodisponibilidade dos metais cádmio, chumbo e crômio em soja cultivada em um Latossolo vermelho escuro, e concluíram que aplicação de fertilizantes contendo micronutrientes mostrou uma efetiva disponibilidade desses três metais para as plantas e, a medida que se aumentava a dosagem de aplicação dos mesmos, aumentou-se a concentração dos três metais nas plantas.

Juliatti et al. (2002) realizaram um estudo avaliando a aplicação de bio-sólido como fertilizante, também uma grande fonte de contaminação por metais pesados. As principais conclusões atingidas por essa pesquisa foram que, a alta concentração de Cd total no latossolo vermelho restringiu-se apenas à camada de sua incorporação, ou seja, não houve movimento do metal na coluna do solo, e também, que a concentração de 12 mg kg⁻¹ de Cd na parte aérea das plantas de milho não foram suficientes para que se houvesse manifestação de sintomas de fitotoxicidade causado pelo mesmo.

Isso mostra que se deve manter grande atenção quando se consome algumas plantas cultivadas nessas condições *in natura*, afinal elas podem estar contaminadas por metais pesados, mas não manifestarem visivelmente nenhum tipo de sintoma.

Por último menciona-se o estudo realizado por Cunha et al. (2008) onde o objetivo foi estudar a biodisponibilidade de Cd e Zn em plantas de milho em solo com e sem calagem através da utilização de diversos tipos de extratores, bem como avaliar o efeito de doses crescentes destes mesmos metais no crescimento e acúmulo nas plantas e identificar sintomas visuais de toxidez e alterações anatômicas em folhas e raízes.

Concluiu-se então que os níveis críticos tóxicos de cádmio no solo variaram de 8,7 a 13,1 mg kg⁻¹ tanto com ou sem calagem. Os sintomas observados causados pela toxidez por Cd foram clorose, encarquilhamento e enrolamento das folhas, bem como, aumento da lignificação das paredes celulares da epiderme e colênquima, do tecido vascular e da endoderme (CUNHA et al., 2008).

3.5 Associação entre plantas e microrganismos e sua utilização em solos contaminados por metais pesados

O que tem sido bastante difundido ultimamente nos estudos de biorremediação ou fitorremediação de solos contaminados, principalmente por metais pesados, é o uso combinado de plantas acumuladoras e microrganismos, que quando trabalham juntos acaba se tornando mais eficiente na recuperação de áreas degradadas.

Os microrganismos ocupam cerca de 0,5% do espaço poroso existentes no solo, mas esse valor aumenta e muito dentro da zona rizosférica que é a região onde a grande maioria dos microrganismos se encontra, pois se trata da área que fica sob influência das raízes das plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A associação entre microrganismos e plantas tem inúmeras vantagens para ambos os participantes, pois ocorre uma troca benéfica, as plantas dão aos microrganismos nutrientes necessários para a sua sobrevivência como carbono, e o microrganismo oferece para planta proteção contra predadores, parasitas e estresses ambientais (NOGUEIRA; SOARES, 2010).

Existem alguns tipos de relações simbióticas entre microrganismos e plantas, dentre as quais se podem ser citados os fixadores de nitrogênio em leguminosas (formando nódulos radiculares) e os formadores de micorriza.

As micorrizas são associações estabelecidas entre algumas espécies de fungos e plantas, onde ambos desenvolveram a capacidade de se comunicarem molecularmente através de mecanismos de reconhecimento, tropismo e tactismo que possibilitam uma interação célula-célula e a integração morfológica e funcional, que são essenciais para a formação de uma relação simbiótica, ou seja, uma relação benéfica a ambos os participantes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Existem diversos tipos de micorrizas, formados por várias espécies de fungos e plantas, sendo as mais comuns as arbusculares e as ectomicorrizas.

As micorrizas arbusculares originaram-se a cerca de 350 milhões de anos e constitui-se um importante elemento de ligação direta entre o sistema radicular das plantas e o solo. Quando se estabelecem nas raízes das plantas, os fungos micorrízicos arbusculares contribuem para um maior crescimento e sobrevivência das plantas e promove também a agregação do solo, facilitando, assim, a revegetação de áreas degradadas com grande potencial de aplicação nas áreas contaminadas por metais pesados (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

Os fungos micorrízicos arbusculares são os tipos de fungos mais comuns existentes nos solos e formam a relação simbiótica mais frequente com as raízes da maioria das plantas. Trata-se de fungos biotróficos obrigatórios, que não completam o seu ciclo de vida sem uma relação simbiótica. Seus esporos constituem sua única fase independente de plantas e possuem uma parede celular espessa e um diâmetro médio entre 50 e 100 μm . Esses esporos germinam em condições de umidade e temperatura apropriadas e as hifas crescem por duas a três semanas (GARG; CHANDEL, 2011).

Segundo Moreira e Siqueira (2006) as micorrizas arbusculares são formadas por fungos asseptados que colonizam as raízes das plantas. Cerca de 80% das espécies de plantas formam este tipo de micorriza; já as ectomicorrizas são formadas, em geral, por fungos septados que entram intercelularmente no córtex das raízes formando a rede de Hartig e gerando intensas modificações nas raízes colonizadas sendo mais comuns em áreas de clima temperado. De acordo com Nogueira e Soares (2010), as micorrizas, na verdade, são regras entre as plantas, ou seja, são poucas espécies de vegetais que não possuem capacidade de formar essa simbiose.

As comunidades de fungos micorrízicos arbusculares influenciam um grande número de processos que ocorrem no ecossistema incluindo a produtividade e a diversidade das plantas e a estrutura do solo, ou seja, as atividades desses fungos têm múltiplas funções que não só melhoram o desempenho da planta, mas também tem um papel crucial no desenvolvimento das propriedades e da saúde do solo, bem como do ecossistema como um todo (GARG; CHANDEL, 2011).

Recentemente, vem sendo estudado e relatado que as micorrizas arbusculares atuam na atenuação de estresses ambientais em suas plantas hospedeiras, dentre os quais se podem citar os danos causados por excesso de metais pesados no solo (NOGUEIRA; SOARES, 2010).

Segundo Weissenhorn et al. (1993), a toxicidade por metais pesados nos microrganismos do solo e nos processos por eles mediados, é objeto de uma crescente preocupação, bem como os efeitos desses metais a longo prazo na funcionalidade dos solos, que estão ainda muito distantes de serem completamente entendidos pela comunidade científica.

Como já foi citado anteriormente, cada vez mais têm sido estudadas, as técnicas de fitorremediação para recuperação de áreas degradadas, principalmente as contaminadas por metais pesados. Por isso, as plantas utilizadas para esta finalidade devem imobilizar o metal nas raízes e apresentar pouca translocação para a parte aérea. Senso assim existe um grande potencial no uso de micorrizas arbusculares, pois estas podem facilitar o estabelecimento

dessas plantas em ambientes que tenham sido degradados pela ação do homem, sobretudo nos locais com baixa fertilidade do solo, ou pela presença de substâncias tóxicas as plantas como os metais pesados. Assim, as micorrizas arbusculares apresentam um efeito tamponante aumentando a capacidade da planta de absorver os metais pesados quando a disponibilidade dos mesmos no solo é baixa ou até mesmo diminuindo essa capacidade quando a disponibilidade dos mesmos no solo é alta (NOGUEIRA; SOARES, 2010).

As micorrizas arbusculares possuem um papel biocontrolador quando exercem o trabalho de amenizar os danos causados por estresses abióticos, tais como contaminação por metais pesados, e ajudam assim, a promover uma melhoria na agregação do solo. Esses benefícios são importantes para técnicas como a recuperação de áreas degradadas e são relacionados com a responsividade das espécies e com o nível do estresse ambiental (SIQUEIRA et al., 2007).

De acordo com Nogueira e Soares (2010) o excesso de poluição no solo pode causar uma alteração na qualidade e na quantidade da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares, ou seja, eles podem também ser utilizados como bioindicadores dos efeitos das alterações que o homem faz no meio ambiente.

O componente essencial da ação recuperadora das micorrizas arbusculares é o micélio extraradicular, pois faz a conexão entre a superfície das raízes das plantas e as partículas do solo e aumenta a superfície de absorção de água e nutrientes, o que facilita um contato íntimo entre o sistema radicular das plantas e o solo, além de poder transferir nutrientes entre as plantas de mesma espécie ou não (SIQUEIRA et al., 2007). O principal efeito dos metais pesados nos fungos micorrízicos arbusculares é a inibição da germinação dos esporos e do desenvolvimento de hifas, o que pode acarretar atraso ou inibição da formação da micorriza. Mas o efeito negativo que ele causa na planta hospedeira pode também influenciar negativamente os fungos. Portanto, os metais pesados em excesso no ambiente pode alterar a composição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares suprimindo os mais sensíveis e favorecendo os que se adaptam melhor as condições existentes.

Para as plantas em áreas degradadas um dos benefícios mais notados decorre das melhorias nutricionais onde a absorção de micronutrientes, por exemplo, é aumentada pela ação das micorrizas e pelo efeito secundário na melhoria da tolerância a estresses diversos. Existem evidências de que de elas podem amenizar os efeitos fitotóxicos do excesso de metais pesados no solo facilitando assim o crescimento da planta hospedeira (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

Ainda segundo Klauberg-Filho (2005), os efeitos positivos podem ser decréscimo na absorção, acumulação ou translocação desses metais nas plantas, ou, ainda de efeitos indiretos em sua melhoria nutricional, mas esses efeitos podem variar ou até mesmo serem inibidos em função da contaminação.

A tabela 4 mostra as condições, fatores e mecanismos que determinam os benefícios das micorrizas no crescimento vegetal e recuperação de áreas degradadas.

Tabela 4 - Condições, fatores e mecanismos que determinam os benefícios das micorrizas arbusculares no crescimento vegetal e revegetação de áreas degradadas.

Condição Favorável	Fator determinante	Mecanismo de ação
- Baixo nível de nutrientes e água disponíveis no solo	- Características edáficas, reserva e disponibilidade desses fatores	- Aumento na aquisição, especialmente dos nutrientes pouco móveis
- Elevada contribuição do fungo as plantas	- Potencial de inoculo, taxa de colonização e eficiência simbiótica	- Micélio extra-radicular, absorção e transferência de nutrientes e custo energético da simbiose
- Condições ambientais estressantes	- Ambiente desfavorável e presença de fatores tóxicos	- Amenização do estresse abiótico (temperatura, déficit hídrico, poluentes tóxicos)
- Composição e diversidade de hospedeiros	- Competitividade e interferência entre as espécies	- Crescimento equilibrado, estruturado e sucessão vegetal

Fonte: SIQUEIRA et al. (2007), adaptado.

Os fungos micorrizicos arbusculares podem melhorar o crescimento de plantas em situações como solos com excesso de metais pesados, pois a adição de fósforo (P) e a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares isolados em áreas com cádmio (Cd), tiveram efeito amenizante sobre a toxidez do mesmo com plantas como a *Brachiaria decumbens* (SOARES; SIQUEIRA, 2007).

Ainda se conhece pouco os benefícios das micorrizas arbusculares em solos contaminados por metais pesados, mas acredita-se que esta simbiose atue diretamente na tolerância das plantas a certos contaminantes através da melhoria da absorção de água e nutrientes ou por meio da degradação dos mesmos na microrizosfera, transformando-os em formas menos fitotóxicas (SIQUEIRA et al., 2007).

