

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

RÚBIA MARCIA SIQUEIRA MARTINS

**COMPORTAMENTO DE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES EM SOLO CONTAMINADO POR CÁDMIO**

Itajubá (MG)  
2017

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

RÚBIA MARCIA SIQUEIRA MARTINS

**COMPORTAMENTO DE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES EM SOLO CONTAMINADO POR CÁDMIO**

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

**Área de concentração:** Meio Ambiente e Recursos Hídricos

**Orientador:** Prof. Dr. Rogério Melloni

Itajubá (MG)  
2017

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amanhecer de cada dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Melloni, pela oportunidade, confiança, inspiração e ensinamentos.

Aos professores do mestrado que contribuíram para a minha formação.

Aos queridos funcionários da Unifei - Haroldo, Willians e Paulo, pela presteza, amizade e, principalmente, pelas risadas.

Aos alunos de Engenharia Ambiental, que se prontificaram a me ajudar no laboratório - Henrique, Nara, Lucas e Renata, pela dedicação, presteza, pela troca de conhecimentos e boas risadas.

Aos colegas de curso, pelos momentos agradáveis, em especial, Mábele e Patrícia, pelo forte laço de amizade.

À Universidade Federal de Itajubá (Unifei), pela oportunidade de realização do mestrado e pela estrutura oferecida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha querida família, pelo apoio e imenso amor.

Aos meus amigos, pelo companheirismo, carinho e por tornar a caminhada mais leve.

Aos espíritos de luz e estrelas guias, mãe Maria Goreti, avô Jovino, tio Dimas e mestre Fernando Bonillo.

A todos que, de certa forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

Aristóteles

## RESUMO

Devido ao aumento significativo da contaminação do solo por metais pesados, nas últimas décadas, diversas tecnologias que utilizam espécies de plantas e microrganismos capazes de extrair ou metabolizar elementos nocivos ao meio vêm sendo estudadas. O mecanismo que envolve a ação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) na proteção das plantas em solos contaminados é conhecido como micorremediação e tem sido objeto de estudo visando a sua utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas por metais. No entanto, apesar da importância, é pouco conhecido o comportamento de FMAs em solos contaminados por metais pesados, principalmente por cádmio. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento dos FMAs e seu potencial de formação de micorriza em solos artificialmente contaminados por cádmio. Para isso, foi instalado um experimento em casa de vegetação, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema trifatorial com quatro doses crescentes de Cd (0, 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>), três espécies de FMAs (*Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea* e *Acaulospora scrobiculata*), com um controle, duas posições de infestação com FMAs (em ambiente contaminado e não contaminado por Cd) e três repetições por tratamento, totalizando 75 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi composta por um sistema construído por tubos de PVC, dividido em dois compartimentos por uma tela de malha 40 µm, e mistura de solo e areia como substrato de cultivo, com uma planta de milho em cada compartimento, como planta teste. O experimento foi conduzido por 50 dias e avaliados os atributos: porcentagem de colonização, intensidade de colonização, comprimento do micélio extrarradicular total, número de esporos, matéria seca da parte aérea e matéria fresca da raiz. Os resultados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% e análise de regressão. A partir das análises desses atributos comprovou-se que, apesar da diferença de comportamento entre todas as espécies em relação ao aumento das doses de Cd, nas duas condições estudadas, houve deslocamento dos FMAs, tanto da região não contaminada para a região contaminada por Cd quanto da região contaminada por Cd para a região não contaminada. Tal resultado mostra a capacidade desses FMAs se deslocarem em solos contaminados até 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, possibilitando a formação de micorriza em hospedeiros cultivados nesses ambientes. As plantas colonizadas pelas espécies de FMAs e a planta não micorrizada apresentaram sintomas de toxidez nas doses mais elevadas de Cd (10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>), com redução da matéria seca, o que demonstra que não houve efeito benéfico/protetor da associação micorrízica diante das doses mais altas do contaminante. Todas as espécies de FMAs apresentaram comportamento diferenciado na produção de propágulos, em relação ao aumento das doses de Cd, nas duas condições estudadas.

Palavras-chave: Contaminação do solo. Propágulos. Micélio. Colonização micorrízica.

## ABSTRACT

Due to the significant increase of soil contamination by heavy metals in the last decades, several technologies which use plant species and microorganisms capable of extracting or metabolizing harmful elements in the environment have been studied. The mechanism that involves the action of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the protection of plants in contaminated soils is known as micorremediation and has been object of a study once its use aims at revegetation programs of areas contaminated by metals. However, the behavior of AMF in soils contaminated by heavy metals, mainly by cadmium, is not very known in spite of the importance. Thus, in this context, the purpose of this study was to analyze the behavior of AMF and its potential of formation of mycorrhiza in soils artificially contaminated by cadmium. For this, a greenhouse experiment was implemented using a completely randomized design in a tri-factorial scheme with four increasing doses of Cd (0, 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>), three species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea* and *Acaulospora scrobiculata*) with one control, two infestation positions with AMF (contaminated and non-contaminated compartment by Cd) and three replicates per treatment, totalizing 75 experimental units. Each experimental unit consisted of a system constructed of PVC pipes, divided into two compartments by a mesh screen 40 µm, and mixing of soil and sand as a substrate, with a corn plant in each compartment, as a test plant. The experiment was conducted for 50 days and evaluated the attributes: colonization percentage, colonization intensity, total extraradicular mycelium length, number of spores, shoot dry matter and fresh root matter. The results were submitted to the Tukey's test at 5% and to regression analysis. From the attributes analysis, it was possible to verify that although the difference in behavior between all species towards the increase of Cd doses in the two studied conditions, the AMF were displaced both from the non-contaminated to the contaminated region by Cd and from the contaminated region by Cd to the non-contaminated region. This result shows the ability of these AMF to migrate in contaminated soils up to 20 mg kg<sup>-1</sup> of Cd, what permits the formation of mycorrhiza in hosts grown in these environments. The plants colonized by AMF and the non-mycorrhizal plant presented toxicity symptoms at the highest doses of Cd (10 and 20 mg kg<sup>-1</sup>), with a reduction of dry matter, which shows that there was no beneficial/protective effect of the mycorrhizal association with the highest doses of the contaminant. All AMF species presented differentiated behavior in the production of propagules regarding the increase of Cd doses in the two studied conditions

Key words: Soil contamination. Propagules. Mycelium. Mycorrhizal colonization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Vista do experimento após 11 dias de semeadura. A- Plantas antes do desbaste. B- Plantas após o desbaste.....	21
<b>Figura 2</b> - Croqui do esquema de montagem do experimento.....	22
<b>Figura 3</b> - Deslocamento do FMA inoculado na região não contaminada por cádmio (compartimento A) para a região contaminada (compartimento B), no sistema referente à condição 1.....	22
<b>Figura 4</b> - Deslocamento do FMA inoculado na região contaminada por cádmio (compartimento B) para a região não contaminada (compartimento A), no sistema referente à condição 2.....	23
<b>Figura 5</b> -Montagem do sistema em PVC. A- Etapas da montagem. B- Sistema finalizado ..	23
<b>Figura 6</b> - Acondicionamento e pesagem das amostras. A- Amostras para a pesagem após secagem na estufa. B- Pesagem das amostras na balança analítica.....	25
<b>Figura 7</b> - Determinação da massa da matéria fresca da raiz. A e B- Diferença visual no desenvolvimento das raízes. C- Pesagem da raiz na balança analítica.....	25
<b>Figura 8</b> - Procedimento de coloração das raízes. A e B-Acondicionamento das raízes em cassetes. C- Aquecimento em solução de KOH 10% a 90°C em banho-maria. D- Coloração em solução de azul de tripano 0,05%, ácido clorídrico 0,5%, glicerina e água destilada. ....	26
<b>Figura 9</b> - Análise da intensidade de colonização radicular. A- Preparação da lâmina de microscopia com 10 segmentos de raízes. B e C- Imagens do microscópio óptico: hifas fúngicas colonizando a raiz da planta. ....	26
<b>Figura 10</b> - Análise da porcentagem de colonização radicular. A- Raízes dispostas em placa quadriculada. B- Visualização no microscópio estereoscópico.....	27
<b>Figura 11</b> - Etapas do processo de extração do micélio. A- Amostras de solo para pesagem. B- Pesagem de 10 g de amostra de solo. C- Adição de 1500 mL de água da torneira. D- Agitação da amostra. E – Agitação no liquidificador. F – Peneiramento em malhas de 0,50 mm e 0,25 mm. ....	28
<b>Figura 12</b> - Etapas do processo de extração do micélio e observação no microscópio óptico. A- Retirada de 500 mL da amostra. B- Peneiramento em malha de 0,045 mm. C- Lavagem da malha – D- Coleta de 11 mL da suspensão. E- Adição de 5 mL da suspensão na membrana de triacetato de celulose quadriculada. F- Membrana de triacetato de celulose quadriculada delimitada. G – Visualização no microscópio óptico. H- Imagem do microscópio óptico: segmentos de hifas fúngicas. ....	28

<b>Figura 13</b> - Etapas do processo de extração dos esporos. A- Adição da amostra de solo ao béquer. B- Lavagem da amostra em água corrente. C- Agitação da amostra – D- Peneiramento em malhas de 0,71 e 0,053. E- Coleta do conteúdo retido na última peneira. F- Tubos dispostos na centrífuga. G – Adição da sacarose 50 % ao conteúdo retido no tubo. H- Peneiramento do sobrenadante em malha 0,045 mm. ....	29
<b>Figura 14</b> - Contagem do número de esporos. A e B- Visualização no microscópio estereoscópico.....	30
<b>Figura 15-</b> Atributos microbiológicos relacionados ao deslocamento das espécies <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Rhizophagus clarus</i> e <i>Gigaspora rosea</i> , da região não contaminada (compartimento A) para a região contaminada por Cd (compartimento B) nos sistemas referentes à condição 1. A – Porcentagem de colonização. B - Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extrarradicular. D – Número de esporos. Médias com letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância .....	32
<b>Figura 16</b> - Comportamento das espécies <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Rhizophagus clarus</i> e <i>Gigaspora rosea</i> deslocadas da região não contaminada (compartimento A) para a região contaminada por Cd (compartimento B) nos sistemas referentes à condição 1, em relação às doses de Cd. A – Porcentagem de colonização. B - Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extrarradicular. D – Número de esporos. * = $p < 0,05$ ; ** = $p < 0,01$ . ....	35
<b>Figura 17</b> - Atributos microbiológicos relacionados ao deslocamento das espécies <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Rhizophagus clarus</i> e <i>Gigaspora rosea</i> , da região contaminada por Cd (compartimento B) para a região não contaminada (compartimento A) nos sistemas referentes à condição 2. A – Porcentagem de colonização. B - Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extrarradicular. D – Número de esporos. Médias com letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância. ....	38
<b>Figura 18</b> - Comportamento das espécies <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Rhizophagus clarus</i> e <i>Gigaspora rosea</i> deslocadas da região contaminada (compartimentos B) para a região não contaminada (compartimentos A) nos sistemas referentes à condição 2, em relação às doses de Cd. A – Porcentagem de colonização. B - Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extrarradicular. D – Número de esporos. * = $p < 0,05$ ; ** = $p < 0,01$ ; ns = não significativo. ....	41
<b>Figura 19</b> - Crescimento do milho micorrizado com as espécies <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Rhizophagus clarus</i> e <i>Gigaspora rosea</i> e não micorrizado na região contaminada por Cd. A –	



Matéria seca da parte aérea. B – Matéria Fresca da raiz. Médias com letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância.....42

**Figura 20** - Comportamento das plantas micorrizadas com as espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea*, e não micorrizadas, em relação às doses de Cd. A – Matéria seca da parte aérea. B – Matéria Fresca da raiz. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = não significativo.....43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição física e química de amostra do Latossolo vermelho distrófico típico, utilizado na montagem do experimento.....	24
<b>Tabela 2</b> - Matriz de correlação de Pearson para a planta colonizada com <i>Acaulospora scrobiculata</i> na região contaminada por Cd.....	45
<b>Tabela 3</b> - Matriz de correlação de Pearson para a planta colonizada com <i>Rhizophagus clarus</i> na região contaminada por Cd.....	45
<b>Tabela 4</b> - Matriz de correlação de Pearson para a planta colonizada com <i>Gigaspora rosea</i> na região contaminada por Cd.....	46

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	13
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
3.1 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) – definição e importância .....	15
3.2 Contaminação do solo por cádmio e seus efeitos nas plantas .....	16
3.3 Comportamento dos FMAs em solo contaminado por metais.....	18
3.4 Emprego dos FMAs na fitorremediação de metais pesados .....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 Condução do experimento .....	21
4.2 Determinação do crescimento do milho .....	24
4.3 Determinação dos atributos microbiológicos .....	25
4.3.1 Avaliação da intensidade e da porcentagem de colonização radicular .....	25
4.3.2 Determinação do comprimento de micélio extrarradicular total .....	27
4.3.3 Determinação do número de esporos.....	28
4.4 Análises estatísticas .....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Deslocamento de micélio e formação de micorriza em solo contaminado por Cd .....	31
5.2 Deslocamento de micélio e formação de micorriza em solo não contaminado.....	37
5.3 Crescimento do milho micorrizado e não micorrizado em solo contaminado por cádmio.....	42
6 CONCLUSÕES .....	48
REFERÊNCIAS .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

Alguns metais pesados, como o Cu, Ni, Cr, Fe, Mn e Zn, são considerados essenciais para a nutrição dos organismos vivos, porém quando acumulados no solo, em elevadas concentrações, tornam-se tóxicos para a biota edáfica, com efeitos cumulativos na cadeia trófica, ocasionando, inclusive, riscos à saúde humana (PAIVA et al., 2004; ALVARENGA, 2013).

Entre os metais não essenciais ao metabolismo biológico e causadores de poluição do solo, destaca-se o cádmio, o qual apresentou um aumento de ocorrência significativo no meio ambiente, advindo das atividades antrópicas (OSKARSSON et al., 2004). O cádmio é amplamente encontrado na natureza e liberado pela intemperização de rochas magmáticas e sedimentares, emissões de gases de atividades vulcânicas, queimadas de florestas e transporte de materiais particulados (ZHAO et al., 2007; BURAK et al., 2010). Porém, a sua emissão por fontes antropogênicas originária de poluentes industriais, queima de combustíveis fósseis, uso de fertilizantes, atividades de mineração e disposição inadequadas de resíduos configura-se superior à contaminação natural (OSKARSSON et al., 2004; LU et al., 2012).

Devido ao aumento significativo da contaminação do solo por metais pesados, nas últimas décadas, diversas tecnologias que utilizam espécies de plantas e microrganismos capazes de extrair ou metabolizar elementos nocivos ao meio vêm sendo estudadas para a remediação de áreas impactadas, e são genericamente denominadas de fitorremediação (ANDRADE et al., 2009; MUGOUEI et al., 2011). Nos processos de fitorremediação, os poluentes inorgânicos como os metais pesados não podem ser decompostos, porém são estabilizados no solo ou permanecem retidos nos tecidos de plantas hiperacumuladoras (COBBETT; GOLDSBROUGH 2002; PEREIRA et al., 2012). Nesse sentido, são diversos os mecanismos que regem o potencial de tolerância das espécies utilizadas no processo de fitorremediação do solo. A associação entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode ser considerada como um dos mecanismos que contribui para essa tolerância a fatores de estresse. Porém, de acordo com Jentschke, Winter, Godbold (1999), Klauberg-Filho et al. (2005) e Del Ducca et al. (2015) elevada concentração de metais pesados disponíveis no solo pode ser considerada tóxica para esses fungos, alterando sua capacidade de associação e proteção às plantas.

Atualmente, o mecanismo que envolve a ação de FMAs na proteção das plantas em solos contaminados é conhecido como micorremediação, e tem sido objeto de estudo visando a sua utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas por metais (NOGUEIRA,

2007; NOGUEIRA; SOARES, 2010). Apesar dos mecanismos usados na estabilização dos metais pesados, ainda não estarem elucidados, pesquisas sugerem que existe maior retenção dessas substâncias no micélio fúngico, por adsorção e fixação em grânulos de polifosfato, protegendo a planta contra o excesso de metais (HALL, 2002; OLGUÍN et al., 2007; KERBAUY, 2012).

A associação entre FMAs e plantas possui grande importância na competição, sucessão das espécies vegetais e na produtividade agrícola, por meio dos seus efeitos benéficos na nutrição e na otimização dos mecanismos de tolerância dessas plantas a fatores de estresses abióticos (BROWN; BETHLENFALVAY, 1987; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; COLODETE et al., 2014; VALADARES; MESCOLOTTI; CARDOSO, 2016). No entanto, há necessidade de se conhecer o crescimento micelial de FMAs, em solos contaminados por cádmio, o qual tem relação direta com a formação de micorriza e crescimento das plantas em solos sujeitos a essa contaminação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito do cádmio na movimentação de hifas de FMAs em solos contaminados e não contaminados por Cd, utilizando milho como planta-hospedeira.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar o efeito do Cd na formação de propágulos de FMAs, como número de esporos, comprimento de micélio extrarradicular total e porcentagem de colonização radicular em solos contaminados por Cd;
- Analisar o crescimento micelial de FMAs em solos contaminados e não contaminados por Cd;
- Relacionar o crescimento de milho com a infestação de solos por FMAs e contaminados por Cd.

### **3REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) – definição e importância**

Micorrizas arbusculares são associações simbióticas formadas entre fungos pertencentes ao filo Glomeromycota e raízes de plantas da maioria dos gêneros das Gimnospermas e Angiospermas, e alguns representantes das Briófitas e Pteridófitas (MORTON; BENNY, 1990; SCHÜBLER, SCHWARZOTT, WALKER, 2001). Os primórdios dessa associação datam cerca de 400 milhões de anos, quando iniciaram -se os processos de colonização do ambiente terrestre (SIMON et al., 1993).

Entre os diferentes tipos de associações micorrízicas encontradas, 80% são formadas por espécies de FMAs, os quais destacam-se por seu potencial biotecnológico, contribuindo na sustentabilidade da agricultura em regiões tropicais, devido ao seu impacto na estrutura das comunidades vegetais (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

A contribuição do FMA para as espécies vegetais, vai muito além do seu papel na associação mutualística nutricional, em que o fungo se beneficia do fornecimento de carbono, via produtos fotossintéticos e provê a planta com nutrientes e água (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; VALADARES; MESCOLOTTI; CARDOSO, 2016). Também possui significativo impacto na estabilidade dos agregados do solo, ao intemperismo de minerais, tolerância ao estresse hídrico, eficiência fotossintética, e conferem resistência a planta diante de ataque patogênico (BROWN; BETHLENFALVAY, 1987; CARDOSO et al., 2010, VALADARES; MESCOLOTTI; CARDOSO, 2016).

A colonização de uma planta hospedeira para o estabelecimento da micorriza arbuscular resulta de uma relação simbiótica caracterizada por uma perfeita integração morfológica, bioquímica e funcional dos simbioss. A resposta da planta hospedeira se dá pela regulação do micotrofismo, enquanto que o biotrofismo controla o grau de colonização e de produção de propágulos como os esporos assexuados e as redes de hifas, e também regula a formação do apressório na epiderme da raiz e posterior penetração no córtex por pressão mecânica e degradação enzimática da parede celular vegetal pelas pectinases, celulasas e hemicelulasas emitidas pelo fungo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SMITH; READ, 2008).

Dentro da raiz o FMA diferencia-se em hifas enoveladas e arbúsculos, e coloniza o apoplasto e as células do córtex para ter acesso à fonte de carbono da planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Depois do estabelecimento da simbiose, as hifas micorrízicas extrarradiculares (HME) expandem-se no solo e absorvendo, também, os nutrientes de baixa

mobilidade e os translocando para o hospedeiro, sendo assim, influem no crescimento e desenvolvimento do vegetal, no armazenamento de carbono por meio da produção de glomalina e na estruturação do solo (WRIGHT et al., 1996; RILLIG; MUMMEY, 2006).

As simbioses formadas pelas micorrizas arbusculares são constituídas por inúmeros componentes que determinam a taxa de colonização, incidência de propágulos e os seus efeitos nas plantas e ecossistema. Os componentes principais desse sistema, constituído pelo fungo micorrízico, planta e solo, apresentam grande interdependência, e sofrem significativa influência de fatores do meio, tais como, disponibilidade de nutrientes, pH, biota, características e manejo do solo, planta hospedeira, e a presença de metais pesados em concentrações tóxicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

### **3.2 Contaminação do solo por cádmio e seus efeitos nas plantas**

Assim como outros elementos no solo, os metais pesados sofrem processos de biociclagem por meio da absorção pelas plantas, transformação em biomassa microbiana, ou em formas iônicas que se associam as demais estruturas do solo. Podem ser encontrados no solo em diversas formas, adsorvidos ou complexados nos coloides orgânicos e inorgânicos, retidos nos sítios de troca, solúveis em água, precipitados, insolúveis na forma de óxidos, hidróxidos e carbonatos, ou na estrutura dos minerais primários e secundários (ALLOWAY, 1995; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Apesar desses mecanismos serem bem descritos, a capacidade de acúmulo de metais na biomassa do solo, enfatizando os metais não essenciais ao metabolismo da planta, ainda está pouco elucidada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os sintomas de toxidez em plantas submetidas a elevadas doses de metais pesados vêm sendo estudados por diversos autores, sendo descritos efeitos visíveis como redução do crescimento, clorose e atrofia foliar, necrose e a redução da absorção e transporte de água e nutrientes (SIEDLECKA; KRUPA, 1996; BENAVIDES et al., 2005).

O cádmio é um metal pesado de densidade  $8,6 \text{ g cm}^{-3}$ , encontrado em minérios de zinco, chumbo e cobre, está associado a sulfitos, e não possui estado livre na natureza (MALAVOLTA, 1994; SOUZA et al., 2009). Além das suas fontes naturais de contaminação, originárias das atividades vulcânicas, intemperização de rochas, queima de florestas e emissões de materiais particulados, o cádmio pode ser encontrado em níveis mais elevados, no solo e água de regiões industriais e áreas agrícolas, a partir do uso intensivo de fertilizantes fosfatados (OSKARSSON et al., 2004).



Constituindo uma importante fonte de contaminação, o cádmio é utilizado na fabricação de pilhas, baterias, plásticos, produtos de metalurgia e outros produtos industrializados (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2012). Apresenta grande potencial de toxicidade nos processos biológicos e pode causar alterações no desenvolvimento de espécies vegetais, além de poder ser transferido para a cadeia trófica por meio do efeito cumulativo nos tecidos vegetais, tornando-se a principal via de contaminação em seres humanos e espécies animais (VECCHIA et al., 2005).

Segundo Chugh e Sawhney (1996), Kabata-Pendias e Pendias (2000) e Shaw et al. (2004) um efeito observado na germinação das sementes submetidas a solos com altos níveis de cádmio é a inibição da atividade das amilases, comprometendo a respiração e causando a inibição do desenvolvimento do eixo embrionário e da radícula. Segundo Kurdziel et al. (2004) e Losch (2004) o cádmio causa a oxidação de grupos sulfidril (SH) interligados por ligações dissulfeto, que em reação com o enxofre, provoca o rompimento das ligações dissulfeto e a desnaturação de proteínas, ocasionando a redução da atividade enzimática da planta.

O cádmio pode alterar as atividades das enzimas envolvidas no Ciclo de Calvin, glicose e assimilação de sulfato (SHAH et al., 2001; FORNAZIER et al., 2002; CARDOSO et al., 2002; PEREIRA et al., 2002) e interferir no processo fotossintético, atuando indiretamente no fechamento estomático da planta, levando à ruptura das membranas celulares (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001; FORNAZIER et al., 2002; ANDRADE et al., 2009).

Concomitantemente às observações nas alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas em espécies vegetais sensíveis ao cádmio, também foram observados que algumas outras espécies adquiriram importantes instrumentos de tolerância frente aos seus efeitos tóxicos. Apesar desses dispositivos de tolerância ainda não estarem totalmente esclarecidos, Cobbett e Goldsbrough (2002) citam que a quelatação por glutatona (GSH) ou por fitoquelatinas (PCs) e o acúmulo desses complexos em vacúolos, representa uma importante forma de detoxificação em uma grande variedade de espécies vegetais. Outros mecanismos incluem a restrição na absorção de metais pesados pelo sistema radicular associado a micorrizas e a redução do influxo do metal através da membrana plasmática e efluxo ativo para o apoplasto da planta (HALL, 2002; OLGUÍN et al., 2007; KERBAUY, 2012).

A imobilização do cádmio na raiz pode ser considerada a primeira barreira temporal de defesa da planta contra o seu potencial de toxicidade (LOMBI et al., 2001). Os grupos carboxílicos com carga negativa nos polímeros da parede celular, e os exsudatos radiculares possuem poder quelante sobre o cádmio (NISHIZONO et al., 1989; WAGNER, 1993; LEITA et al., 1996).

### 3.3 Comportamento dos FMAs em solo contaminado por metais

De acordo com Klauberg-Filho et al. (2005), o excesso de metais no solo pode causar a inibição da germinação e do desenvolvimento inicial das hifas fúngicas, podendo atrasar ou suprimir a formação da micorriza, reduzir o grau de colonização e inibir a germinação dos esporos.

Del Val et al. (1999) enfatizam que os efeitos dos metais variam entre as diferentes espécies de FMAs, podendo ser observado em estudos realizados por Cardoso, Navarro e Nogueira (2002), Bartolome - Esteban e Schenck (1994) grande inibição de algumas espécies de FMAs, e baixa sensibilidade de outras, quando submetidas a doses crescentes de Manganês (Mn) e alumínio (Al), sendo esses resultados considerados um importante fator para a seleção de FMAs tolerantes a determinados metais.

Para Leyval et al. (1997), existem dois aspectos a serem considerados nas interações entre FMAs e metais – os efeitos dos metais sobre as espécies de FMAs e seus mecanismos de tolerância, e os efeitos dos FMAs na disponibilidade e transferência de metais à planta associada.

No que diz respeito à maior absorção de plantas a determinados metais, Kaldorf et al. (1999) sugerem que o efeito dos FMAs nessa absorção, em alguns casos, é metal-específico e também depende das suas concentrações no solo. Espécies vegetais, assim como os microrganismos encontrados na rizosfera, podem adquirir resistência a metais, por mecanismos que restringem seu processo de absorção, ou pelos dispositivos de tolerância a altas concentrações do metal (BAKER, 1987).

De acordo com Joner, Briones e Leyval (2000) as micorrizas podem atuar na proteção das plantas em solos contaminados com metais, por meio da retenção dessas substâncias nas suas raízes, reduzindo, assim, sua distribuição na parte aérea.

Os exsudados radiculares como os íons, ácidos inorgânicos, compostos de carbono de baixo e alto peso molecular medeiam as interações das associações simbióticas de micorrizas, rizóbios e rizobactérias (BAIS et al., 2006; BADRI; VIVANCO, 2009). Em estudos realizados, Malcová e Gryndler (2003) observaram a supressão dos efeitos inibitórios de Cd e Mn sobre o desenvolvimento das hifas de fungos micorrízicos, ocasionado pela liberação de exsudatos em raízes de milho. Os autores atribuíram o resultado à quelatação dos metais pelos compostos orgânicos presentes nos exsudatos. Olsson et al. (1988) e Lindermann (1988) citaram que a presença de micorriza altera quantitativa e qualitativamente a comunidade microbiana. E, de acordo com Scot e Palmer (1990), os polissacarídeos extracelulares produzidos por

microrganismos e raízes têm a capacidade de adsorver metais. Assim, o metal adsorvido ficaria impossibilitado de ser absorvido pela planta.