Paula et al. (2007) concluíram que houve uma resposta positiva da inoculação de fungos micorrizicos arbusculares sobre o crescimento de alfafa, braquiária e sorgo em solo que se encontrava contaminado por resíduos petroquímicos, destacando-se aumento na produção de matéria seca da alfafa de 78% devido a inoculação. Seu experimento se deu

contaminando-se o solo utilizado com duas substâncias provenientes de resíduos petroquímicos o antraceno que foi utilizado em doses 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1 g kg⁻¹ de solo e creosto com doses 0; 0,5; 1; 2 e 3 g kg⁻¹ de solo. Esse efeito também foi constatado por Cabello (1999), que observou uma notável dependência micorrizica dessa espécie em solo contaminado por hidrocarbonetos derivados de petróleo.

Esses efeitos positivos das micorrizas arbusculares para as plantas em solos contaminados por metais pesados são bem evidentes, mas mais estudos ainda são necessários, para que se possa obter um maior esclarecimento quanto à consistência e os mecanismos envolvidos (KLAUBERG-FILHO et al., 2005).

Nos estudos já realizados, foi demonstrado que a relação existente entre fungos micorrizicos e plantas, até certo ponto são extremamente benéficos para ambos, como mostrou Siqueira et al. (1999), que estudaram o efeito da inoculação de fungos micorrizicos arbusculares no crescimento e absorção de metais por mudas de cinco espécies arbóreas. As doses de cádmio utilizadas foram obtidas através da mistura de solo não contaminado e solo contaminado nas proporções de 0, 10, 20, 40 e 80% por volume. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que a inoculação favoreceu o crescimento das mudas bem como uma maior absorção de contaminantes, e maior produção tanto de matéria seca da parte aérea quanto de raízes nas plantas que possuíam a relação simbiótica com o fungo.

Janousková et al. (2005) objetivaram, por meio de um experimento realizado em casa de vegetação, estudar o efeito da micorriza arbuscular na eficiência e aumento da capacidade de tolerar e acumular cádmio advindo do solo pelo tabaco transgênico e não transgênico, através das doses 0,20, 40 e 60 mg kg⁻¹ de solo. Concluíram que para o tabaco transgênico a micorriza diminuiu a capacidade de fito extração de Cd do solo, o contrário do tabaco não transgênico, onde essa capacidade foi aumentada.

O papel do fungo micorrizico arbuscular *Glomus mosseae* na mitigação da toxicidade do cádmio e do chumbo em plantas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp., o popularmente chamado feijão-guandu, foi estudado por Garg e Aggarwal (2011). O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando doses de Cd de 25 e 50 mg kg⁻¹ de solo seco, e os pesquisadores concluíram que houve maior presença de Cd e Pb nas raízes do que na parte aérea da planta, devido a associação micorrízica, sendo que os vãos sem fungo apresentaram quantidades maiores de contaminantes. O crescimento das plantas também foi afetado à medida que as doses dos contaminantes foram aumentando.

Pawłowská e Charuat (2004) analisaram o efeito do cádmio, chumbo e zinco em fases críticas da vida de fungos micorrizicos arbusculares, incluindo germinação de esporos,

extensão das hifas e comprimento de micélio extrarradicular total. Concluiu-se que a espécie *Glomus etunicatum* é mais sensível do que o *Glomus intradices* (espécies estudadas pelos autores) para os três tipos de metais pesados estudados.

A ocorrência e a diversidade de fungos micorrizicos arbusculares em quatro locais com gramíneas em uma área de solo contaminado por metais pesados pela extração e industrialização de Zinco foi avaliado por Klauberg-Filho et al. (2002) . Eles encontraram um total de 21 espécies, onde a densidade de esporos, a riqueza de espécies e o aumento da dominância relacionaram-se inversamente com a concentração de metais no solo.

Concluiu-se que a elevação do grau de poluição do solo com metais pesados reduziu a diversidade de fungos micorrizicos arbusculares ocasionando dominância de espécies.

Já Andrade et al. (2003) objetivaram avaliar o efeito da adição de Pb ao solo em doses 0; 7,5; 37,5; 150; 300 mg dm⁻³ e da saturação por bases no estabelecimento e eficiência da associação micorrizica entre a soja e o fungo micorrizico arbuscular *Glomus macrocarpum*, por meio do crescimento, nutrição mineral e concentração de chumbo na planta. A inoculação de FMA aumentou a produção de matéria seca de parte aérea, mas essa produção reduziu drasticamente com o aumento da quantidade de chumbo disponível e isso afetou tanto o estabelecimento quanto o desempenho da simbiose. O FMA teve papel importante na diminuição na concentração de Pb na parte aérea da planta, conferindo à ela tolerância em uma condição de excesso de metal de pesado no solo.

Os pesquisadores Silva et al. (2006), montaram um experimento em casa de vegetação misturando 15% de solo contaminado com não contaminado, totalizando uma quantidade de Cd de 29 mg dm⁻³, a fim de estudar o efeito de 14 isolados de fungos micorrizicos arbusculares no crescimento e extração de zinco, cádmio, cobre e chumbo pela *Brachiaria decumbens* em solo contaminado. Verificou-se, então, que os fungos micorrizicos arbusculares aumentaram a quantidade de metais extraídos do solo em 845, 142, 68 e 54% para Cu, Pb, Zn e Cd, respectivamente. A redução dos teores de metais na parte aérea da braquiária foi causada pela associação micorrízica, sendo esta também responsável pela amenização da toxidez dos metais, o que favoreceu o crescimento da planta e, como consequência, uma maior extração de metais do solo.

Lins et al. (2007) estudaram o efeito de fungos micorrizicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (leucena) em solos de áreas da caatinga impactadas por mineração de cobre. Verificou-se que quando cultivadas em substrato de rejeito de área com mineração de cobre, as raízes de leucena não são colonizadas por fungos micorrizicos arbusculares. Mas os FMAs nativos de áreas de caatinga preservadas ou

impactadas por mineração de cobre e FMA introduzidos são igualmente capazes de colonizar raízes de leucena.

Foi instalado um experimento, onde mudas de trema foram formadas em substrato contendo doses crescentes de P e com um tratamento de inoculação com *Glomus etunicatum*. Após 60 dias, essas mudas foram transferidas para solução nutritiva de Clark sem Cd e suplementada com 5, 15 e 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd e mantidas por mais 40 dias, quando os efeitos dos tratamentos foram avaliados (SOARES et al., 2007). Concluiu-se que o Cd teve elevada toxicidade para a trema e para a simbiose desta com *Glomus etunicatum*. A melhoria da nutrição fosfatada contribuiu para a amenização da toxicidade de Cd sobre a planta, enquanto que a colonização com *Glomus etunicatum* não. O aumento no fornecimento de P reduziu a absorção e a quantidade acumulada de Cd na parte aérea das plantas.

Cabral et al. (2010) estudaram a capacidade e a velocidade de retenção de metais pesados em micélio de diferentes fungos micorrizicos arbusculares. Os metais estudados foram Cu, Zn, Cd e Pb aplicados isoladamente ou em mistura 20 mL de solução contendo 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os pesquisadores perceberam que a retenção de metais nos micélios desses fungos é um processo rápido e mais diferenciado para o metal do que para a espécie de fungo, sendo que a velocidade de retenção de Cu é da ordem de 3, 30 e 60 vezes maior do que do Zn, Cd e Pb. O micélio do *Glomus clarum* apresentou maior capacidade de retenção para Cu, Cd e Pb, enquanto que para Zn a maior retenção ocorreu pelos micélios de *Gigaspora gigantea*.

E, finalmente, Janosvskavá et al. (2005) realizaram um experimento com tabaco, onde montaram vasos inoculados e não inoculados com fungos micorrizicos arbusculares, enriquecidos com uma gama de concentrações de Cd, no início do cultivo aplicou-se 40 mg kg de solo com nitrato de Cd e mais 15 mg kg no meio do período do cultivo. Os resultados mostraram, por meio de testes de crescimento de raiz, toxicidade menor do Cd nos vasos onde existia micorriza. Em um segundo experimento, micélio extrarradicular do fungo *Glomus intraradices* foi exposto ao Cd. O micélio extrarradicular acumulou cerca de 10-20 vezes mais Cd por unidade de biomassa do que as raízes de tabaco. As concentrações de Cd foram menores em plantas com micorrizas do que nas sem, e o Cd imobilizado pelos micélios extrarradiculares não afetou o teor de Cd em tabaco com micorrizas. Concluiu-se, então, que a micorriza pode diminuir a toxicidade de Cd em plantas, aumentando a imobilização de Cd no solo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento (Figura 1) foi instalado em casa de vegetação em 06/11/2012 sob o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $(5 \times 4 \times 2) \times 3$, sendo os fatores: 5 doses de Cd, 3 espécies de fungos micorrízicos arbusculares e um controle não inoculado, duas cultivares de milho a Monsanto DKB-390 e DKB-S, doadas pela EMBRAPA milho e sorgo e 3 repetições por tratamento totalizando 120 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi composta por um copo de 500 mL, 60 contendo milho não transgênico e 60 contendo milho transgênico.



Figura 1 - Vista geral do experimento, após 15 dias da sementeira. À esquerda, milho transgênico e, à direita, milho não transgênico

O substrato utilizado foi preparado utilizando areia média, lavada em água corrente para remover materiais orgânicos, seca em estufa de secagem a 200°C e esterilizada em autoclave por duas horas. O substrato foi distribuído nos copos e recebeu fertilização a base de superfosfato simples, calculada com base na quantidade de cádmio presente em sua composição química, estabelecida por Freitas et al. (2009), no qual obteve-se que na composição química do superfosfato simples existem cerca de $15 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1}$ de cádmio. A partir daí calcularam-se as doses de cádmio que foram utilizadas, baseada na necessidade e recomendação da utilização de fertilizante fosfatado, com o objetivo de se manter uma alta produtividade da cultura em questão.

A EMBRAPA recomenda, que para o milho cultivado em solo arenoso, caso deste trabalho, a aplicação de P_2O_5 está entre 80 e 110 mg Kg^{-1} por ciclo de cultivo. Neste caso, utilizou-se o valor médio de 95 mg Kg^{-1} (1 dose) de fertilizante, o que acarretou em um acréscimo de $28,5 \text{ mg de Cd por Kg}^{-1}$ por aplicação. Assim calcularam-se as 5 doses pra a cultura simulando 0; 1; 2,5; 5 e 10 anos de cultivo.

Portanto, as quantidades de cádmio adicionadas ao solo para o milho foram: 0; 28,50; 71,25; 142,50 e 285,00 mg Cd kg⁻¹, utilizando-se cloreto de cádmio (CdCl₂) P.A.

Na semeadura, realizada em 6 de novembro de 2012, foram aplicados inóculos de três espécies de fungos micorrízicos arbusculares, compostos por terra e propágulos, de forma a adicionar 200 esporos por copo, de *Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Scutellospora heterogama*, fornecidos pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. A inoculação foi feita em aberturas de 1,5 cm de profundidade, seguindo-se a semeadura de quatro sementes por vaso e aplicação de 60 mL de solução nutritiva Hoagland & Arnon com 1/3 da dose de P.