### **3.4 Emprego dos FMAs na fitorremediação de metais pesados**

A fitorremediação é uma técnica *in situ*, na qual são utilizadas plantas e microrganismos associados à rizosfera para degradar, imobilizar ou isolar poluentes no solo e nas águas subterrâneas. Esse método é considerado apazível pelo seu baixo custo de implantação e operação, e por não utilizar processos mecânicos, que causam significativa mudança na estrutura do solo (MARQUES, 2005).

A técnica de fitorremediação pode ser dividida em processos baseados na fisiologia da planta, que conferem a capacidade de sequestro, acúmulo e degradação dos contaminantes nos tecidos vegetais, tais como: fitoestabilização, fitovolatilização, fitodegradação, fitoestimulação e fitoextração (PILON-SMITS, 2005). É empregada para a descontaminação de solos com substâncias orgânicas ou inorgânicas, como os metais pesados, hidrocarbonetos de petróleo, agrotóxicos, solventes clorados, e outros produtos potencialmente tóxicos (PILON-SMITS, 2005).

Marques, Aguiar e Silva (2011) preconizam que os inúmeros fatores que envolvem a elucidação dos mecanismos no processo de fitorremediação, para a expansão dessa tecnologia, depende de pesquisas que devem aprimorar desde as etapas da escolha e implantação das espécies vegetais na área, assim como os estudos da rota metabólica e transformação do contaminante, até a correta destinação da biomassa gerada.

Estudos mais recentes demonstram que o emprego de FMAs associados às plantas tolerantes a metais pesados apresenta-se como alternativa viável no processo de remediação de solos contaminados. Essas pesquisas indicam que os FMAs em ambientes contaminados por metais podem contribuir para a atenuação da toxidez, ou até mesmo reduzir a absorção pelas plantas, podendo abrir perspectivas para a sua utilização na recuperação de áreas contaminadas, dado aos seus mecanismos que contribuem com o estabelecimento de espécies vegetais em ambiente desfavorável (NOGUEIRA, 2007).

Diversos estudos indicam o potencial da fitorremediação de metais pesados, com o emprego de FMAs. Carneiro, Siqueira e Moreira (2001) constataram que a associação de gramíneas aos FMAs aumentou a extração de metais e auxiliou no estabelecimento de gramíneas na região contaminada. Hetrick et al. (1994) demonstraram a influência dos FMAs na revegetação de solos de atividade minerária com altos teores de metais pesados. De acordo

com os autores, as plantas micotróficas obrigatórias e as facultativas se beneficiaram da micorrização e obtiveram aumento da tolerância ao excesso de metais. Carneiro, Siqueira e Moreira (2001) sugerem a utilização de mistura de espécies vegetais com formação de micorriza, e espécies não micorrizadas, porém tolerantes, para a recuperação de áreas com excesso de metais pesados, com o intuito de imobilizar parte desses metais, e favorecer o restabelecimento das plantas micotróficas.

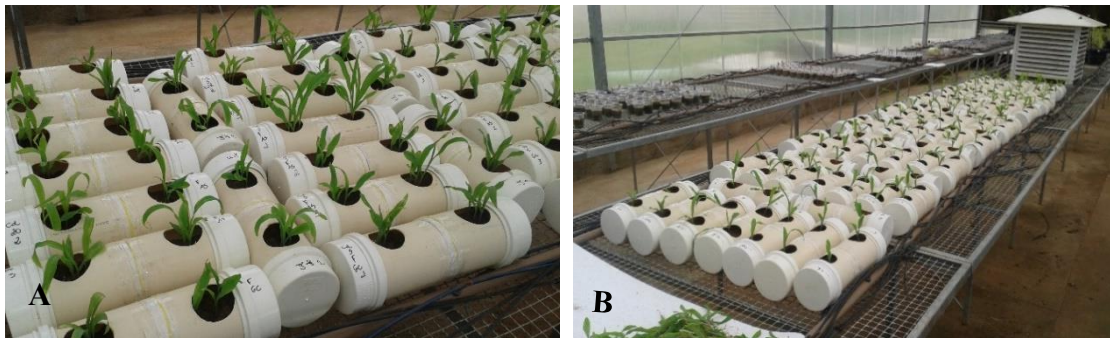
O emprego dos fungos micorrízicos pode ser essencial nos trabalhos que visam a recuperação de áreas contaminadas por metais. Porém é imprescindível a seleção de endófitos tolerantes ao contaminante encontrado no local, dado que a proteção da planta ao excesso de metal, mediada pelo FMA, depende, também, da interação fungo-hospedeiro (GRAHAM; EISSENSTAT, 1994; SHETTY; HETRICK; SCHWAB, 1995; DÍAZ et al., 1996; NOGUEIRA; SOARES, 2010; GARCIA et al., 2016).

Assim, estudos relacionados ao comportamento de propágulos de FMAs são essenciais para o entendimento da formação da simbiose com plantas cultivadas em solos contaminados por metais pesados, particularmente por Cd.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Condução do experimento

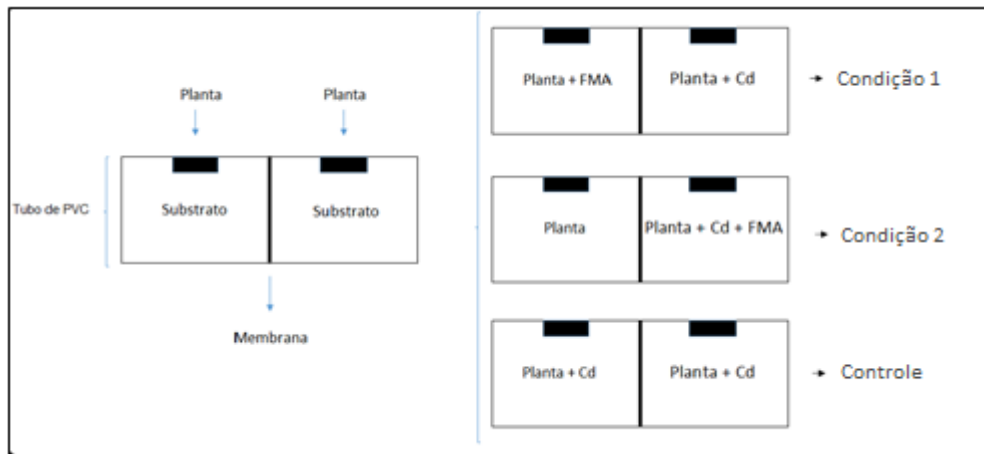
O experimento (Figura 1) foi instalado em 14/12/2015 e conduzido na casa de vegetação, com ventilação forçada de ar, sob temperatura controlada de 28°C, da Universidade Federal de Itajubá, em Itajubá (MG) sob as coordenadas 22° 25' 32" de latitude Sul, 45° 27' 10" de longitude Oeste e altitude de 856 m.



**Figura 1** - Vista do experimento após 11 dias de semeadura. A- Plantas antes do desbaste. B- Plantas após o desbaste.

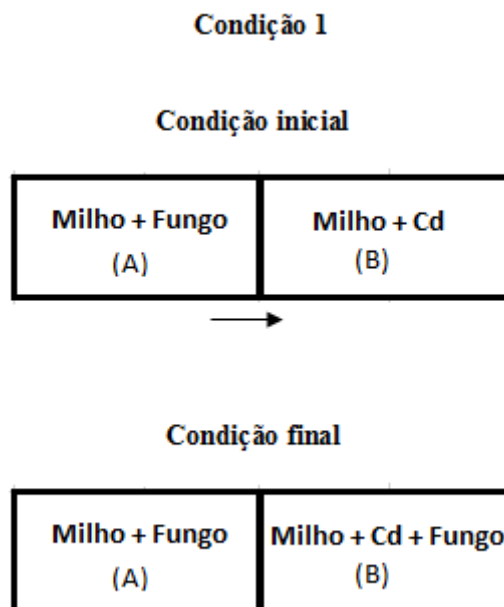
Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema trifatorial 4 x 3 x 2, sendo o fator 1 correspondente as quatro doses de cádmio: (0, 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>), de acordo com Cunha et al. (2008), o fator 2 as três espécies de fungos: *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea*, *Acaulospora scrobiculata*, e o fator 3 correspondente às duas condições de infestação com FMAs, três repetições por tratamento, e um tratamento controle, contendo as quatro doses de cádmio. No entanto, na segunda condição foram aplicadas apenas três doses de cádmio (5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>). Foi empregado, também, um tratamento controle, contendo as quatro doses de cádmio, sem adição de FMAs e com três repetições cada. No total, o experimento contou com 75 unidades experimentais, divididas por duas secções.

O esquema dos sistemas utilizados para a distribuição dos tratamentos pode ser visto na figura 2.

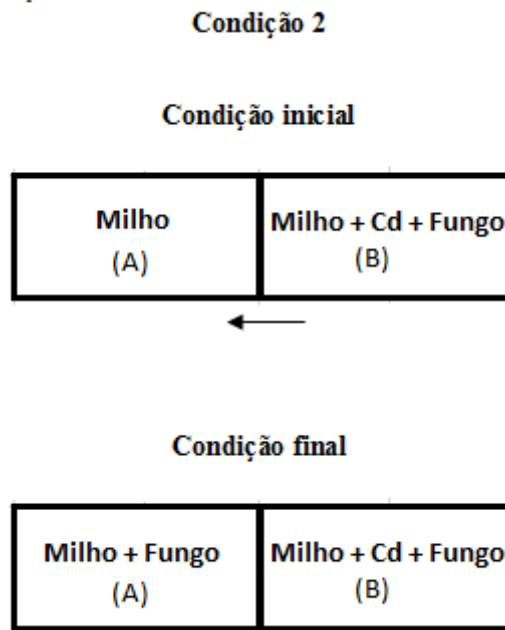


**Figura 2** - Croqui do esquema de montagem do experimento.

Para avaliar o deslocamento dos FMAs e formação de micorriza, duas condições ou posições foram estudadas: condição 1 (se o fungo se move de região não contaminada para outra contaminada) e condição 2 (se o fungo se move de região contaminada para outra não contaminada). Essas condições estão representadas pelos esquemas apresentados nas figuras 3 e 4, respectivamente.

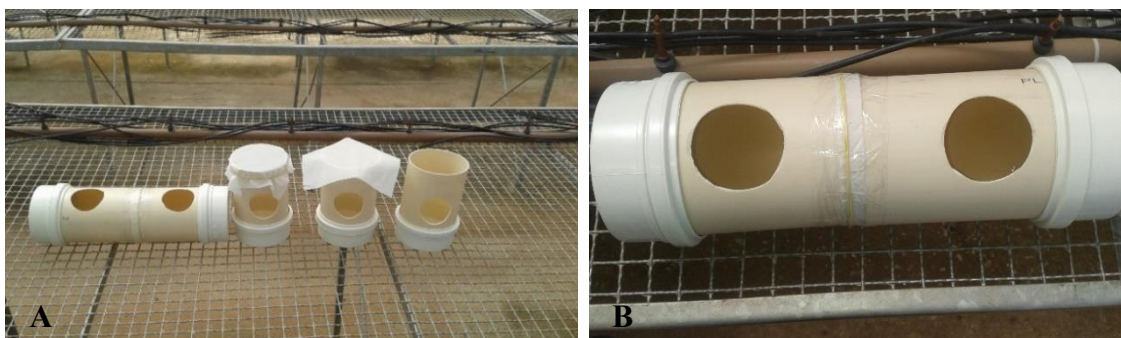


**Figura 3** - Deslocamento do FMA inoculado na região não contaminada por cádmio (compartimento A) para a região contaminada (compartimento B), no sistema referente à condição 1.



**Figura 4** - Deslocamento do FMA inoculado na região contaminada por cádmio (compartmento B) para a região não contaminada (compartmento A), no sistema referente à condição 2.

O experimento foi realizado em sistemas constituídos por tubos de PVC de 100 mm – 4” de diâmetro, compostos por dois compartimentos de 15 cm cada. Entre os compartimentos foi inserida uma tela de poliéster, com abertura de malha de 40 µm, conforme recomendação de Cruz (1998), para permitir a movimentação das hifas fúngicas e impedir a passagem de raízes (Figura 5).



**Figura 5** -Montagem do sistema em PVC. A- Etapas da montagem. B- Sistema finalizado

O substrato foi composto por amostra de horizonte A de Latossolo vermelho distrófico típico peneirado em malha de 2mm e areia média, na proporção de 1:1, esterilizado em autoclave por 1 h a 121°C. As análises das amostras do solo foram realizadas pela Universidade Federal de Viçosa, segundo recomendações da Embrapa (1997) e sua composição física e química encontra-se na tabela 1.

**Tabela 1** - Composição física e química de amostra do Latossolo vermelho distrófico típico, utilizado na montagem do experimento

<b>Areia grossa</b> (kg/kg)	<b>Areia fina</b> (kg/kg)	<b>Silte</b> (kg/kg)	<b>Argila</b> (kg/kg)	<b>Classificação textural</b>	<b>Tipo de solo</b>	<b>pH H<sub>2</sub>O</b>
0,166	0,115	0,117	0,602	Muito argilosa	3	4,65
<b>P</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	<b>K</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	<b>Na</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	<b>Ca<sup>2+</sup></b> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	<b>Mg<sup>2+</sup></b> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	<b>Al<sup>3+</sup></b> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	<b>H+Al</b> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )
0,6	5	7,5	0,26	0,04	1,7	7,4
<b>SB</b> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	<b>t</b> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	<b>T</b> (cmol <sub>c</sub> /dm)	<b>V</b> (%)	<b>m</b> (%)	<b>ISNa</b> (%)	<b>MO</b> (dag/kg)
0,35	2,05	7,75	4,5	82,9	0,42	2,5
<b>P-Rem</b> (mg/L)	<b>Cu</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	<b>Mn</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	<b>Fe</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	<b>Zn</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	-	-
10,3	1,5	0,6	21,8	1,93	-	-

O substrato foi distribuído nos sistemas e receberam três sementes de milho (*Zea mays* L.) por compartimento. As sementes foram previamente desinfestadas com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1%, de acordo com Lazarotto, Muniz e Santos (2010).

Posteriormente, foi feita a infestação dos substratos com porções de terra e propágulos de FMAs das espécies - *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea*, *Acaulospora scrobiculata*, obtidos da ESALQ/USP, para aplicação de cerca de 100 esporos por planta.

#### 4.2 Determinação do crescimento do milho

Aos 50 dias, após a infestação do substrato, separou-se a parte aérea da parte radicular das plantas, cortando-se com tesoura o colo da planta, rente à superfície do solo, e acondicionando em sacos de papel devidamente identificados. A massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) do milho foi determinada após secagem em estufa de circulação de ar forçado, à temperatura de 60°C até peso constante (Figura 6).





**Figura 6** - Acondicionamento e pesagem das amostras. A- Amostras para a pesagem após secagem na estufa. B- Pesagem das amostras na balança analítica.

A massa da matéria fresca das raízes (MFR) do milho foi determinada pesando-se a raiz, após lavagem em água corrente (Figura 7).



**Figura 7** - Determinação da massa da matéria fresca da raiz. A e B- Diferença visual no desenvolvimento das raízes. C- Pesagem da raiz na balança analítica.

### 4.3 Determinação dos atributos microbiológicos

#### 4.3.1 Avaliação da intensidade (ICR) e da porcentagem de colonização radicular (PCR)

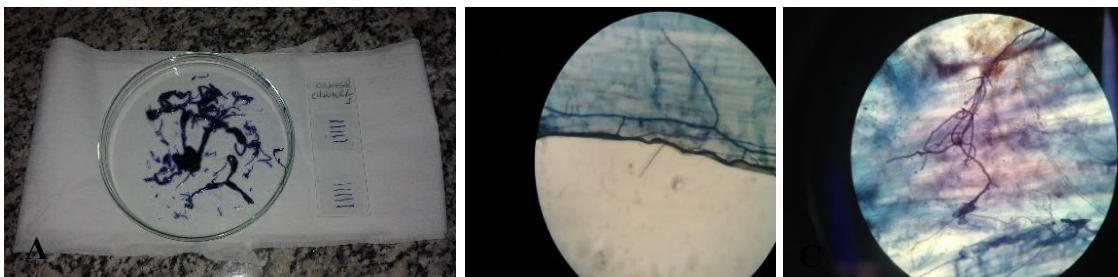
Após a pesagem da massa da matéria fresca das raízes, essas foram acondicionadas em frascos com álcool 70% identificados e armazenados à temperatura ambiente. Para a determinação da intensidade de colonização radicular dos FMAs utilizaram-se metodologias de coloração descritas em Phillips e Haymann (1970) e Bethlenfalvay et al. (1981). Para isso, as

raízes foram acondicionadas em cassetes plásticos, aquecidas em solução de KOH 10% a 90°C em banho-maria por quarenta minutos, lavadas em água corrente, acidificadas em HCl 1% e coloridas em solução de azul de tripano 0,05%, ácido clorídrico 0,5%, glicerina e água destilada (PHILLIPS; HAYMANN, 1970) (Figura 8).



**Figura 8** - Procedimento de coloração das raízes. A e B-Acondicionamento das raízes em cassetes. C- Aquecimento em solução de KOH 10% a 90°C em banho-maria. D- Coloração em solução de azul de tripano 0,05%, ácido clorídrico 0,5%, glicerina e água destilada.

A intensidade de colonização dos FMAs foi obtida pela observação de 10 segmentos de raízes dispostos em lâmina de microscopia, atribuindo-se notas de 0 a 100% de acordo com a colonização da área radicular pelas hifas fúngicas (BETHLENFALVAY et al., 1981) (Figura 9).



**Figura 9** - Análise da intensidade de colonização radicular. A- Preparação da lâmina de microscopia com 10 segmentos de raízes. B e C- Imagens do microscópio óptico: hifas fúngicas colonizando a raiz da planta.

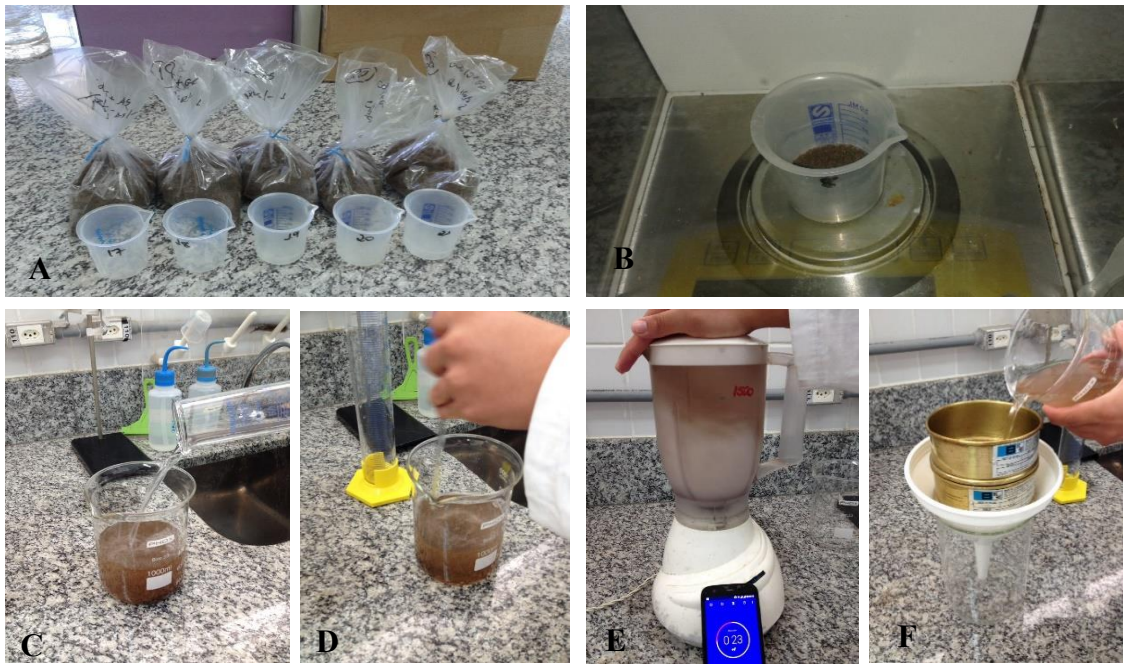
Após a coloração das raízes (PHILLIPS; HAYMANN, 1970), foi determinada a porcentagem de colonização radicular por meio da contagem dos segmentos de raízes colonizadas e não colonizadas dispostas em placa quadriculada em microscópio estereoscópico de acordo com Giovanetti e Mosse (1980) (Figura 10).



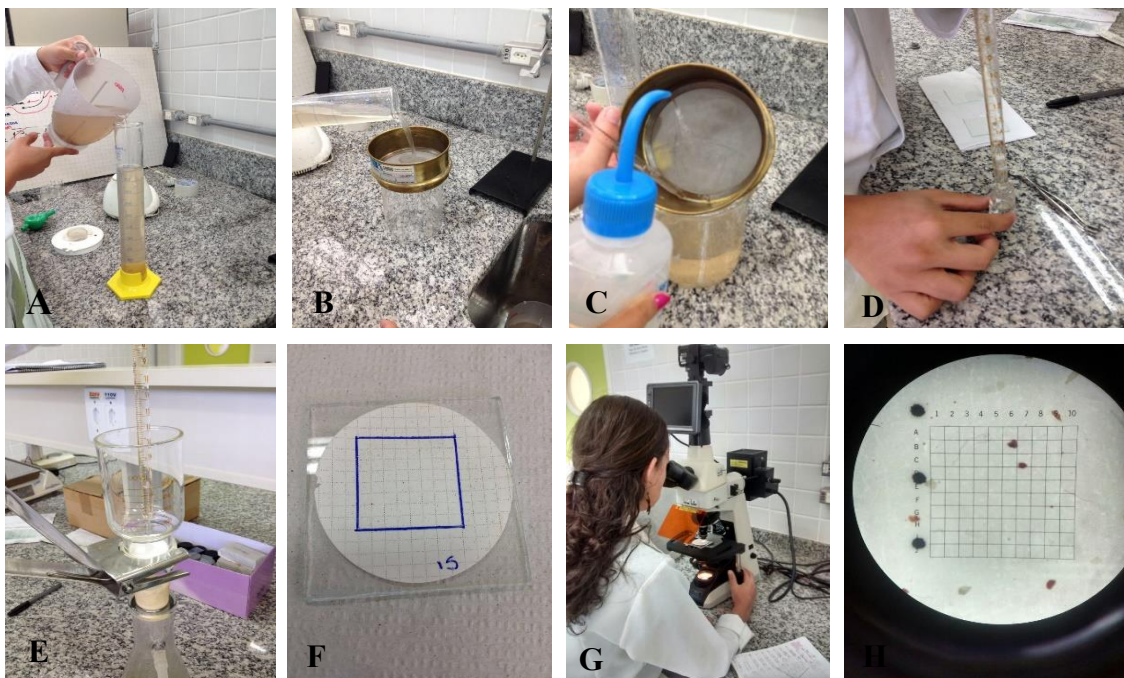
**Figura 10** -Análise da porcentagem de colonização radicular. A- Raízes dispostas em placa quadriculada. B- Visualização no microscópio estereoscópico.

#### **4.3.2 Determinação do comprimento de micélio extrarradiclar total (CMET)**

A determinação do comprimento extrarradiclar total de FMAs no substrato foi realizada de acordo com o método descrito por Melloni e Cardoso (1999). O processo consistiu na extração do micélio da amostra contendo 10 gramas de solo adicionada a 1500 mL de água de torneira, por peneiramento em malhas de 0,50 e 0,25 mm, seguido de agitação em liquidificador por 30 segundos em velocidade mínima (Figura 12). Após dois minutos de repouso da amostra no copo do liquidificador, foi retirada uma alíquota de 500 mL e passada em peneira de malha de 0,045 mm, coletados 11 mL da água de lavagem da peneira e adicionadas 5 mL dessa suspensão em membrana de triacetato de celulose quadriculada, seguida de filtração a vácuo e transferência para placa de vidro e visualização em microscópio óptico (Figura 11).



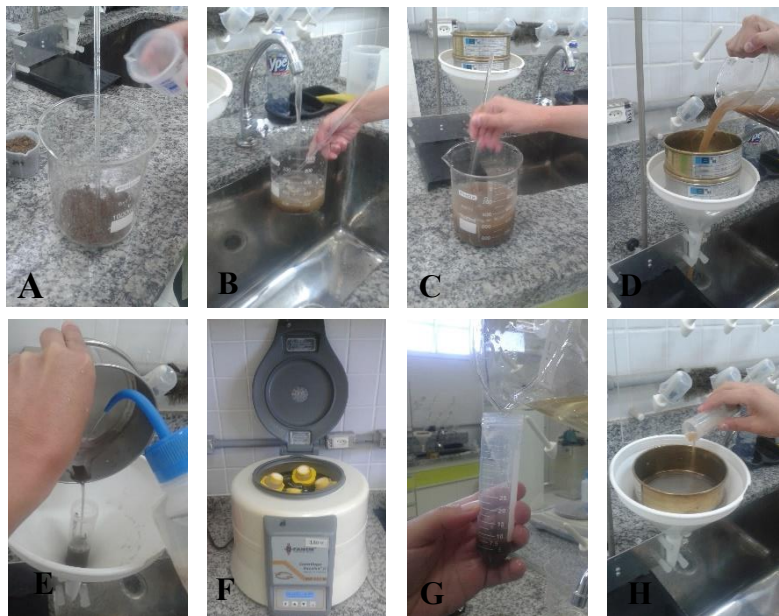
**Figura 11** -Etapas do processo de extração do micélio. A- Amostras de solo para pesagem. B- Pesagem de 10 g de amostra de solo. C- Adição de 1500 mL de água da torneira. D- Agitação da amostra. E - Agitação no liquidificador. F - Peneiramento em malhas de 0,50 mm e 0,25 mm.



**Figura 12**- Etapas do processo de extração do micélio e observação no microscópio óptico. A- Retirada de 500 mL da amostra. B- Peneiramento em malha de 0,045 mm. C- Lavagem da malha - D- Coleta de 11 mL da suspensão. E- Adição de 5 mL da suspensão na membrana de triacetato de celulose quadriculada. F- Membrana de triacetato de celulose quadriculada delimitada. G - Visualização no microscópio óptico. H- Imagem do microscópio óptico: segmentos de hifas fúngicas.

O número de esporos de FMAs nas amostras do substrato foi determinada seguindo-se a metodologia proposta por Gerdemann e Nicholson (1963).

Para a extração dos esporos, amostras de 50 mL de solo foram lavadas por três vezes em água corrente e a suspensão de terra e esporos foram peneiradas em malhas de 0,71 e 0,053mm. O conteúdo retido na última peneira foi coletado em tubo, adicionado água e centrifugado a 3000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado e em seguida, foi adicionada uma solução de sacarose a 50 % ao conteúdo retido no fundo do tubo e centrifugado a 200 rpm por 2 min. Posteriormente, o sobrenadante foi peneirado em malha de 0,045 mm, e o que ficou retido foi coletado para a contagem do número total de esporos em placa plástica circuncêntrica (9 circunferências com leve depressão em relação à superfície da placa) em microscópio estereoscópico com auxílio de contador manual (Figuras 13 e 14).