A umidade foi mantida em torno de 60% da capacidade de campo, sendo que a correção dessa umidade de cada copo foi feita através de pesagem e irrigação uma vez por semana.

O crescimento das plantas foi acompanhado diariamente por 45 dias. Após esse período, o experimento foi desmontado e as partes das plantas foram encaminhadas ao laboratório para a realização das análises. No dia do desmanche mediu-se imediatamente acima do solo por meio de paquímetro analógico o diâmetro do colo em mm de cada planta. Em seguida, separou-se a parte aérea da radicular, encaminhando-as para secagem em estufa de circulação de ar forçado a 60 °C, até peso constante, de forma a obter os dados de matéria seca da parte aérea e matéria seca da parte radicular, e ambas foram encaminhadas dentro de sacos de papel para a secagem em estufa de circulação de ar forçado a 60 °C até peso constante. Posteriormente foi realizada a pesagem desse material, obtendo-se assim os valores de matéria seca de parte aérea e matéria seca de raiz. Parte do sistema radicular (0,10 g de matéria úmida) foi conservada antes da secagem em solução álcool-formol-água (AFA), a 60% de concentração.

O substrato de todos os copos foi armazenado separadamente em sacos plásticos e encaminhados para as análises microbiológicas (comprimento de micélio extraradicular total, e número total de esporos).

As raízes úmidas foram submetidas à análise da porcentagem de colonização, após adaptação da metodologia descrita por Frazener (2005). Primeiramente, as raízes foram colocadas em cassetes citopatológicos e lavadas em água corrente de torneira para retirar o AFA. Posteriormente, as raízes dos cassetes foram submetidas à KOH a 10% em banho maria por uma hora a 90 °C. Após esse tempo, as raízes foram novamente lavadas em água de torneira para a retirada do excesso de KOH e imersas em hipoclorito de sódio 1:1 e em solução de HCl 1% por 10 minutos para leve acidificação. Ao final desse período, a solução

foi descartada e às mesmas foram adicionadas de corante lactoglicerol com azul de tripano a 0,05%, incubando-se por 10 minutos em banho-maria a 90° C. Ao final desse processo, o excesso do corante foi descartado, e adicionou-se lactoglicerol incolor para a conservação das amostras para as futuras observações em lupa.

Para a avaliação, as amostras de raízes foram cortadas em segmentos menores e dispostas em placa de petri quadriculada, acrescidas de lactoglicerol e levadas para uma lupa, em aumento de 30 vezes, registrando-se o total de segmentos positivos e negativos quanto à colonização.

Nos substratos, determinaram-se o número total de esporos e comprimento de micélio extrarradicular total. A contagem de esporos foi feita por meio de metodologia apresentada por INVAM (2012). O primeiro passo foi pesar uma amostra de 50 g de solo e, em seguida, lavada em um balde por três vezes, de forma a criar uma suspensão de terra e esporos. Essa suspensão foi transferida para duas peneiras de malhas 0,45 mm e 0,053 mm. O que ficou retido foi levado a tubo de centrifuga e acrescido de 20 mL de solução de sacarose a 20% e mais 20 mL de solução de sacarose a 60% e, em seguida, a amostra foi levada a centrífuga por 1 minuto a 2000 rpm. Após esse período, o sobrenadante foi passado em uma peneira de malha 0,045 mm e o que ficou retido levado com água destilada a uma placa raiada para a realização da contagem do número de esporos em lupa com aumento de 30 vezes.

Para obtenção do comprimento de micélio extrarradicular total de fungos micorrízicos arbusculares no substrato, seguiu-se metodologia proposta por Melloni e Cardoso (1999), onde pesam-se 10 g de amostra de solo e a submete em um conjunto de peneiras de malhas 0,500 mm e 0,250 mm, recolhendo o passante para um copo de liquidificador, utilizando água corrente de torneira, até atingir a marca de 1,5 L. Posteriormente, essa suspensão é agitada em velocidade mínima em um liquidificador, por um período de 30 segundos e, em seguida, deixada em repouso por 2 minutos. Após esse tempo, retirou-se uma alíquota de 500 mL e passou-se o conteúdo em uma peneira de 0,045 mm de malha a fim de reter apenas partículas e micélios. O retido foi encaminhado para um frasco por meio de água destilada, até um volume de suspensão de 11 mL. Após esta etapa, realizou-se a filtração a vácuo, em conjunto de filtração com membrana NC quadriculada de 47 mm e porosidade de 0,45 micra, antes da visualização em microscópio Nikon Eclipse E200, acoplado de ocular reticulada, em aumento de 100 vezes.

Para realizar a análise dos dados, primeiramente aplicou-se o teste de normalidade através do teste Shapiro-Wilk a 95 % de significância em todas as variáveis analisadas. Para as variáveis onde essa distribuição não foi verificada, realizou-se a transformação Box Cox

(1964). Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA) com o uso do software SISVAR, versão 5.3 (Build 77) para avaliar as fontes de variação fungo, cádmio e suas respectivas cultivares.

Como análises complementares, procedeu-se o teste tukey a 5% e as análises de regressão que também foram realizadas pelo software SISVAR, versão 5.3 (Build 77), desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Correlação entre as variáveis estudadas

As correlações de Pearson entre as variáveis estudadas encontram-se nas tabelas 11, 12 e 13, para as espécies *Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Scutellospora heterogama*, respectivamente.

Atenção especial deve ser dada para a correlação entre matéria seca de parte aérea (MSPA), que mostra o crescimento da planta, e a colonização radicular (CR) por FMAs, que mostra a formação de micorriza, de forma a comprovar o efeito da inoculação no crescimento do milho. Para o milho transgênico, uma correlação de sinal negativo foi observada para a inoculação com *Glomus clarum* (-0,85), concordando com a regressão apresentada pela figura 4. Altas correlações de sinal positivo foram registradas quando as inoculações foram com *Acaulospora scrobiculata* (+0,80) e *Scutellospora heterogama* (+0,88), apesar de não terem sido observadas equações de regressão significativas. Isso mostra que a inoculação com esses dois fungos, proporcionou maior crescimento para o milho transgênico do que quando o mesmo estava inoculado com *Glomus clarum*. Portanto, a interação milho transgênico e *Acaulospora scrobiculata* e milho transgênico e *Scutellospora heterogama* pode ter sido benéfica para o seu crescimento diante das condições encontradas.

Para o milho não transgênico, somente foi observada uma alta correlação de sinal positivo quando este foi inoculado com *Scutellospora heterogama*, mostrando que esse fungo pode ter favorecido o crescimento da planta mediante as condições estudadas, já para os outros dois fungos não foi observado uma correlação significativa.

Desse modo, confirmou-se o comportamento diferenciado dos hospedeiros transgênico e não transgênico mediante a inoculação de FMAs.

Tabela 5 - Matriz de Correlação de Pearson para o fungo *Glomus clarum*

		Milho Não Transgênico				
	Diâm.Colo	MSR	MSPA	MET	CR	NE
Diâm.Colo	1,0	0,77	-0,07	-0,72	-0,07	-0,75
MSR		1,0	0,38	-0,99	0,46	-0,48
MSPA			1,0	-0,44	0,16	0,60
MET				1,0	-0,51	-0,11
CR					1,0	0,41
NE						1,0

		Milho Transgênico				
	Diâm.Colo	MSR	MSPA	MET	CR	NE
Diâm.Colo	1,0	-0,40	0,90	0,73	-0,93	0,90
MSR		1,0	-0,27	0,25	0,69	-0,36
MSPA			1,0	0,58	-0,85	0,98
MET				1,0	-0,44	-0,87
CR					1,0	-0,88
NE						1,0

Diâm.Colo – diâmetro do colo; MSR – matéria seca de raiz; MSPA – Matéria seca de parte aérea; MET – Comprimento de micélio extrarradicular total; CR – Colonização de raiz; NE – Número total de esporos

Tabela 6 - Matriz de Correlação de Pearson para o fungo *Acaulospora scrobiculata*

		Milho Não Transgênico				
	Diâm.Colo	MSR	MSPA	MET	CR	NE
Diâm.Colo	1,0	0,72	0,67	0,63	-0,65	-0,52
MSR		1,0	0,93	-0,02	-0,90	-0,71
MSPA			1,0	-0,14	-0,70	-0,92
MET				1,0	-0,16	0,24
CR					1,0	0,37
NE						1,0

		Milho Transgênico				
	Diâm.Colo	MSR	MSPA	MET	CR	NE
Diâm.Colo	1,0	0,58	0,67	0,01	0,84	0,63
MSR		1,0	0,59	-0,61	0,84	0,01
MSPA			1,0	-0,02	0,90	0,05
MET				1,0	-0,30	0,69
CR					1,0	0,24
NE						1,0

Diâm.Colo – diâmetro do colo; MSR – matéria seca de raiz; MSPA – Matéria seca de parte aérea; MET – Comprimento de micélio extrarradicular total; CR – Colonização de raiz; NE – Número total de esporos

Tabela 7 - Matriz de Correlação de Pearson para o fungo *Scutellospora heterogama*

		Milho Não Transgênico				
	Diâm.Colo	MSR	MSPA	MET	CR	NE
Diâm.Colo	1,0	0,39	0,78	0,53	0,86	0,84
MSR		1,0	-0,03	0,73	0,49	-0,13
MSPA			1,0	-0,07	0,61	0,70
MET				1,0	0,70	0,32
CR					1,0	0,83
NE						1,0

		Milho Transgênico				
	Diâm.Colo	MSR	MSPA	MET	CR	NE
Diâm.Colo	1,0	0,46	0,85	0,42	0,86	0,44
MSR		1,0	0,77	-0,33	0,60	0,74
MSPA			1,0	-0,10	0,88	0,71
MET				1,0	0,10	-0,34
CR					1,0	0,83
NE						1,0

Diâm.Colo – diâmetro do colo; MSR – matéria seca de raiz; MSPA – Matéria seca de parte aérea; MET – Comprimento de micélio extrarradicular total; CR – Colonização de raiz; NE – Número total de esporos

5.2 Variáveis de crescimento

A análise de variância de todas as variáveis estudadas foram significativas para interação tri fatorial entre fungo, planta e cádmio, pois os valores encontrados foram menores do que 0,05. Para diâmetro do colo, conforme mostra à tabela 8 esse valor foi de 0,0001.

Tabela 8 - Análise de variância para diâmetro do colo.

FV	QM	Fc	Pr<Fc
Fungo	382,621335	9,346	0,0000
Planta	668,802895	16,336	0,0001
Cádmio	32,642987	0,797	0,5304
Fungo*Planta	1075,494186	26,269	0,0000
Fungo*Cádmio	150,337286	3,672	0,0002
Planta*Cádmio	51,675130	1,262	0,2918
Fungo*Planta*Cádmio	164,064681	4,007	0,0001
Erro	40,941400		
IV(%)	10,74		
Média Geral	34,4100062	Número	de 120
		observações	

Para comparar o efeito de espécies de FMAs no diâmetro de colo em cada dose de Cd, fez-se uma comparação de médias (tabela 9).

Verificou-se que os hospedeiros se comportaram de forma diferente em função das espécies de FMAs inoculadas. Para o milho não transgênico, *Acaulospora scrobiculata* promoveu maiores valores do diâmetro de colo nas maiores doses de Cd (71,25 e 142,50 mg kg⁻¹). Exceto para as doses 0; 142,5 e 285 mg kg⁻¹, o diâmetro do colo de milho não inoculado não diferiu entre os demais FMAs nas diferentes doses aplicadas de Cd.

Para o milho transgênico, a inoculação com FMAs proporcionou de maneira geral, menores valores de diâmetro de caule em todas as doses de Cd, quando comparado com o controle não inoculado, ou seja, pode-se dizer que para o milho transgênico não houve aumento do diâmetro do colo com a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares.

Sendo assim, a formação de micorriza parece não incentivar o crescimento e o fortalecimento da planta.

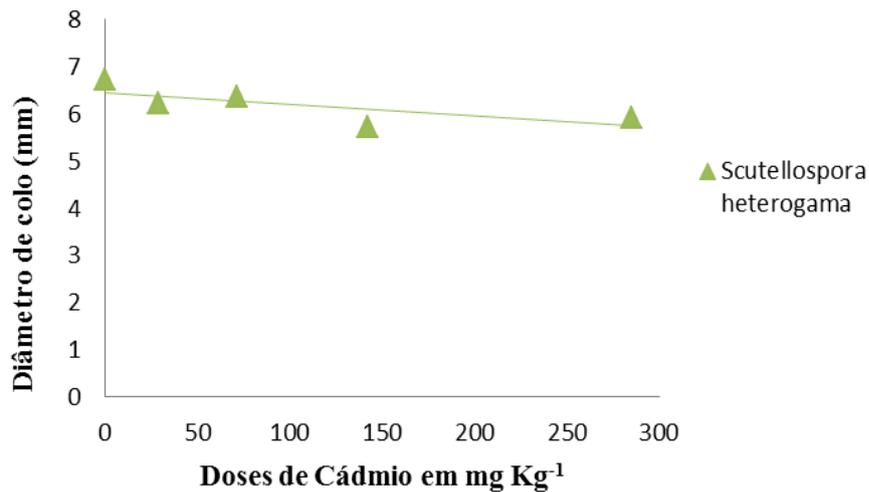
Tabela 9 – Comparação de médias pelo teste de Tukey para a variável diâmetro de colo de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrízicos.

Fungo micorrízico	Doses de cádmio (mg kg ⁻¹)				
	0	28,50	71,25	142,50	285,00
Milho não transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	5,80 b	6,17 a	6,33 a	6,03 ab	5,77 b
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	6,43 ab	6,03 a	6,10 a	6,67 a	6,17 a
<i>Scutellospora heterogama</i>	6,73 a	6,23 a	6,37 a	5,73 b	5,93 b
Controle não inoculado	5,77 b	6,50 a	6,03 a	5,53 b	5,70 b
Milho transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	5,53 b	5,83 b	6,33 a	6,17 b	5,13 b
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	4,87 b	5,77 b	5,27 b	4,83 b	5,46 b
<i>Scutellospora heterogama</i>	5,23 b	5,00 b	4,40 b	4,37 b	6,53 a
Controle não inoculado	6,93 a	6,80 a	6,23 ab	7,10 a	6,07 ab

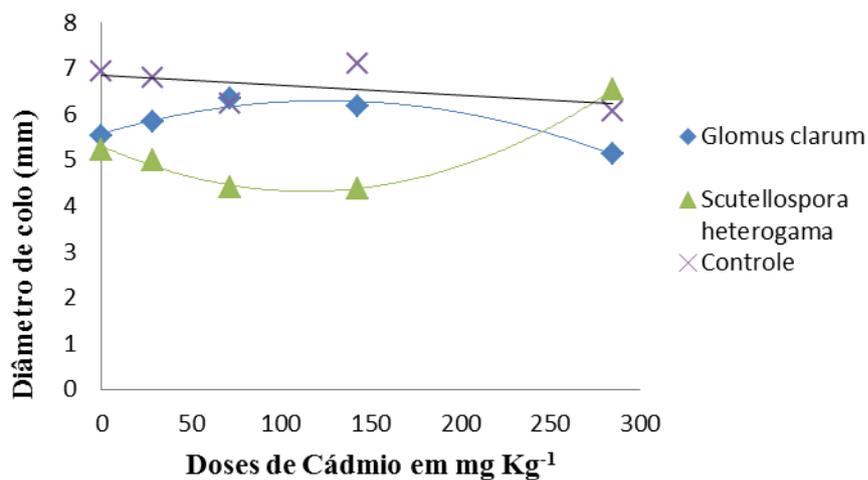
Médias seguidas de letras diferentes na coluna, entre as diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A figura 2 mostra o comportamento dos FMAs mediante as doses de cádmio aplicadas através da regressão. Para o milho não transgênico apenas o fungo *Scutellospora heterogama* apresentou comportamento representativo em regressão linear, mostrando que a medida que as doses de Cd aumentaram os valores de diâmetro de colo foram diminuindo. Para diâmetro de colo do milho transgênico, observou-se efeito positivo da inoculação com *Scutellospora*

heterogama (comportamento quadrático) nas doses de Cd, ou seja, mesmo com o aumento na disponibilidade de Cd os valores de diâmetro de colo também aumentaram, contrariamente ao observado para *Glomus clarum*, também com comportamento quadrático e controle sem fungo com comportamento linear.



Scutellospora heterogama: $y = -0,0238x + 42,3360$ $R^2 = 0,5388$



Glomus clarum: $y = -0,0002x^2 + 0,10011x + 29,2183$ $R^2 = 0,9254$

Scutellospora heterogama: $y = 0,0003x^2 + 0,11544x + 25,6560$ $R^2 = 0,9906$

Controle - sem fungo: $y = -0,2220x + 49,0334$ $R^2 = 0,2982$

Figura 2 - Diâmetro de colo para milho não transgênico (acima) e milho transgênico (abaixo).

Os resultados de matéria seca da parte radicular do milho inoculado com FMAs e submetido às doses de Cd encontram-se na figura 3. Exceto para *Acaulospora scrobiculata*, a qual contribuiu para aumento da matéria seca da raiz de milho não transgênico ao longo das

doses de Cd, os demais fungos não apresentaram efeito e nem ajuste significativo. Para milho transgênico, houve ajuste significativo para o fungo *Glomus clarum*, com elevação da produção de raízes nas duas últimas doses de Cd, e no controle não inoculado, onde percebe-se uma tendência de queda com o aumento das doses de Cd.

Tabela 10 - Análise de variância para matéria seca de raiz.

FV	QM	Fc	Pr<Fc
Fungo	213,138781	34,153	0,0000
Planta	77,200521	12,371	0,0007
Cádmio	3,333947	0,534	0,7109
Fungo*Planta	314,297530	50,363	0,0000
Fungo*Cádmio	13,526374	2,167	0,0211
Planta*Cádmio	19,263021	3,087	0,204
Fungo*Planta*Cádmio	34,956038	5,601	0,0000
Erro	6,240647		
IV(%)	17,19		
Média Geral	8,390009167	Número	de 120
		observações	

O valor do teste de variância para matéria seca de raiz foi de 0,0000, mostrando a significância da interação tri fatorial (Tabela 10).

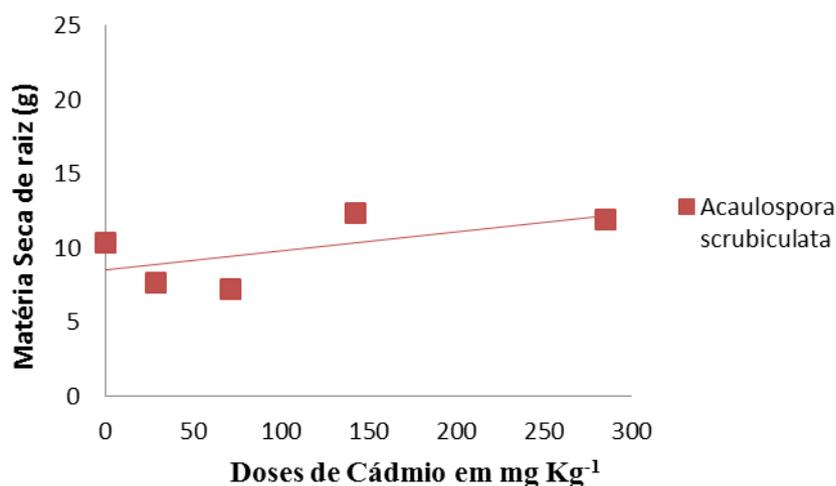
Tabela 11 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável matéria seca de raiz de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrízicos.

Fungo micorrízico	Doses de cádmio (mg kg ⁻¹)				
	0	28,50	71,25	142,50	285,00
Milho não transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	8,38 b	8,57 b	9,61 ab	8,23 ab	8,34 b
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	10,04 a	7,70 b	7,21 b	12,38 a	11,92 a
<i>Scutellospora heterogama</i>	8,40 b	10,94 a	13,94 a	6,69 b	9,01 b
Controle não inoculado	6,26 b	7,87 b	10,23 ab	7,13 ab	11,01 ab
Milho transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	6,93 b	3,35 b	3,51 b	9,80 b	9,05 ab
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	2,70 b	5,92 b	6,62 ab	2,47 b	2,63 b
<i>Scutellospora heterogama</i>	1,67 b	3,10 b	3,47 b	4,08 b	5,48 b
Controle não inoculado	20,80 a	20,86 a	9,46 a	15,67 a	14,20 a

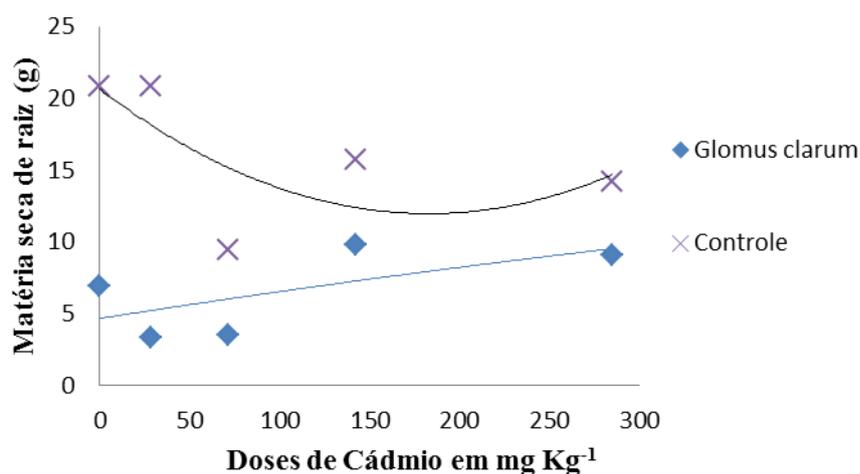
Médias seguidas de letras diferentes, na mesma dose e entre espécies de fungos micorrízicos arbusculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os resultados da comparação das espécies de FMAs dentro de cada dose de Cd estão no tabela 11. O comportamento das espécies, assim como ocorreu para diâmetro do colo, variou em função dos hospedeiros (milho transgênico e não transgênico). Para milho transgênico, todos os tratamentos com FMAs promoveram redução da produção de raízes em todas as doses de Cd, quando comparado ao controle sem fungo.