**Figura 13** - Etapas do processo de extração dos esporos. A- Adição da amostra de solo ao béquer. B- Lavagem da amostra em água corrente. C- Agitação da amostra – D- Peneiramento em malhas de 0,71 e 0,053. E- Coleta do conteúdo retido na última peneira. F- Tubos dispostos na centrífuga. G – Adição da sacarose 50 % ao conteúdo retido no tubo. H- Peneiramento do sobrenadante em malha 0,045 mm.



**Figura 14** - Contagem do número de esporos. A e B- Visualização no microscópio estereoscópico.

#### 4.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos de todos os atributos analisados (porcentagem de colonização, intensidade de colonização, CMET, número de esporos, MSPA e MFR) foram submetidos ao teste de normalidade por Shapiro-Wilk a 95% de significância e à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o *software* SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2011), para avaliação das fontes de variação – cádmio, FMA e posição. Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% e realizadas análises de regressão envolvendo o comportamento de FMAs em função das doses de Cd, pelo mesmo *software*. Para avaliar a interação entre todos os atributos, na região contaminada por Cd, realizou-se análise de correlação de Pearson, pelo Excel®, sendo os valores considerados significativos de acordo com em Triola (2010).

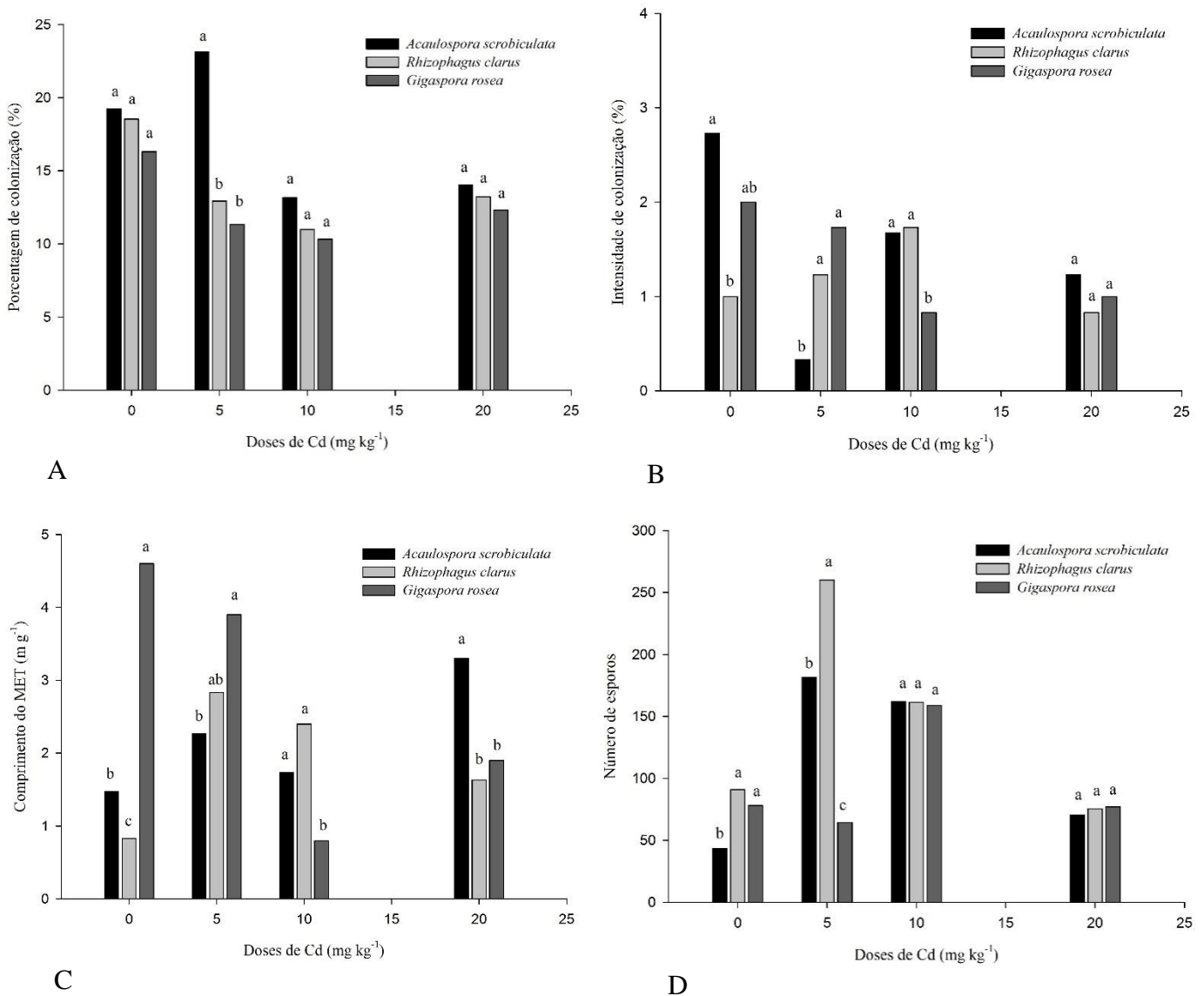
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão sendo apresentados em três subseções: item 5.1 para analisar o deslocamento de FMAs da região não contaminada para a região contaminada por Cd, item 5.2 para analisar o deslocamento de FMAs da região contaminada por Cd para a não contaminada e item 5.3 para analisar o crescimento do milho micorrizado e não micorrizado na região contaminada por Cd.

### 5.1 Deslocamento de micélio e formação de micorriza em solo contaminado por Cd

Na primeira condição, o FMA se deslocou da região não contaminada para a região contaminada por Cd, conforme esquema mostrado na figura 3.

Para comprovar o deslocamento e formação de micorriza em solos contaminados por Cd, foram utilizados diversos atributos. Os dados da porcentagem e intensidade de colonização radicular, comprimento do micélio extrarradicular total e número de esporos comparados entre as espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* que se deslocaram para as regiões contaminadas por cádmio (compartimentos B) encontram-se na figura 15.



**Figura 15-** Atributos microbiológicos relacionados ao deslocamento das espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea*, para a região contaminada por Cd (compartimento B) nos sistemas referentes à condição 1. A – Porcentagem de colonização. B - Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extrarradicular. D – Número de esporos. Médias com letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância

Para a porcentagem de colonização (Figura 15A) observou-se o mesmo comportamento entre as espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea*, nas doses 0, 10, 20 mg kg<sup>-1</sup>, observando-se, porém, que na dose 5 mg kg<sup>-1</sup>, a *Acaulospora scrobiculata* apresentou maior porcentagem de colonização em relação às outras espécies. Quanto à intensidade de colonização (Figura 15B), observa-se que, na dose 20 mg kg<sup>-1</sup>, todas as espécies apresentaram redução do índice. No entanto, na dose 0 mg kg<sup>-1</sup>, a *Acaulospora*



*scrobiculata* apresentou melhor capacidade de colonização que a espécie *Rhizophagus clarus*. Na dose 5 mg kg<sup>-1</sup>, somente a *Acaulospora scrobiculata* divergiu das outras espécies, apresentando menor intensidade de colonização, e na dose 10 mg kg<sup>-1</sup> as espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Rhizophagus clarus* apresentaram o mesmo comportamento, com maior índice de colonização.

Apesar da reduzida taxa de colonização do hospedeiro (em torno de 25 % de raízes colonizadas com até 3 % de intensidade), por meio desses resultados (Figuras 15A e 15B) pode-se verificar que todas as espécies apresentaram capacidade de formação de micorriza, mesmo em solos contaminados por até 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cd. Salienta-se que o tempo de condução do experimento foi de 50 dias, o que poderia explicar a baixa colonização, conforme também observado previamente por Del Duca et al. (2015), ao estudarem o efeito das diferentes doses de Cd na formação de micorriza em milhos transgênico e não transgênico.

No comprimento de micélio extrarradicilar (Figura 15C), *Gigaspora rosea* promoveu maior formação em relação às outras espécies na dose 0 mg kg<sup>-1</sup>. Na dose 5 mg kg<sup>-1</sup> as espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea* obtiveram comportamento diferente, apresentando menor e maior comprimento, respectivamente. Na dose 10 mg kg<sup>-1</sup>, *Rhizophagus clarus* promoveu maior comprimento de micélio e na dose mais elevada (20 mg kg<sup>-1</sup>), a espécie *Acaulospora scrobiculata* produziu o maior comprimento de micélio em relação às outras espécies.

Dessa forma, o crescimento de micélio extrarradicilar em solos contaminados por Cd é muito importante, visto ser essa estrutura a responsável pela ocupação do solo e formação de estruturas reprodutivas, como esporos e colonização de hospedeiros. Segundo Moreira e Siqueira (2006), Cardoso et al. (2010) e Valadares, Mescolotti e Cardoso (2016), o micélio extrarradicilar, garante o aumento da absorção de nutrientes pelas raízes das plantas, conferindo alterações fisiológicas nas raízes e modificações físicas, químicas e microbiológicas na rizosfera.

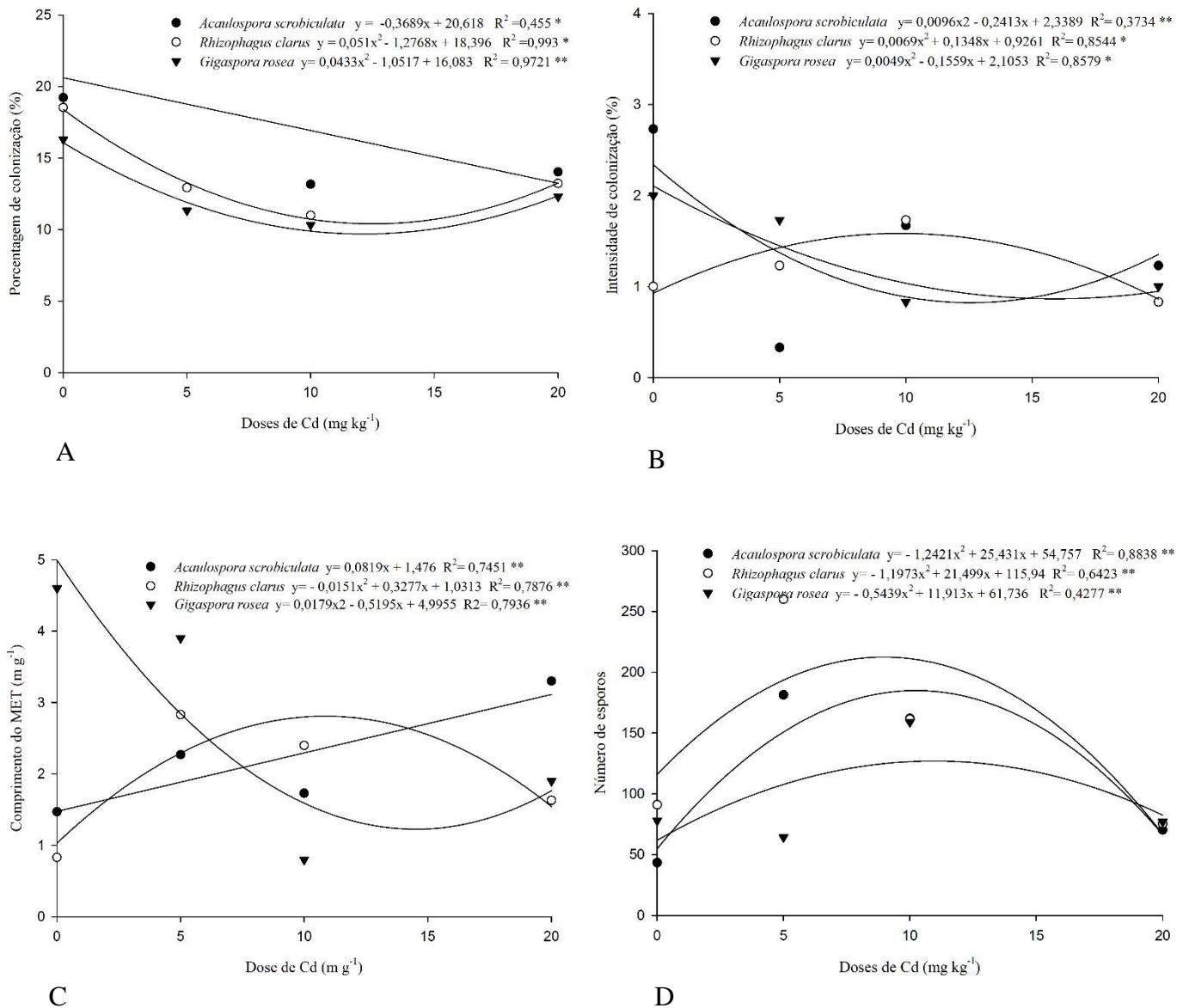
Quanto ao número de esporos formados na região contaminada por Cd (Figura 15D), todas as espécies apresentaram o mesmo comportamento nas doses 10 mg kg<sup>-1</sup> e 20 mg kg<sup>-1</sup>, com menor densidade nessa última dose. Na dose 0 mg kg<sup>-1</sup>, a *Acaulospora scrobiculata* promoveu menor produção de esporos em relação às outras espécies e na dose 5 mg kg<sup>-1</sup>, *Rhizophagus clarus* se destacou com a maior produção.

Observa-se, também, que na dose 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, todas as espécies apresentaram baixos valores de esporulação, demonstrando o efeito negativo do Cd na produção de esporos em doses mais elevadas. Apesar dos efeitos do excesso de metais sobre os FMAs ainda não

estarem elucidados, Klauberg-Filho et al. (2005), Amir et al. (2013) e Yang et al. (2015), sugerem que altas concentrações de metais no solo podem reduzir o crescimento micelial, o grau de colonização e a esporulação dos FMAs, pois sua toxicidade pode causar a inibição da germinação e do desenvolvimento inicial das hifas fúngicas, atrasando ou suprimindo a formação da micorriza e comprometendo a germinação dos esporos.

No entanto, esse resultado comprova a capacidade das espécies de FMAs utilizadas (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea*) em se deslocar mesmo em solos contaminados, sem comprometimento de sua capacidade de formação de micorriza em hospedeiros cultivados nesses ambientes. Essa habilidade pode ser considerada fundamental ao sucesso de programas de recuperação de áreas contaminadas por Cd, utilizando micorremediação como estratégia. Esse resultado corrobora outros propostos por Nogueira (2007), Nogueira e Soares (2010), Soares e Carneiro (2010) e Garcia et al. (2016), os quais indicaram a utilização de FMAs em solos degradados e contaminados por metais.

Os dados do comportamento das espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* deslocadas para a região contaminada por Cd (compartimento B) na condição 1, em relação às doses de Cd (0, 5, 10, 20 mg kg<sup>-1</sup>), encontram-se na figura 16.



**Figura 16** - Comportamento das espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagusclarus* e *Gigaspora rosea* deslocadas para a região contaminada por Cd (compartimento B) na condição 1, em relação às doses de Cd. A – Porcentagem de colonização. B - Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extraradicular. D – Número de esporos. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

As espécies de FMAs deslocadas para a região contaminada por Cd apresentaram comportamento diferenciado em relação ao aumento das doses de Cd, como podem ser observados nos atributos descritos a seguir.

Para porcentagem de colonização radicular (Figura 16A) apenas a espécie *Acaulospora scrobiculata* apresentou comportamento significativo em regressão linear, mostrando que, com o aumento das doses de Cd, houve uma diminuição mais intensa da

porcentagem de colonização, demonstrando maior sensibilidade dessa espécie em elevadas doses do contaminante. Para as demais espécies a porcentagem de colonização foi reduzida até a dose  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , com incremento a partir dessa dose.

Todas as espécies apresentaram comportamento quadrático para a intensidade de colonização (Figura 16B), porém, contrariamente às outras espécies, onde se observou redução ao longo das doses de Cd, a *Rhizophagus clarus* apresentou aumento da colonização até a dose  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  com redução na dose  $20 \text{ mg kg}^{-1}$ .

A *Acaulospora scrobiculata* apresentou comportamento positivo e significativo para regressão linear quanto ao comprimento de micélio extrarradicular (Figura 16C), evidenciando-se o aumento dos valores com a elevação das doses de Cd. O comprimento do micélio extrarradicular total da espécie *Rhizophagus clarus* demonstrou um aumento proporcional à elevação das doses de Cd, até  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , com queda a partir dessa dose. A *Gigaspora rosea* apresentou maior sensibilidade ao aumento das doses de Cd, com queda acentuada até a dose  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Quanto ao número de esporos (Figura 16D), todas as espécies exibiram comportamento quadrático, com aumento do valor até a dose  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , e redução em seguida. É evidente a redução da esporulação na última dose ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), independentemente da espécie fúngica. Tal resultado mostra a sensibilidade dessas espécies na produção de esporos e compromete a estratégia de sobrevivência quando em ambientes contaminados por Cd.

Klauber-Filho, Siqueira e Moreira (2002) concluíram, em estudo com solos contaminados, que os FMAs e sua simbiose ocorrem de forma generalizada até mesmo em solo com elevada concentração de Zn, Cd, Cu e Pd, porém os metais pesados podem exercer efeitos diferentes sobre os FMAs de acordo com o grau de poluição, reduzindo a diversidade e aumentando a dominância de espécies mais adaptadas. Sendo assim, Nogueira e Soares (2010) e Garcia et al. (2016) preconizaram que, para garantir o sucesso da reabilitação de solos contaminados por metais, utilizando FMAs, deve-se providenciar isolados fúngicos adaptados às condições excessivas do contaminante, à planta hospedeira e às condições edafoclimáticas. Para isso, os mesmos citam a importância de estudos para a compreensão dos mecanismos de retenção e compartimentalização desses elementos contaminantes em raízes micorrizadas e hifas fúngicas.

No geral, nota-se que a maior porcentagem e intensidade de colonização (Figuras 16 A, B) foi da *Acaulospora scrobiculata* na dose  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Para o comprimento do micélio extrarradicular total (Figura 16C), verifica-se maior produção por *Acaulospora scrobiculata* na dose  $20 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que demonstra sua tolerância em doses mais

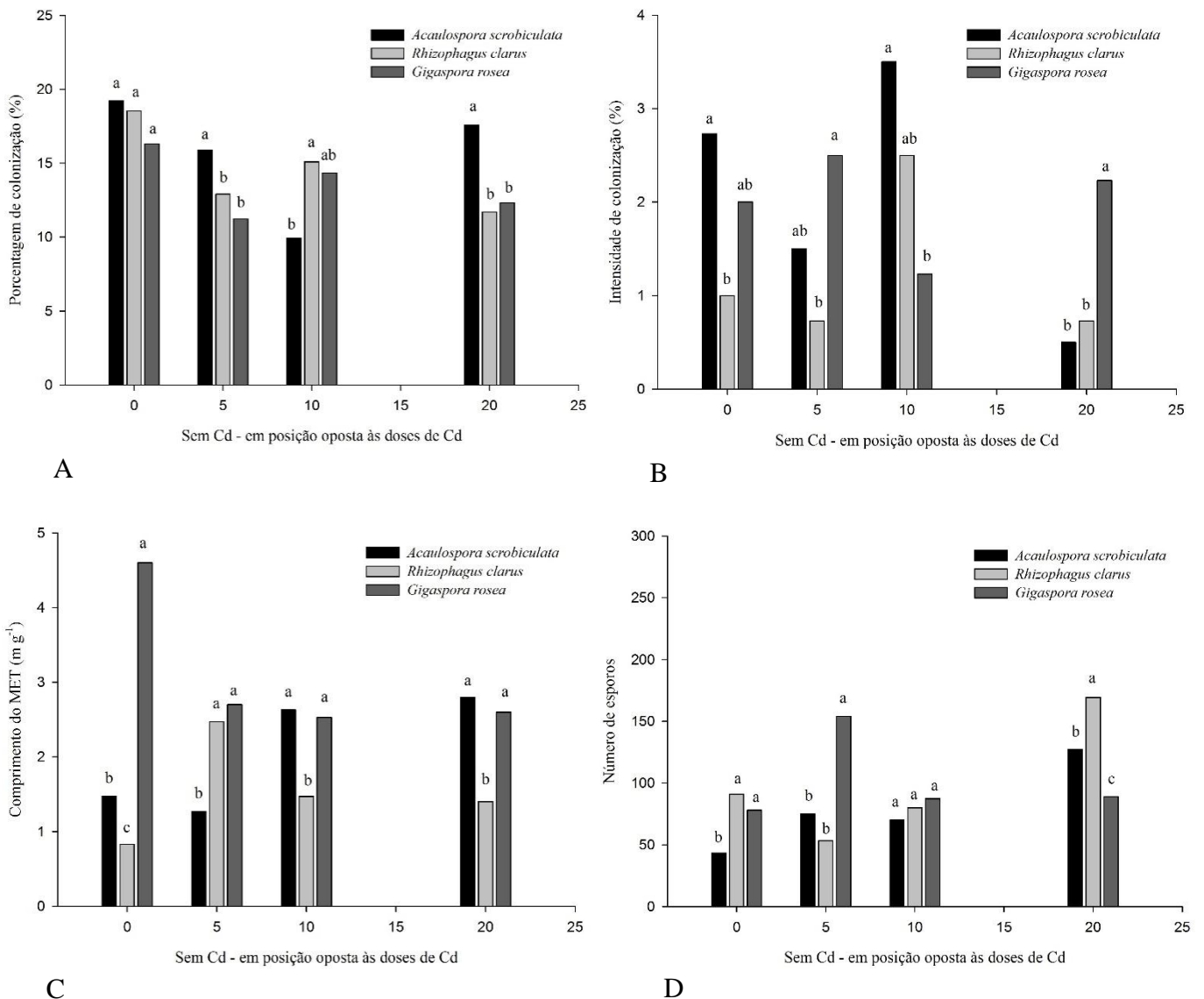
elevadas. Já o número de esporos (Figura 16D) foi maior para *Rhizophagus clarus* na dose 5 mg kg<sup>-1</sup>. Dessa forma, percebe-se que nenhuma espécie fúngica se destacou e apresentou tolerância nas doses 10 mg kg<sup>-1</sup> e 20 mg kg<sup>-1</sup>, demonstrando uma perda da capacidade de formação de propágulos e colonização micorrízica do milho nessas doses. No entanto, apesar do comprometimento na formação de estruturas importantes como essas, em ambientes contaminados por Cd, mesmo em doses acima de 10 mg kg<sup>-1</sup>, as espécies fúngicas estudadas mantiveram a capacidade de produzi-las e de colonizarem os hospedeiros.

Lins et al. (2006), Silva et al. (2006), Colodete, Dobbs e Ramos (2014) enfatizaram que os FMAs inoculados em solos contaminados por metais podem atuar no reestabelecimento de plantas fitoestabilizadoras e, ainda, de acordo com Nogueira e Soares (2010), o grande potencial do FMA em programas de fitorremediação se dá pelo auxílio ao estabelecimento da planta hospedeira em ambiente degradado, por meio do seu papel nutricional e por sua atuação como agente tamponante, a qual reduziria a absorção do metal pela planta.

## **5.2 Deslocamento de micélio e formação de micorriza em solo não contaminado**

Na segunda condição, o FMA se deslocou da região contaminada por Cd para a região não contaminada, conforme esquema mostrado na figura 4.

Diversos atributos foram utilizados para comprovar esse deslocamento e a formação de micorriza no hospedeiro. Os resultados da porcentagem e intensidade de colonização radicular, comprimento do micélio extrarradicular total e número de esporos comparados entre as espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus claruse* *Gigaspora rosea* deslocadas para as regiões não contaminadas (compartimentos A), na condição 2, encontram-se na figura 17.



**Figura 17** - Atributos microbiológicos relacionados ao deslocamento das espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea*, para a região não contaminada (compartimento A) na condição 2. A – Percentagem de colonização. B – Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extrarradicar. D – Número de esporos. Médias com letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância.

Os dados de percentagem de colonização radicular (Figura 17A) apresentaram-se semelhantes na dose 0 mg kg<sup>-1</sup> para todas as espécies. Observou-se maior colonização do milho pela espécie *Acaulospora scrobiculata* em relação à *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* na dose 5 mg kg<sup>-1</sup>. Na dose 10 mg kg<sup>-1</sup>, a colonização foi maior pela espécie *Rhizophagus clarus*, e na dose 20 mg kg<sup>-1</sup>, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* proporcionaram menor colonização em relação à espécie *Acaulospora scrobiculata*.

Para a intensidade de colonização (Figura 17B), *Acaulospora scrobiculata* proporcionou maior colonização em relação a *Rhizophagus clarus* na dose 0 mg kg<sup>-1</sup> e menor colonização de *Rhizophagus clarus* comparada à espécie *Gigaspora rosea*, na dose 5 mg kg<sup>-1</sup>. Nas doses 10 mg kg<sup>-1</sup> e 20 mg kg<sup>-1</sup>, houve diferença de comportamento entre as espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea*, apresentando maior valor para *Acaulospora scrobiculata* na primeira dose e menor valor na segunda.

Dessa forma, novamente, apesar das taxas de colonização serem baixas, em torno de 20 % de raízes colonizadas com até 3 % de intensidade, pode-se verificar que os FMAs se deslocaram da região contaminada por Cd e se dirigiram para a região não contaminada (posição 2), onde promoveram a formação de micorriza no milho. Esse resultado comprova, novamente, a habilidade dessas espécies em se propagar por solos contaminados por Cd e colonizar hospedeiros que se encontram em solos não contaminados limítrofes. Essa capacidade fúngica de formar micorriza se deve à extensão de hifas desenvolvidas, conforme comprovado pelos dados a seguir.

Para o atributo comprimento de micélio extrarradicular total (Figura 17C), a espécie *Gigaspora rosea* apresentou maior valor na dose 0 mg kg<sup>-1</sup>. Na dose 5 mg kg<sup>-1</sup> a *Acaulospora scrobiculata* promoveu menor formação e nas doses 10 mg kg<sup>-1</sup> e 20 mg kg<sup>-1</sup> a *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea* demonstraram valores maiores em relação àquele promovido por *Rhizophagus clarus*. Os valores estiveram na ordem de 3 m g<sup>-1</sup> de solo, próximos aos encontrados em estudo de Del Ducca (2014), com a espécie *Scutellospora heterogama* associada a milho transgênico cultivado em solo contaminado por cádmio, nas doses de 0, 28, 50, 71,25, 142,50 e 285,00 mg Cd kg<sup>-1</sup>.

Para o número de esporos (Figura 17D), na dose 10 mg kg<sup>-1</sup>, todas as espécies apresentaram o mesmo comportamento. Na dose 0 mg kg<sup>-1</sup>, *Acaulospora scrobiculata* apresentou valores menores que os das demais espécies. Na dose 5 mg kg<sup>-1</sup> *Gigaspora rosea* apresentou a maior formação de esporos, e na dose 20 mg kg<sup>-1</sup> a espécie *Rhizophagus clarus* apresentou maior número de esporos em relação às demais. Klauberg-Filho, Siqueira e Moreira (2002) já haviam demonstrado, em estudo sobre a ocorrência e a diversidade de FMAs em solos contaminados por Zn, Cd, Cu e Pb, que as espécies *Acaulospora mellea* e *Rhizophagus clarus* dominaram a população de esporos encontrada, indicando o maior potencial de tolerância dessas espécies ao excesso de metais pesados. O maior potencial de adaptação do *Rhizophagus clarus* em área contaminada também pode ser comprovado, segundo Cabral et al. (2010), diante da maior capacidade de retenção de Cu, Cd e Pb em seu micélio fúngico.