Para o milho não transgênico, houve diferença entre as doses de Cd e o fungo que mais se destacou promovendo maior matéria seca de raízes foi o *Acaulospora scrobiculata*, na ausência de Cd e nas duas últimas doses (142,50 e 285 mg kg⁻¹).



$$\text{Acaulospora scrobiculata: } y = 0,0083x + 8,4256 \quad R^2 = 0,4250$$



$$\text{Glomus clarum: } y = 0,0104x + 4,7373 \quad R^2 = 0,4098$$

$$\text{Controle - sem fungo: } y = 0,000009x^2 - 0,0582x + 20,6277 \quad R^2 = 0,4459$$

Figura 3 - Matéria seca de raiz para milho não transgênico (acima) e milho transgênico (abaixo).

A figura 3 mostra o comportamento das diferentes espécies de fungos e o controle não inoculado do ponto de vista da regressão. No milho não transgênico, apenas o *Acaulospora scrobiculata* teve o comportamento significativo de maneira linear para a regressão, mostrando que houve um aumento de matéria seca de raízes mesmo com o aumento das doses de Cd aplicadas. Já para o milho transgênico houve significância linear positiva para a inoculação com o fungo *Glomus clarum* e linear para o controle sem fungo.

O baixo efeito de Cd na produção de matéria seca de raízes de milho não transgênico, independentemente da inoculação de FMAs, contraria o resultado obtido por Siqueira et al.

(1999), que observaram menor produção de matéria seca de raiz ao longo do aumento da disponibilidade de Cd no solo por eles estudados, obtido a partir da mistura de solo contaminado e não contaminado com Cd nas seguintes proporções: 0,10,20, 40 e 80% por volume na mistura com solo não contaminado. Apresentaram também resultados contrários aos trabalhos de Carneiro et al. (2001), Cunha et al. (2008), Soares et al. (2007), Silva et al. (2006) e Garg e Aggarwal (2011), que registraram redução na produção de matéria seca de raiz com o aumento nas doses de Cd (de 0 a 120 mg kg⁻¹) aplicadas ao solo, que estudaram respectivamente o efeito da interação entre Cd e Pb no crescimento, fitoquelatina, fixação de nitrogênio e produção de glutatona em *Cajanus cajan* (L.).

A divergência de resultados existentes entre os diversos trabalhos apresentados e o obtido para milho não transgênico pode ser devido a planta (cultivar), tempo de condução ou outras condições experimentais substrato, umidade e temperatura, que podem variar de acordo com o local dos experimentos. Nesse presente trabalho, o tempo de 45 dias foi definido para avaliar o impacto inicial de doses de Cd e espécies de FMAs na rizosfera dos diferentes hospedeiros. Para milho transgênico, o efeito antagonístico de FMAs ao longo das doses de Cd é questionável e ainda passível de discussão, afinal, nota-se que no geral, a produção de matéria seca de raiz aumentou mediante a maior disponibilidade de cádmio, mostrando, que talvez, a associação micorrízica pode ter sido benéfica, favorecendo a produção de matéria seca de raiz da cultivar.

O que também cabe discussão é a diferença observada entre os valores de matéria seca de raiz entre os tratamentos inoculados com FMAs e os controle não inoculado. Os tratamentos controle sem fungos obtiveram valores muito maiores, mostrando, que para milho transgênico, a matéria seca de raiz é maior quando não há presença de FMAs, mesmo observando-se uma tendência de queda na produção com o aumento das doses de CD, os valores continuaram maiores, do que os outros tratamentos.

O teste de variância para a variável matéria seca de parte aérea resultou em 0,0004 para interação tri fatorial, conforme mostra a tabela 12.

Tabela 12 - Teste de variância para a variável matéria seca de parte aérea.

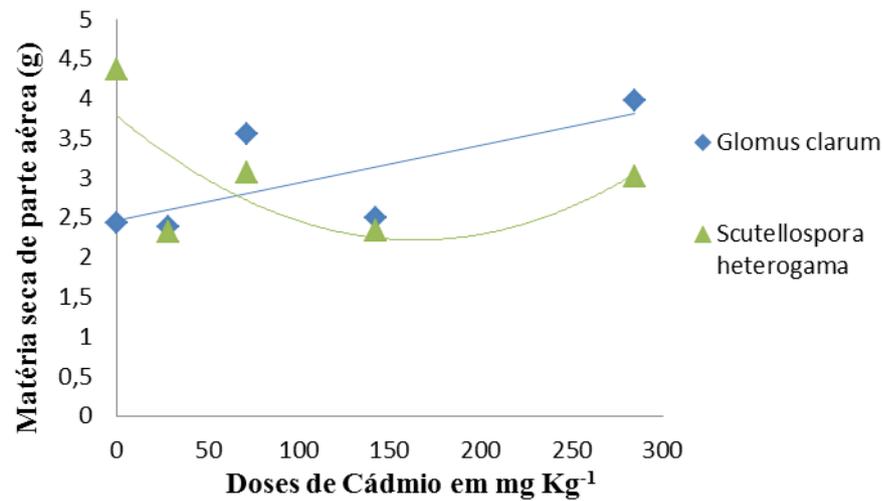
FV	QM	Fc	Pr<Fc
Fungo	11,135866	21,746	0,0000
Planta	23,577446	46,042	0,0000
Cádmio	0,795805	1,554	0,1947
Fungo*Planta	17,586152	34,343	0,0000
Fungo*Cádmio	1,214242	2,371	0,0114
Planta*Cádmio	0,668626	1,306	0,2750
Fungo*Planta*Cádmio	1,789625	3,495	0,0004
Erro	0,512081		
IV(%)	18,69		
Média Geral	2,2108892	Número	de 120
		observações	

Tabela 13 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável matéria seca de parte aérea de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrízicos.

Fungo micorrízico arbuscular	Doses de cádmio (mg kg ⁻¹)				
	0	28,50	71,25	142,50	285,00
Milho não transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	2,66 b	2,64 a	3,21 a	2,69 a	3,42 a
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	2,57 b	2,53 a	2,45 a	2,62 a	2,60 b
<i>Scutellospora heterogama</i>	3,59 a	2,59 a	2,98 a	2,61 a	2,96 ab
Controle não inoculado	2,53 b	2,64 a	2,75 a	2,59 a	2,62 b
Milho transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	1,73 b	1,74 b	2,65 ab	2,25 b	1,59 b
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	1,87 b	2,11 b	1,87 b	1,02 b	1,72 b
<i>Scutellospora heterogama</i>	1,00 b	1,77 b	1,31 b	1,10 b	2,88 ab
Controle não inoculado	3,37 a	3,49 a	2,93 a	3,47 a	3,26 a

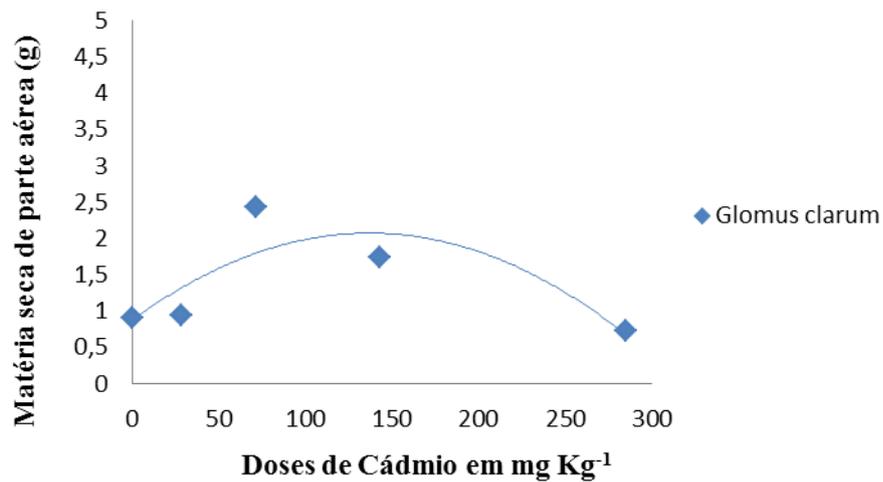
Médias seguidas de letras diferentes, na mesma dose e entre espécies de fungos micorrízicos arbusculares, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Pela tabela 13 percebe-se que no milho não transgênico os valores de matéria seca de parte aérea foram bem próximos, independentemente da dose de Cd aplicada, apenas com um leve destaque para *Scutellospora heterogama* na ausência de Cd e *Glomus clarum* na dose 71,25 mg kg⁻¹. No milho transgênico os valores de matéria seca de parte aérea de maneira geral diminuíram em todas as doses de Cd, quando comparado ao controle sem fungo.



Glomus clarum: $y = 0,0029x + 2,4711$ $R^2 = 0,5235$

Scutellospora heterogama: $y = 0,000022x^2 - 0,0117x + 3,7834$
 $R^2 = 0,4875$



Glomus clarum: $y = -0,000024x^2 + 0,01071x + 0,8763$ $R^2 = 0,6770$

Figura 4 - Matéria seca de parte aérea para milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).

Novamente, verificou-se comportamento diferenciado dos FMAs em relação as doses de Cd, para ambos os hospedeiros para a variável matéria seca de parte aérea (Figura 4). Enquanto para milho não transgênico houve resposta positiva no crescimento (matéria seca da parte aérea) pela inoculação de *Glomus clarum*, que apresentou comportamento linear na regressão, o oposto ocorreu para o mesmo fungo em milho transgênico, mas com comportamento quadrático. Para os demais FMAs não se verificou ajuste significativo do

comportamento ao longo das doses estudadas. O aumento da matéria seca da parte aérea de milho não transgênico inoculado com *Glomus clarum* não foi acompanhado pelo diâmetro do colo e nem pela produção de matéria seca de raízes, evidenciando maior eficiência da fotossíntese, possibilitando assim um maior crescimento vegetativo desse hospedeiro.

Para o milho transgênico, houve ajuste significativo com *Glomus clarum*, através de uma equação quadrática. Não houve ajuste significativo das doses de Cd nos demais FMAs, incluindo o controle.

No geral, pode-se afirmar que com o aumento das doses de Cd não houve uma significativa diminuição na matéria seca de parte aérea em nenhum dos tratamentos estudados, indicando que durante os 45 dias de experimento o impacto da contaminação por Cd foi baixo, tanto em milho transgênico quanto em milho não transgênico.

Os resultados obtidos não corroboraram com os apresentados nos trabalhos de Carneiro et al. (2001) que utilizaram a dose de 120 mg kg^{-1} obtida pela utilização de solo contaminado obtido em área de deposição de rejeitos; Siqueira et al. (1999) com doses utilizadas nas proporções de 0,10,20, 40 e 80% por volume na mistura de solo contaminado por Cd e solo não contaminado; Soares et al. (2007), com doses de 0;5;10 e $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd; Silva et al. (2006) que usaram solo contaminado de área de rejeito misturado com Latossolo Vermelho Escuro sem contaminação, resultando em $29,0 \text{ mg dm}^{-3}$ de Cd; Garg e Aggarwal (2011) com 25 e 50 mg kg^{-1} de Cd e Cunha et al. (2008), onde a produção de matéria seca de parte aérea foi reduzida significativamente à medida que as doses de cádmio (0,1,3,5,10,20 mg kg^{-1}) aumentaram.

5.3 Variáveis microbiológicas

O teste de variância para variável comprimento de micélio extra radicular total foi significativo para interação tri fatorial, conforme mostra a tabela 14.