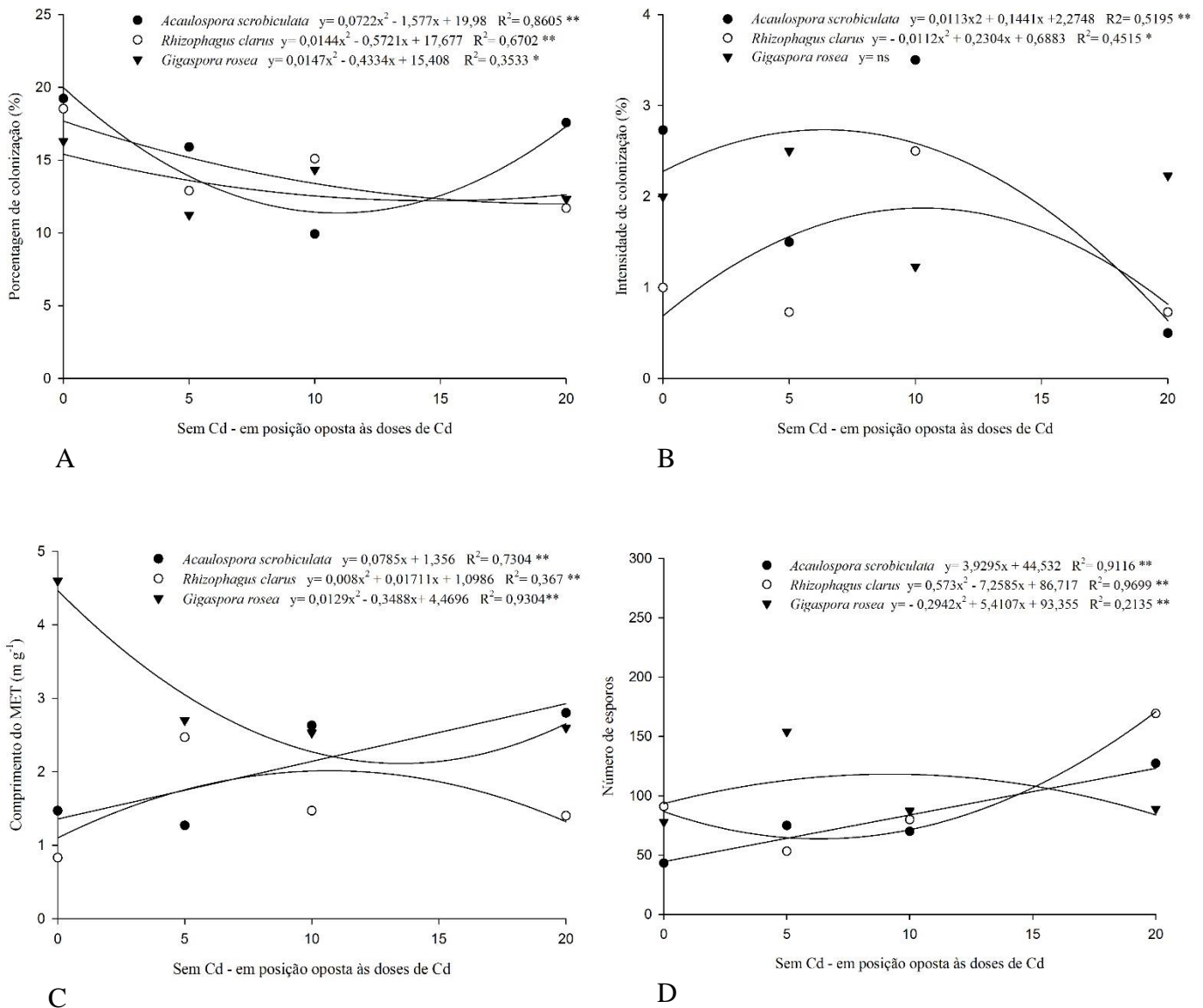
Os dados do comportamento das espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* deslocadas para a região não contaminada (compartimento A) nos sistemas referentes à condição 2, em relação às doses de Cd (0, 5, 10, 20 mg kg<sup>-1</sup>) encontram-se na figura 18.

Novamente, assim como observado na situação anterior, as espécies fúngicas deslocadas para a região não contaminada demonstraram comportamentos diferentes em relação ao aumento das doses de Cd, conforme podem ser observados por meio dos atributos microbiológicos estudados. Os valores da porcentagem de colonização radicular do milho (Figura 18A) proporcionado pela *Acaulospora scrobiculata* apresentaram decréscimo até a dose 10 mg kg<sup>-1</sup> e, a partir daí, aumentaram de acordo com o aumento das doses, contrariando o resultado observado na figura 16A, onde houve diminuição da porcentagem de colonização de acordo com o aumento das doses, demonstrando sensibilidade dessa espécie em doses elevadas de Cd. As espécies *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* desenvolveram comportamento semelhante entre si, com redução dos valores ao longo das doses de Cd.

As espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Rhizophagus clarus* promoveram aumento da intensidade de colonização (Figura 18B) até a dose 10 mg kg<sup>-1</sup>, com redução em seguida, sendo mais evidente para a primeira espécie. O comportamento da *G. rosea* ao longo das doses de Cd não pode ser descrito por meio de equação significativa.

O comprimento de micélio extrarradicular (Figura 18C) desenvolvido pela espécie *Acaulospora scrobiculata* pode ser descrito por regressão linear, com aumento dos valores ao longo das doses de Cd, demonstrando maior tolerância dessa espécie em doses mais elevadas. Comportamento diferente foi observado para as demais espécies, que demonstraram efeito quadrático significativo, com maior sensibilidade da *Gigaspora rosea* em relação à *Rhizophagus clarus*.





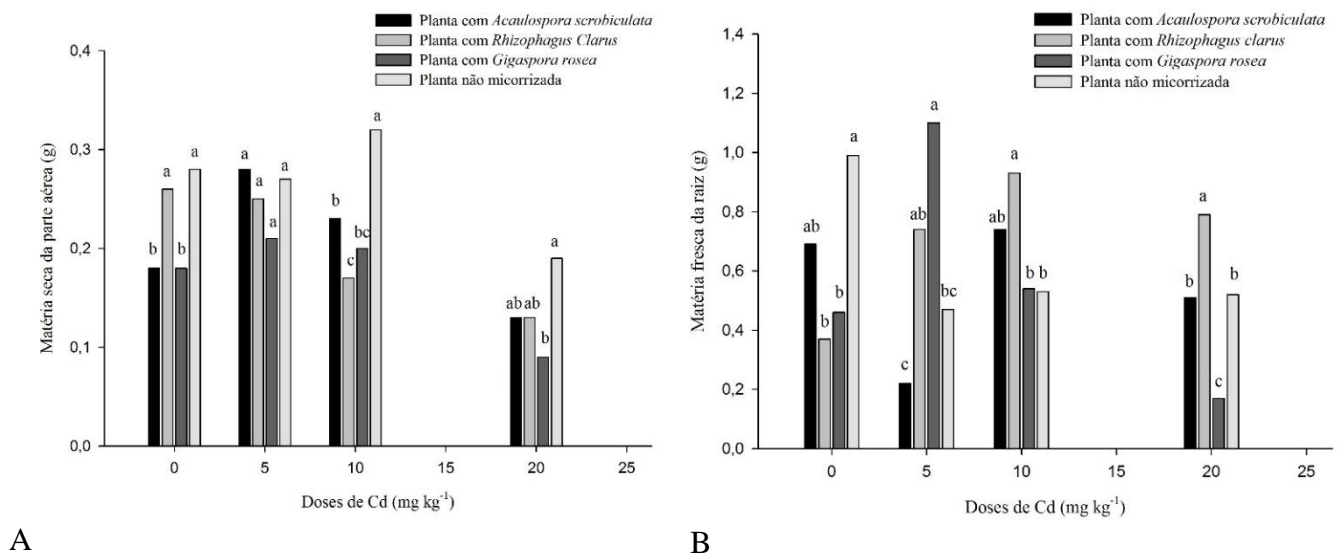
**Figura 18** - Comportamento das espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* deslocadas para a região não contaminada (compartimentos A) nos sistemas referentes à condição 2, em relação às doses de Cd. A – Porcentagem de colonização. B – Intensidade de colonização. C – Comprimento do micélio extraradicular. D – Número de esporos. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = não significativo.

A *Acaulospora scrobiculata* apresentou comportamento de regressão linear positiva e significativa para o número de esporos (Figura 18D), demonstrando elevação dos valores ao longo das doses de Cd. A espécie *Rhizophagus clarus* apresentou maior produção de esporos ao longo das doses, comportamento contrário ao observado para *Gigaspora rosea*, a qual apresentou redução do número de esporos na última dose.

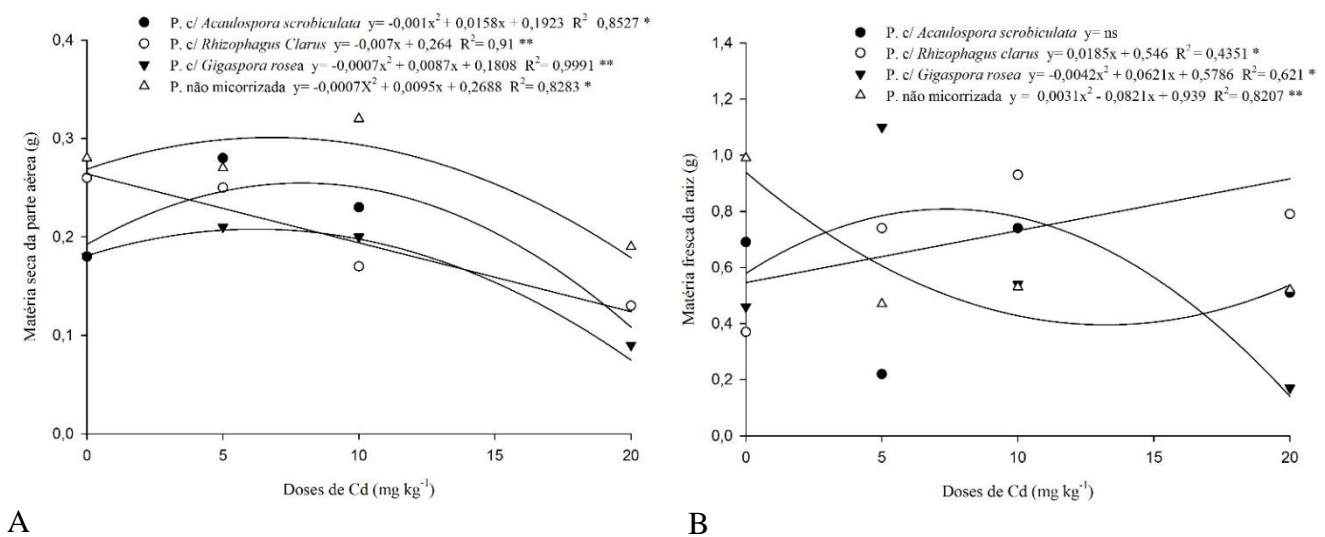
Em experimentos conduzidos em áreas de mineração de zinco em Três Marias-MG, Klauberg-Filho, Siqueira e Moreira (2002) demonstraram que a densidade e a riqueza das espécies diminuíram de acordo com o aumento das concentrações de metais no solo, suprimindo as mais sensíveis e favorecendo as mais tolerantes àquela condição. Para esse trabalho específico, houve dominância das espécies *R. clarus* e *A. mellea* perante às outras dezenove espécies dos gêneros *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Gigaspora* e *Entrophospora*.

### 5.3 Crescimento do milho micorrizado e não micorrizado em solo contaminado por cádmio

Os dados da matéria seca da parte aérea e da matéria fresca da raiz das plantas micorrizadas e não micorrizadas nas regiões contaminadas por Cd encontram-se nas figuras 19 e 20.



**Figura 19** - Crescimento do milho micorrizado com as espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* e não micorrizado na região contaminada por Cd. A – Matéria seca da parte aérea. B – Matéria Fresca da raiz. Médias com letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente entre si, por Tukey a 5% de significância.



**Figura 20** - Comportamento das plantas micorrizadas com as espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea*, e não micorrizadas, em relação às doses de Cd. A – Matéria seca da parte aérea. B – Matéria Fresca da raiz. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = não significativo.

Para a produção de matéria seca da parte aérea (Figura 19A), observou-se que, na dose controle ( $0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) as plantas micorrizadas com as espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea* apresentaram menor crescimento em relação à planta associada a *Rhizophagus clarus* e a planta não colonizada (controle), notando-se, na região não contaminada por Cd, que não houve efeito positivo da associação micorrízica para a produção de matéria seca. Na dose  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , não houve efeito de FMAs. No entanto, nas doses  $10$  e  $20 \text{ mg kg}^{-1}$ , a produção de matéria seca foi maior na planta não micorrizada do que nas plantas associadas aos FMAs, percebendo-se, porém, que nas doses mais elevadas de Cd, tanto as plantas sem associação micorrízica quanto as plantas colonizadas, apresentaram sintomas de toxidez. Esse resultado mostra que não houve efeito benéfico/protetor da associação micorrízica diante das doses mais altas do contaminante, possivelmente em virtude do tempo de condução do experimento (50 dias) e baixas taxas de colonização micorrízica (Figuras 15A e 15B). De acordo com Benavides et al. (2005) e Vollenweider et al. (2005), a redução do crescimento e desenvolvimento vegetal causada pelo Cd é devido à inibição de processos fisiológicos essenciais, como a fotossíntese e a respiração. Nogueira e Soares (2010) citam que, além do efeito direto sobre a planta hospedeira, o contaminante também pode afetar negativamente a simbiose micorrízica. O comportamento da produção de matéria seca da parte aérea das plantas micorrizadas com as espécies *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus* e *Gigaspora rosea* e a planta não micorrizada, em relação às doses de Cd, está apresentado na Figura 20A. Nota-se que houve

diminuição acentuada da matéria seca da parte aérea das plantas colonizadas com todas as espécies e, também, da planta não colonizada, na dose mais elevada ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ). A planta colonizada com *Rhizophagus clarus* apresentou produção de matéria seca expressa por regressão linear significativa com redução do valor ao longo das doses. Nas plantas colonizadas com as outras espécies e, também, a planta não micorrizada, observou-se aumento da matéria seca da parte aérea nas primeiras doses e redução nas doses mais elevadas.