Tabela 14 - Teste de variância para variável comprimento de micélio extra radicular total.

FV	QM	Fc	Pr<Fc
Fungo	2,777116	289,576	0,0000
Planta	0,679162	70,818	0,0000
Cádmio	0,020143	2,100	0,0884
Fungo*Planta	0,140874	14,689	0,0000
Fungo*Cádmio	0,016791	1,751	0,0713
Planta*Cádmio	0,004869	0,508	0,7302
Fungo*Planta*Cádmio	0,044313	4,621	0,0000
Erro	0,009590		
IV(%)	5,98		
Média Geral	0,9449158	Número de observações	120

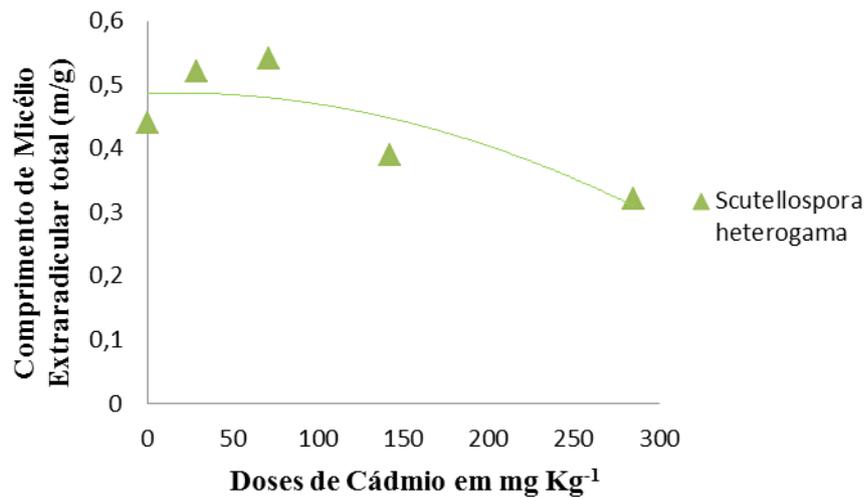
Tabela 15 – Comparação de médias pelo teste de tukey para variável comprimento de micélio extrarradicular total em m/g de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrízicos.

Fungo micorrízico arbuscular	Doses de cádmio (mg kg ⁻¹)				
	0	28,50	71,25	142,50	285,00
Milho não transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	0,49 a	0,48 a	0,30 b	0,54 a	0,51 a
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0,33 b	0,28 b	0,35 b	0,37 b	0,25 b
<i>Scutellospora heterogama</i>	0,44 ab	0,52 a	0,54 a	0,39 b	0,32 b
Controle não inoculado	0,02 b	0,03 b	0,03 b	0,05 b	0,06 b
Milho transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	0,21 b	0,25 a	0,26 a	0,34 a	0,20 a
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0,27 b	0,25 a	0,26 a	0,27 a	0,32 a
<i>Scutellospora heterogama</i>	0,42 a	0,22 a	0,22 a	0,28 a	0,33 a
Controle não inoculado	0,07 b	0,05 b	0,02 b	0,04 b	0,01 b

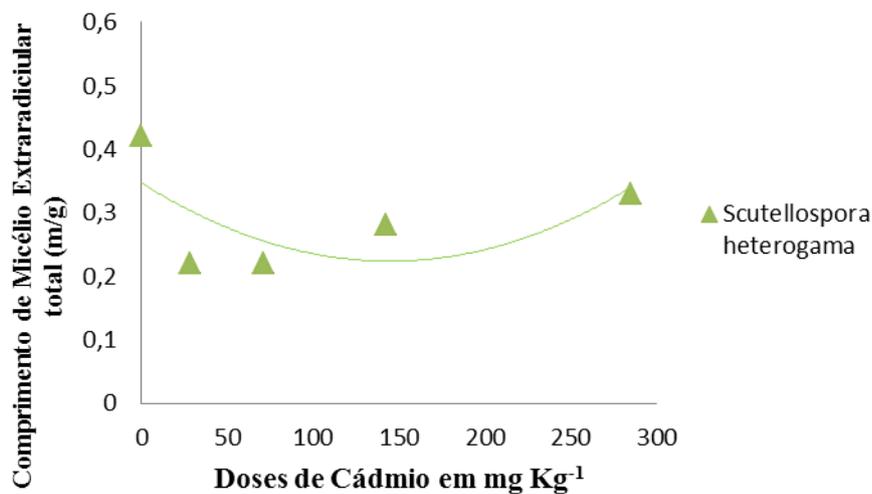
Médias seguidas de letras diferentes, na mesma dose e entre espécies de fungos micorrízicos arbusculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os dados de comprimento de micélio extrarradicular total de FMAs na rizosfera de milho transgênico e não transgênico, ao longo das doses de Cd encontram-se na figura 5. A comparação entre as espécies de FMAs dentro de cada dose de Cd pode ser vista na tabela 15.

Mesmo tendo sido autoclavado para a esterilização antes da semeadura, o substrato pode apresentar contaminação por fungos advindos do ambiente da casa de vegetação, podendo ser micorrízicos ou não. Neste estudo, independentemente do hospedeiro, os substratos que não receberam propágulos de FMAs, praticamente não apresentaram micélio extraradicular de fungos, ou seja, a contaminação dos substratos ou fungos micorrízicos ou não foi baixa.



$$\text{Scutellospora heterogama: } y = -0,00052x - 0,5585 \quad R^2 = 0,6629$$



$$\text{Scutellospora heterogama: } y = 0,000003x^2 - 0,001508x - 0,7845 \\ R^2 = 0,3886$$

Figura 5 - Comprimento de micélio extraradicular total em substrato com milho não transgênico (acima) e milho transgênico (abaixo).

Para o milho não transgênico, no geral, exceto para as doses 142,4 e 285 mg kg⁻¹ de cádmio a inoculação com *Scutellospora heterogama* promoveu os maiores valores de MET.

Já para milho transgênico praticamente não houve variação do efeito dos FMAs, nas diferentes doses de Cd.

Dessa forma, confirmou-se a ação diferenciada do hospedeiro e das espécies de FMAs na produção de MET. Também, confirma-se que as doses utilizadas de Cd, exceto para *Scutellopora heterogama* em milho não transgênico, não interferiram na produção de MET nas demais espécies de FMAs, tanto para o milho transgênico quanto para milho não transgênico.

Foram encontrados pequenos valores de comprimento de micélio extrarradicular total no controle não inoculado com fungo. Isso pode ocorrer devido às contaminações advindas do ar, ou também pela já existência de micélios de fungos inativos que ainda podem ser visíveis após o processo de autoclavagem da areia. Esses micélios podem ser contados uma vez que é praticamente impossível diferenciar micélios de fungos micorrizicos arbusculares de outros não micorrizicos, dificultando assim o trabalho de quantificação (MELLONI; CARDOSO, 1999). Quando isso ocorre, um cálculo de desconto é sugerido, a fim de se obter resultados mais realísticos. Neste trabalho, os valores encontrados foram extremamente pequenos (cerca de 5 cm), não houve necessidade da realização de tais cálculos.

Para a variável percentual de colonização de raiz o teste de variância, conforme mostra a tabela 16 se mostrou significativo para a interação tri fatorial

Tabela 16 - Teste de variância para a variável percentual de colonização de raiz.

FV	QM	Fc	Pr<Fc
Fungo	240,847085	234,855	0,0000
Planta	206,210847	201,080	0,0000
Cádmio	6,414174	6,255	0,0002
Fungo*Planta	36,542188	35,633	0,0000
Fungo*Cádmio	2,236665	2,181	0,0203
Planta*Cádmio	7,141169	6,964	0,0001
Fungo*Planta*Cádmio	2,822441	2,752	0,0036
Erro	1,025514		
IV(%)	7,97		
Média Geral	7,33387419	Número	de 120
		observações	

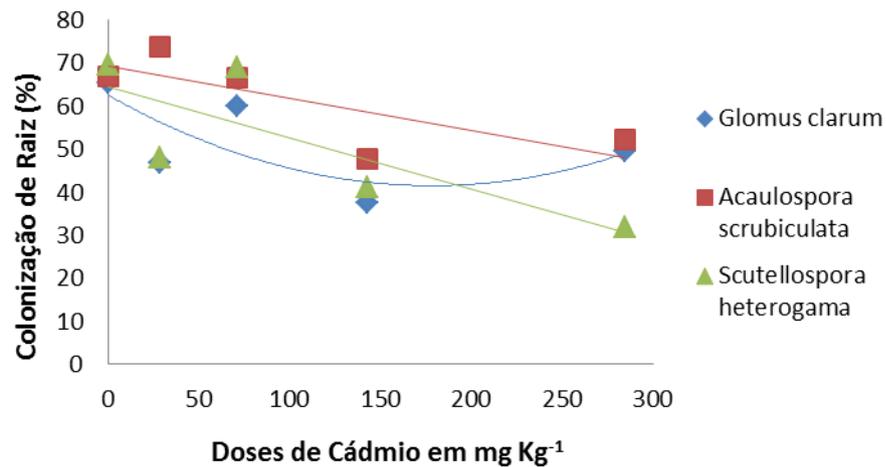
Tabela 17 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável percentual de colonização de raiz de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrízicos.

Fungo micorrízico	Doses de cádmio (mg kg^{-1})				
	0	28,50	71,25	142,50	285,00
Milho não transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	65,33 a	46,86 b	60,05 a	37,61 a	49,69 ab
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	66,79 a	73,97 a	66,53 a	47,73 a	52,37 a
<i>Scutelospora heterogama</i>	69,77 a	48,12 b	69,18 a	41,28 a	31,89 b
Controle não inoculado	4,67 b	8,18 b	10,06 b	4,17 b	6,52 b
Milho transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	29,01 a	25,37 a	21,16 ab	26,30 a	31,94 a
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	26,78 a	33,16 a	31,35 a	22,41 a	28,16 a
<i>Scutelospora heterogama</i>	18,54 a	23,69 a	14,66 b	19,19 ab	28,80 a
Controle não inoculado	5,80 b	12,60 b	12,13 b	10,74 b	4,60 b

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma dose e entre espécies de fungos micorrízicos arbusculares, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os dados de colonização micorrízica do milho não transgênico e transgênico, ao longo das doses de Cd, encontram-se na figura 6. Os dados de comparação de médias se encontram na tabela 17. A colonização de raiz foi maior no milho não transgênico, ficando em torno de 60 a 70% nas menores doses (até $28,5 \text{ mg kg}^{-1}$), diminuindo à medida que as doses foram aumentando. Para o milho transgênico, a colonização ficou em torno de 20 a 30%, sem ajustes significativos de espécies de FMAs em função das doses de cádmio. Tal resultado indica que a transgenia do hospedeiro pode afetar a resposta ao FMA e a formação da micorriza. Diante de situações de estresse edáfico, como baixa umidade do solo, baixa disponibilidade de nutrientes e presença de fitopatógenos, a planta transgênica de milho pode não ser beneficiada pela simbiose e apresentar respostas negativas ao ambiente, com redução de crescimento.

Para o milho não transgênico, houve ajustes significativos para micélio de todos os tratamentos com FMA, exceto o controle. Houve redução dos valores de colonização em função do aumento das doses de Cd sendo que para *Glomus clarum* e *Acaulospora scrobiculata* e comportamento linear para *Scutellospora heterogama*. Esse resultado evidencia o impacto negativo das doses de Cd na formação da micorriza em milho não transgênico e a não resposta para o milho transgênico.



Glomus clarum: $y = 0,000027x^2 - 0,01538x + 11,4011$ $R^2 = 0,4867$
 Acaulospora scrobiculata: $y = - 0,004434x + 12,0311$ $R^2 = 0,5938$
 Scutellospora heterogama: $y = - 0,0081x + 11,6056$ $R^2 = 0,6825$

Figura 6 - Colonização micorrízica de milho não transgênico

Os resultados para milho não transgênico corroboram os apresentados por Carneiro et al. (2001) que constataram a diminuição da colonização de raízes a medida que as doses de cádmio aplicadas nas culturas estudadas eram maiores (solo utilizado retirado de área de rejeito contendo 120 mg kg^{-1} com volumes aplicados de 0; 7,5; 15; 30 e 45% v/v). Também concordam com os resultados apresentados por Soares et al. (2007), que avaliaram a toxicidade de cádmio em mudas de *Trema micantha* (L.), que também sofreram uma queda na colonização de raízes à medida que as doses de cádmio foram aplicadas (0, 5, 10 e $15 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Siqueira et al. (1999) atestaram a diminuição na colonização das raízes de cinco culturas estudadas mediante à utilização de solo contaminado por metais pesados em doses crescentes, que variaram em proporção de volume de 0, 10, 20, 40 e 80 % de mistura com solo não contaminado.

O teste de variância para a variável número total de esporos foi significativo para interação tri fatorial de acordo com a tabela 18.

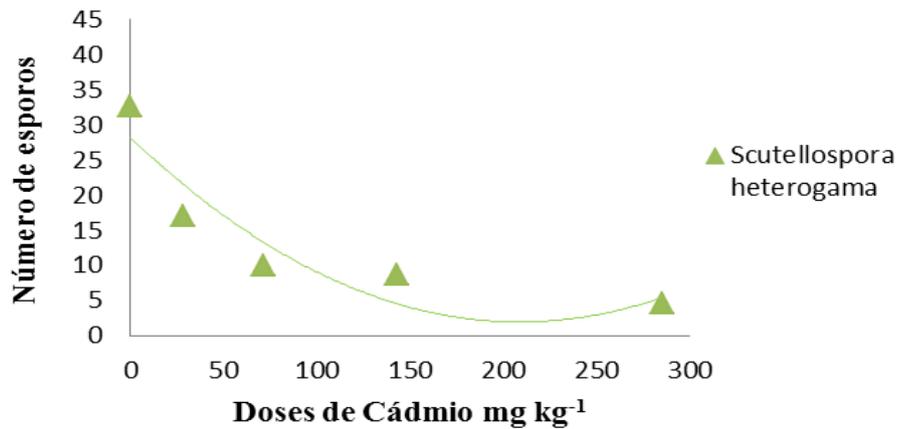
Tabela 18 - Teste de variância para a variável número total de esporos.

FV	QM	Fc	Pr<Fc
Fungo	117,828031	200,298	0,0000
Planta	16,406391	27,890	0,0000
Cádmio	0,678230	1,153	0,3379
Fungo*Planta	5,098505	8,667	0,0000
Fungo*Cádmio	0,912181	1,551	0,1237
Planta*Cádmio	1,961672	3,335	0,0141
Fungo*Planta*Cádmio	3,611365	6,139	0,0000
Erro	0,588264		
IV(%)	7,97		
Média Geral	0,4323394	Número de observações	120

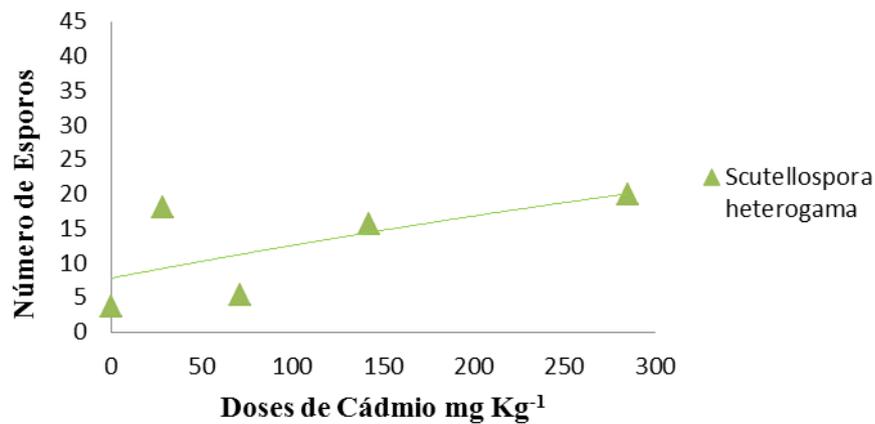
Tabela 19 – Comparação de médias pelo teste de tukey para a variável número total de esporos de plantas de milho não transgênico e transgênico frente às doses crescentes de Cd e inoculação com fungos micorrízicos.

Fungo micorrízico	Doses de cádmio (mg kg⁻¹)				
	0	28,50	71,25	142,50	285,00
Milho não transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	3,33 b	3,00 b	2,40 b	3,00 ab	6,00 ab
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	9,00 b	10,67 ab	38,33 a	4,67 ab	9,67 a
<i>Scutellospora heterogama</i>	32,67 a	17,00 a	10,00 b	8,67 a	4,67 b
Controle não inoculado	0,10 b	0,10 b	0,10 b	0,10 b	0,10 b
Milho transgênico					
<i>Glomus clarum</i>	1,37 b	1,00 b	4,67 ab	2,67 b	0,10 b
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0,70 b	2,67 b	2,37 b	2,00 b	4,67 b
<i>Scutellospora heterogama</i>	3,67 a	18,00 a	5,33 a	15,67 a	20,00 a
Controle não inoculado	0,10 b	0,10 b	0,10 b	0,10 b	0,10 b

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma dose e entre espécies de fungos micorrízicos arbusculares, não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Scutellospora heterogama: $y = 0,000227x^2 - 0,1544x + 28,1847$
 $R^2 = 0,8589$



Scutellospora heterogama: $y = 0,02624x + 8,0213$ $R^2 = 0,4200$

Figura 7 - Número de esporos e fungos micorrizicos arbusculares em milho não transgênico (esquerda) e milho transgênico (direita).

A figura 7 mostra as regressões para número total de esporos, juntamente com a tabela 19 que contém a comparação de médias entre as espécies de FMAs em função das doses de Cd utilizadas. Da mesma maneira que o apresentado para MET e para colonização de raízes, o número total de esporos foi baixo, tanto para o milho não transgênico quanto para o transgênico. Ao contrário do visto para colonização de raiz, onde o fungo *Scutellospora heterogama* apresentou aumento no número de esporos com o aumento das doses de cádmio para o milho transgênico. Porém, para o milho não transgênico constatou-se aumento do

número de esporos apresentando comportamento quadrático. Esse resultado é interessante, pois mostra a diferença de estímulo para a esporulação na rizosfera dos hospedeiros transgênico e não transgênico.

Para o milho não transgênico, ocorreu uma variabilidade de comportamento dos fungos com as doses de cádmio, pois em três doses (0, 28,50 e 142,50 mg kg⁻¹) *Scutellospora heterogama* apresentou maior esporulação enquanto que para duas doses mais altas (71,25 e 285,0 mg kg⁻¹) o *Acaulospora scrobiculata* se mostrou mais esporulante. Já para o milho transgênico, independente das doses aplicadas de Cd, o fungo que mais produziu esporos foi *Scutellospora heterogama*.

6. CONCLUSÕES

As doses de cádmio aplicadas (até 285 mg kg⁻¹) não afetaram o crescimento inicial de milho transgênico e não transgênico.

As respostas de produção de propágulos e formação de micorriza foram diversas em função do milho transgênico e não transgênico e das espécies de fungos inoculadas.

A espécie *Scutellospora heterogama* apresentou menor formação de propágulos (micélio extrarradicular total e densidade de esporos) na rizosfera de milho não transgênico, ao longo das doses de cádmio, quando comparada a do milho transgênico, no qual se observou comportamento oposto.

A formação de micorriza, dada pela porcentagem de colonização radicular, variou em função do hospedeiro, sendo maior em milho não transgênico (60 a 70 %) do que transgênico (20 a 30%), independentemente da espécie de fungo e das doses de cádmio.

O crescimento, dado pela formação de matéria seca da parte aérea, foi reduzido ao longo das doses de cádmio quando o milho não transgênico foi inoculado com *Scutellospora heterogama* e incrementado quando inoculado com *Glomus clarum*. Para milho transgênico, as respostas de produção de matéria seca da parte aérea à inoculação foram diferenciadas, com comportamento quadrático para *Glomus clarum* ao longo das doses de cádmio. A inoculação dessa espécie aumentou a produção de matéria seca da raiz nas doses de cádmio, apesar de se observar menor diâmetro de colo.

A inoculação de milho não transgênico com *Scutellospora heterogama* promoveu, além de menor produção de matéria seca da parte aérea, menor formação de propágulos (micélio extrarradicular total e esporos) e de micorriza (colonização radicular), ao longo das doses de cádmio.

A transgenia afeta negativamente a resposta de crescimento vegetativo e de formação de micorriza ante a inoculação de diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares, independentemente das doses de Cd. Nesse sentido, o plantio de milho transgênico em solos contaminados com cádmio pode comprometer a formação da micorriza e os benefícios advindos dessa simbiose.

Novos estudos são indicados para se comprovar o efeito negativo da transgenia na rizosfera de milho, quantificando, entre outros, a atividade e biomassa microbianas, além das taxas de absorção, translocação e acúmulo de cádmio no tecido vegetal, em tempos maiores de experimentação, sob condições controladas ou não controladas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. C. S. de, LAMOUNIER, W. M. Alimentos transgênicos na agricultura brasileira: evolução e perspectivas. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v.7, n.3, p.345-355, 2005.

ALVES, G. S. A biotecnologia dos transgênicos: precaução é a palavra de ordem. **Holos**, v.20, p.1-10, 2004.

ALVES, N. N. de A, ALBUQUERQUE, J. H. de, OLIVEIRA, F. A. de, CAVALCANTE, L. F, SOUZA, C. C. de. Manejo da água disponível no solo e adubação fosfatada: efeito sobre a cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.2, p.247-992, 2000.

ALLOWAY, B. J. The origin of heavy metals in soils. In: BIZARRO, V. G, MEURER, E. J, TASTCH, F. R. P. Teor de cádmio em fertilizantes fosfatados comercializados no Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.247-250, 2008.

ANDRADE, S. A. L, ABREU, C. A, SILVEIRA, A. P. D. Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p.945-954, 2003.

ARAÚJO, F. S, MARTINS, S. V, MEIRA NETO, J. A, LANI, J.L, PIRES, I. E. Florística da vegetação arbustivo-arbórea colonizadora de uma área degradada por mineração de caulim. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.983-992, 2005.

ARAÚJO, N. S, AMARAL-SOBRINHO, N. M. B. do. Influencia das propriedades físicas e químicas de solos intemperizados na absorção de chumbo, cobre e zinco. **Floresta e Ambiente**, v.7, p.167-180, 2000.

ATSDR – Agency for toxic substances and diseases registry. Disponível em: <www.atsdr.cdc.gov>. Acesso em: 23 jun. 2012.

BAPTISTA, S. M. P. **Avaliação da resposta ao stresse oxidativo induzido por cádmio e cobre em plantas de tabaco e transformadas e não transformadas**. Lisboa, Portugal, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia do ambiente), Universidade Técnica Lisboa, 2009. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1059/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20%20de%20Mestrado%20-%20S%C3%A9rgio%20Baptista.pdf>. Acesso em: 20 jun 2012.

BIZARRO, V. G. **Teor e Biodisponibilidade de cádmio em fertilizantes fosfatados**. Porto Alegre, RS, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

BIZARRO, V. G, MEURER, E. J, TASTCH, F. R. P. Teor de cádmio em fertilizantes fosfatados comercializados no Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.247-250, 2008.

BRASIL. Instrução normativa n° 27, de 05 de junho de 2006. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo. Brasília, DF, 09 jun. 2006. Seção1. p.15-16

BRASIL. Resolução do Conama n° 20, de 18 de junho de 1996. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo. Brasília, DF, 30 jun. 1986.

BRASIL. Resolução do Conama n° 257, de 30 de junho de 1999. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo. Brasília, DF, 22 jul. 1999.

BRASIL. Resolução do Conama n° 264, de 26 de agosto de 1999. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo. Brasília, DF, n. 54. p. 80-83 20 mar. 2000.

CABELLO, M. N. Hydrocarbon pollution: It's effects on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) In: PAULA, A. M. de, SIQUEIRA, J. O, SOARES, C. R. F. S. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrizica pelo *Glomus etunicatum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.805-811, 2007.

CABRAL, L, SIQUEIRA, J. O, SOARES, C. R. F. S, PINTO, J. E. B. P. Retenção de metais pesados em micélios de fungos micorrízicos arbusculares. **Química Nova**, v.33, n.1, p.25-29, 2010.

CAMPOS, M. L, SILVA, F. N. da, NETO, A. E. F, GUILHERME, L. R. G, MARQUES, J. J, ANTUNES, A. S. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfato de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.4, p.361-367, 2005.

CARDOSO, L. M. N, CHASIN, A. M. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. **Série de Cadernos de Referencia Ambiental**, 1 ed. v.6, 2001.

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

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, v.88, p.1707-1719, 2006.

CUNHA, K. P, V. da, NASCIMENTO, C. W. A. do, MAGALHÃES, R. P. M. de, ACCIOLY, A. M. de A, SILVA, A. J. da. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n.3, p.1319-1328, 2008.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Nutrição e adubação do milho. Disponível em:

<http://www.dpv24.iciag.ufu.br/new/dpv24/Apostilas/NUTRICA0%20E%20ADUB.%20MI LHO%20-%20CNPMS.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

FREITAS, E.V.de S, NASCIMENTO, C. W. A. do, GOULART, D. F, SILVA, J. P. S. Disponibilidade de cádmio e chumbo para milho em solo adubado com fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1899-1907, 2009.

FRAZENER, G. **Proteção de tomateiro a meloidogyne incógnita pelo extrato aquoso de tagetes patula**. Marechal Cândido Rondon, PR, 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2005.

GARG, N, AGGARWAL, N. Effects of interatictions between cádmium and lead on growth, nitrogen fixation, phytochelatin, and glutathione production in mycorrhizal *Cajanus cajan* (L.) Millsp. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, p.286-300, 2011.

GARG, N, CHANDEL, S. Role of arbuscular mycorrhizal (AM) fung on growth, cadmium uptake, osmolyte, and phytochelatin synthesis in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Under NaCl and Cd stresses. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, p.292-308, 2012.

GONÇALVES, V. C, MEURER, E. J, TATSCH, F. R. P, CARVALHO, S. A, NETO, O. A. dos S. Biodisponibilidade de cádmio em fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.2871-2875, 2008.

GONÇALVES, J. F, MALDENER, J, ROSSATO, L. V, TABALDI, L. A, SKREBSKY, E. C, FARIAS, J. G, BISOGNIN, D. A, NICOLOSO, F. T. Crescimento in vitro de plântulas de batata em diferentes doses de cádmio. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2625-2628, 2009.

GONÇALVES JUNIOR A. C dos S, LUCHESE, E. B, LENZI, E. Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em latossolo vermelho escuro com fertilizantes comerciais. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p.173-177, 2000.

GONÇALVES JUNIOR A. C dos S, PESSOA, A.C. Fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em argissolo vermelho eutrófico a partir de adubos comerciais. **Scientia Agraria**, v. 3, n. 1-2, p.19-23, 2002.

GUIMARÃES, M. de A, SANTANA, T. A. de, SILVA, E. V, ZENZEN, I. L, LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 3, p.58-68, 2008.

INVAM – **International culture collection of (vesicular) arbuscular mycorrhizal fungi**. Disponível em: <invam.wvu.edu>. Acesso em: 23 mar. 2013.

JANOUSKOVÁ, M, PAVLIKOVÁ, D, MACEK, T, VOSATKA, M. Arbuscular mycorrhiza cadmium phytoextraction by transgenic tobacco with inserted metallothionein. **Plant and Soil**, v. 272, p.29-40, 2005.

JANOUSKOVÁ, M, PAVLIKOVÁ, D, MACEK, T, VOSATKA, M. Influence of arbuscular mycorrhiza on the growth and cadmium uptake of tobacco with inserted metallothionein gene. **Applied Soil Ecology**, v. 29, p.209-214, 2005.

JULIATTI, M. A, PRADO, R. M, BARRIQUELO, M. F, LENZI, E. Cádmio em latossolo vermelho cultivado com milho em colunas: mobilidade e biodisponibilidade. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n.4, p.1075-1081, 2002.

KLAUBERG-FILHO, O, SIQUEIRA, J. O, MOREIRA, F. M. de S. Fungos micorrizicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, n.1, p.125-134, 2002.

KLAUBERG-FILHO, O, SIQUEIRA, J. O, MOREIRA, F. M. de S, SOARES, C. R. F. S, SILVA, S. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. **In: Tópicos em ciência do solo – Volume IV** 1. ed. Viçosa: Ed UFV, 2005.

KIM, C. G, POWER, S. A, BELL, J. N. B. Effects of host plant exposure to cadmium on mycorrhizal infection and soluble carbohydrate levels of *Pinus sylvestris* seedlings. **Environmental Pollution**, v. 131, p.287-294, 2004.

LINHARES, L. A, FILHO, F. B. E, OLIVEIRA, C.V. DE, BELLIS, V. M. Absorção de cádmio e chumbo em solos tropicais altamente intemperizados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p.291-299, 2009.

LINS, C. E. de L, MAIA, L. C, CALVACANTE, U. M. T, SAMPAIO, E. V. de S. B. Efeito de fungos micorrizicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (LAM.) de wit. Em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p.355-363, 2007.

LUCHESE, C. **Efeito do Cádmio sobre a enzima amino levulinato desidratase de pulmão de ratos in vitro: Interação com agentes quelantes e antioxidantes.** Santa Maria, RS, 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Toxicologia), Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MALAVOLTA, E, MORAIS, M. F. Sobre a sugestão dos metais pesados tóxicos em fertilizantes e sobre a portaria 49 de 25/04/2005 da secretaria de defesa agropecuária do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, Postofos. v. 114, p.14, 2006 (Encarte técnico).

MARÇAL, N. S. Avaliação de fontes de fósforo para nutrição mineral de bovinos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.70, p. 255-258, 2003.

MELLONI, R, CARDOSO, E. J. N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas – I: Método Empregado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n.1, p. 53-58, 1999.

MOREIRA, F. M. S, SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. 2. ed. Lavras: Ed UFLA, 2006.

MOSQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. In: RIBEIRO, I. G, MARIN, V. A. A falta de informação sobre os organismos geneticamente modificados no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p.359-368, 2012.

NASCIMENTO, C. N. A. do, PEREIRA, J. B. M. Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 12, p.1303-1308, 1997.

NOGUEIRA, M. A, SOARES, C. R. F. S. Micorrizas Arbusculares e Elementos-Traço. **In: Micorrizas 30 anos de pesquisa no Brasil** 1. ed. Lavras: Ed UFLA, 2010.

OKUMURA, R. S, MARIANO, D. de C, ZACCHEO, P. V. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p.226-244, 2011.

OLIVEIRA, L. F. C, CASTRO, M. L. L. de, RODRIGUES, C, BORGES, J. D. Adsorção e deslocamento do íon cádmio em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 8, p.848-355, 2010.

PAIVA, H. N. de, CARVALHO, J. G. de, SIQUEIRA, J. O. Efeito da aplicação de cádmio sobre o teor de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* VELL.). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p.153-162, 2001.

PAULA, A. M. de, SIQUEIRA, J. O, SOARES, C. R. F. S. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrizica pelo *Glomus etunicatum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.805-811, 2007.

PAWLOWSKA, T. E, CHARVAT, I. Heavy metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. **Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p.6643-16649, 2004.

PEREIRA FILHO, I. A. O cultivo do Milho. **Embrapa Informação Tecnológica**, 1 edição, 2003.

PERNIA B, SOUSA, A. de, REYES, R, CASTRILLO, M. Biomarcadores de contaminación por cádmio em las plantas. **Interciência**, v. 33, n. 2, p.112-119, 2008.

PIERANGELI, M. A. P, GUILHERME, L. R. G, CURI, N, SILVA, M. L. N, LIMA, J. M. de, COSTA, E. T. de S. Efeito do pH na adsorção e dessorção de cádmio em latossolos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p.523-532, 2005.

RAMALHO, J. F. G. P, AMARAL-SOBRINHO, N. M. B, VELLOSO, A. C. X. Acúmulo de metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso contínuo de adubação fosfatada e água de irrigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 4, p.971-979, 1999.

RIBEIRO, I. G, MARIN, V. A. A falta de informação sobre os organismos geneticamente modificados no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p.359-368, 2012.

SAUERBECK, D. The environmental significance of the cadmium content in phosphorus fertilizers. In: BIZARRO, V. G, MEURER, E. J, TASTCH, F. R. P. Teor de cádmio em fertilizantes fosfatados comercializados no Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.247-250, 2008.

SILVA, S. da, SIQUEIRA, J. O, SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrizicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.12, p.1749-1757, 2006.

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

SIQUEIRA, J. O, SOARES, C. R. F. S, SANTOS, J. G. D. dos, SCHNEIDER, J, CARNEIRO, M. A. C. Micorrizas e degradação do solo: Caracterização, efeitos e ação recuperadora. **In: Tópicos em ciência do solo – Volume V** 1. ed. Viçosa: Ed UFV, 2007

SOARES, C. R. F. S, SIQUEIRA, J. O, CARVALHO, J. G. de, GUILHERME, R. G. Nutrição fosfática e micorriza arbuscular na redução da toxicidade de cádmio em trema (*Trema micranta* (L.) Blum. **Revista Árvore**, v.31, n.5, p.783-792, 2007.

SOARES, C. R. F. S, SIQUEIRA, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p.833-841, 2007.

WEISSEHORN, I, GLASHOFF, A, LEYAL, C, BERTITELIN, J. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. **Plant and Soil**, v. 167, p.189-196, 1994.