Quanto à matéria fresca da raiz (Figura 19B), observou-se que houve diferença entre as plantas associadas aos FMAs e as plantas não colonizadas (controle), observando-se, também, que em todas as regiões contaminadas houve menor produção de matéria fresca da raiz no milho não micorrizado, comparado ao milho colonizado com alguma das espécies utilizadas.

Nota-se que na dose  $0 \text{ mg kg}^{-1}$ , ou seja, onde não há interferência do contaminante, as plantas micorrizadas com todas as espécies apresentaram menor produção de matéria fresca da raiz em relação à planta não colonizada. Porém, na dose mais elevada ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), observou-se maior produção de matéria fresca na planta colonizada com *Rhizophagus clarus*, comparada às outras espécies e, inclusive, com a planta não colonizada (controle), demonstrando que a espécie *Rhizophagus clarus*, pode ter contribuído para a maior produção de raízes na planta hospedeira.

Observa-se, na produção de matéria fresca da raiz (Figura 20B) que houve diferença de comportamento nesse atributo ao longo das doses para as plantas micorrizadas com todas as espécies e para a planta não colonizada. Contrariamente ao que ocorreu para a produção de matéria seca da parte aérea, a planta colonizada com *Rhizophagus clarus* apresentou comportamento expresso por regressão linear significativa, com aumento da matéria fresca da raiz ao longo das doses. A planta colonizada com a espécie *Gigaspora rosea* proporcionou aumento da matéria fresca da raiz nas primeiras doses e diminuição nas doses mais elevadas. O comportamento para a planta não colonizada também foi demonstrado por regressão quadrática, porém com redução na dose  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  e aumento nas últimas doses. Já o comportamento da *Acaulospora scrobiculata* ao longo das doses de Cd não pode ser descrito por meio de equação significativa.

Os resultados da análise de correlação de Pearson entre os dados, na região contaminada por Cd, encontram-se nas tabelas 2, 3 e 4, para os FMAs *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizophagus clarus*, *Gigaspora rosea*, respectivamente.

**Tabela 2** - Matriz de correlação de Pearson para a planta colonizada com *Acaulospora scrobiculata* na região contaminada por Cd

Planta com <i>Acaulospora scrobiculata</i>						
	<b>MFPA</b>	<b>MFR</b>	<b>PCR</b>	<b>ICR</b>	<b>CMET</b>	<b>NE</b>
<b>MSPA</b>	-	-0,33	0,42	-0,36	-0,48	0,74
<b>MFR</b>	-	-	-0,62	0,79	-0,41	-0,40
<b>PCR</b>	-	-	-	-0,22	-0,22	0,18
<b>ICR</b>	-	-	-	-	-0,56	-0,69
<b>CMET</b>	-	-	-	-	-	-0,10
<b>NE</b>	-	-	-	-	-	-

MSPA – Matéria seca da parte aérea; MFR – matéria fresca da raiz; PCR – porcentagem de colonização radicular; ICR – intensidade de colonização radicular; CMET – Comprimento do micélio extrarradicular total; NE – Número de esporos.

Nota: Valores menores que - 0,576 e maiores que 0,576 mostram correlações negativas e positivas significativas a 5% (TRIOLA, 2010).

**Tabela 3** -Matriz de correlação de Pearson para a planta colonizada com *Rhizophagus clarus* na região contaminada por Cd.

Planta com <i>Rhizophagus clarus</i>						
	<b>MFPA</b>	<b>MFR</b>	<b>PCR</b>	<b>ICR</b>	<b>CMET</b>	<b>NE</b>
<b>MSPA</b>	-	-0,52	0,49	0,07	-0,06	0,40
<b>MFR</b>	-	-	-0,89	0,46	0,70	0,32
<b>PCR</b>	-	-	-	-0,47	-0,77	-0,44
<b>ICR</b>	-	-	-	-	0,46	0,37
<b>CMET</b>	-	-	-	-	-	0,85
<b>NE</b>	-	-	-	-	-	-

MSPA – Matéria seca da parte aérea; MFR – matéria fresca da raiz; PCR – porcentagem de colonização radicular; ICR – intensidade de colonização radicular; CMET – Comprimento do micélio extrarradicular total; NE – Número de esporos.

Nota: Valores menores que - 0,576 e maiores que 0,576 mostram correlações negativas e positivas significativas a 5% (TRIOLA, 2010).

**Tabela 4** -Matriz de correlação de Pearson para a planta colonizada com *Gigaspora rosea* na região contaminada por Cd.

Planta com <i>Gigaspora rosea</i>						
	MFPA	MFR	PCR	ICR	CMET	NE
MSPA	-	0,77	-0,14	0,27	0,22	0,26
MFR	-	-	-0,24	0,32	0,31	0,09
PCR	-	-	-	0,65	0,71	-0,46
ICR	-	-	-	-	0,83	-0,58
CMET	-	-	-	-	-	-0,72
NE	-	-	-	-	-	-

MSPA – Matéria seca da parte aérea; MFR – matéria fresca da raiz; PCR – porcentagem de colonização radicular; ICR – intensidade de colonização radicular; CMET – Comprimento do micélio extrarradicular total; NE – Número de esporos.

Nota: Valores menores que - 0,576 e maiores que 0,576 mostram correlações negativas e positivas significativas a 5% (TRIOLA, 2010).

Não houve correlação significativa entre produção de matéria seca da parte aérea do milho e a colonização micorrízica para nenhuma espécie fúngica estudada. Esse resultado mostra que o efeito no crescimento não esteve relacionado com a formação de micorriza e seus benefícios, provavelmente em função do tempo de condução do experimento (50 dias). No entanto, houve correlação significativa negativa entre porcentagem de colonização (PCR) e a formação de raízes, ou seja, todas as espécies de FMAs estudadas promoveram redução das raízes. Carneiro et al. (2001), Cunha et al. (2008), Silva et al. (2006), Soares et al. (2007) e Garg e Aggarwal (2011) observaram redução na produção de raízes de espécies hospedeiras de FMAs ao longo do aumento das doses de Cd, comparados às plantas não colonizadas, porém, Del Ducca (2015) relata, em seu trabalho com milhos transgênico e não transgênico em solos contaminados com Cd, o baixo efeito do Cd na produção de raízes de milho não transgênico colonizado com as espécies *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora scrobiculata*, *Scutellospora heterogama* e milho não colonizado. Segundo Christie, Li e Chen (2004), apesar dos diversos estudos que comprovam a proteção dos FMAs às plantas hospedeiras, os resultados encontrados, ainda se apresentam divergentes e os mecanismos induzidos pelos fungos não estão totalmente elucidados. De acordo com Nogueira e Soares (2010), há ainda, muitos levantamentos a serem realizados, sobretudo no que diz respeito aos mecanismos de expressão e supressão de genes de fungos micorrízicos e hospedeiros em condições de excesso de metais.

De acordo com os valores dos coeficientes de correlação de Pearson para todas as variáveis estudadas, na região contaminada com Cd, nota-se que somente a planta colonizada com a espécie *Gigaspora rosea* (Tabela 4) apresentou correlação positiva significativa entre produção de raízes e crescimento da parte aérea, a qual também apresentou correlação positiva entre porcentagem de colonização e intensidade de colonização, entre porcentagem de colonização e comprimento do micélio extrarradicular total, entre intensidade de colonização e comprimento do micélio extrarradicular total.

Quanto às demais variáveis, as significâncias das correlações foram diversas para todas as espécies de FMAs, ora com correlações negativas apresentadas entre CMET e NE para *A. scrobiculata* e *G. rosea* (Tabelas 2 e 4, respectivamente), e ora positivas para *R. clarus* (Tabela 3). Entre PCR e CMET, verifica-se também resultado variado entre as espécies, com correlação positiva para *G. rosea* (Tabela 4) e negativa para *R. clarus* (Tabela 3). Dessa forma, houve efeito diferenciado da formação de propágulos pelas espécies de FMAs, revelando a complexidade comportamental das mesmas ante as doses de Cd e o tempo de condução do presente experimento.

## 6 CONCLUSÕES

Os FMAs se deslocaram e formaram micorriza nas duas condições estudadas (FMAs que migraram da região não contaminada para a região contaminada por Cd e FMAs que migraram da região contaminada por Cd para a região não contaminada), demonstrando que houve conexão fúngica entre essas duas regiões.

O comportamento das espécies de FMAs estudadas em relação às doses de Cd foi variável, tanto para as espécies que foram inoculadas na região sem Cd e se deslocaram para a região contaminada, quanto as espécies que foram infestadas na região contaminada, porém migraram para a região não contaminada.

O comportamento das plantas colonizadas pelas espécies estudadas e da planta não micorrizada, ao longo das doses de Cd, foi variável. A planta hospedeira da espécie *Rhizophagus clarus* apresentou maior produção de matéria fresca da raiz em relação as outras duas espécies, *Acaulospora scrobiculatae* *Gigaspora rosea* e a planta não colonizada.

As plantas hospedeiras de todas as espécies e a planta não micorrizada apresentaram maior redução da matéria seca nas doses mais elevadas de Cd (10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>), o que demonstra que não houve efeito benéfico/protetor da associação micorrízica diante das doses mais altas do contaminante.

Nas regiões contaminadas por Cd, as plantas hospedeiras de todas as espécies apresentaram maior produção de matéria fresca da raiz, em relação à planta não colonizada, porém, em solos não contaminados, todas as plantas micorrizadas produziram menor quantidade de matéria fresca da raiz, comparadas à planta não colonizada.

Todas as espécies apresentaram comportamento diferente na produção de propágulos, em relação ao aumento das doses de Cd, nas duas posições estudadas, no entanto, os resultados comprovam a capacidade desses FMAs em se deslocar em solos contaminados, sem comprometimento da formação de micorriza em hospedeiros cultivados nesses ambientes.



## REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY [ATSDR]. **Toxicological profile for cadmium**. Atlanta: US Department of Health and Human Services, 2012.

ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. 2 ed. Londres: Chapman and Hall, 1995. 368 p.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**, 2a. ed., UFLA: Lavras, 2013. 455 p.

AMIR, H.; LAGRANGE, A.; HASSAÏNE, N.; CAVALOC, Y. Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. **Mycorrhiza**, v. 23, p. 585-595, n. 7, 2013.

ANDRADE, S. A. L.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; SILVEIRA, A. P. D.; SCHIAVINATO, M. A.; MAZZAFERA, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v.68, p.198-207, 2009.

BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Regulation and function of root exudates. **Plant, Cell e Environmen**, Fort Collins, v. 32 p. 666-681, 2009.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Reviews of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BAKER, A.J.M. Metal tolerance. **New Phytologist**, USA, v.106, p.93-111, 1987.  
BARTOLOME-ESTEBAN, H.; SCHENCK, N.C. Spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil aluminum saturation. **Mycologia**, v.86, p.217-226, 1994.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1 p. 21-34, 2005.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Nutrição Mineral de Plantas. In: FERNANDES, M. S. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição**. Viçosa: SBCS, 2006, p.53-85. 432 p.

BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BRONWN, M.S. Measurement of mycorrhizal infection in soybeans. **Soil Science Society of America Journal**, v.45, p.871-875, 1981

BROWN, M.S.; BETHLENFALVAY, G.J. Glycine-Glomus-Rhizobium symbiosis. VI. Photosynthesis in nodulated, mycorrhizal, or N- and P-fertilized soybean plants. **Plant Physiology**, Berlin v. 85 p. 120-123, 1987.

BURAK, D.L.; FONTES, M.P.F.; SANTOS, N.T.; MONTEIRO, L.V.S.; MARTINS, E.S.; BECQUER, T. Geochemistry and spatial distribution of heavy metals in Oxisols in a mineralized region of the Brazilian Central Plateau. **Geoderma**, v.160, p.131-142, 2010

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

CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I. M.; NOGUEIRA, M. A.; BARRETA, C. R. D. M.; PAULA, A, M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F. A; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 153-214.

CARDOSO, E. J. B. N.; NAVARRO, R. B; NOGUEIRA, M. A. Manganês e germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 795-799, 2002.

CARDOSO, P. F.; MOLINA, S. M. G.; PEREIRA, G. J. G.; VITÓRIA, A. P; AZEVEDO, R. A. Response of rice inbred lines to cadmium exposure. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, p. 927-944, 2002.

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

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, Nottingham, v.92, p.1-5, 1996.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.53, p.159-82, 2002.

COLODETE, C.M.; DOBBS, L.B.; RAMOS, A.G. Aplicação de micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas. **Natureza on line**, v.12, p.31-37, 2014.

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

CRUZ, A.F; MARTINS, M.A. Efeito de fungos micorrizicos arbusculares e doses de N sobre plantas cultivadas em sistema de consorcio. **Revista Ceres**. v.45, p .41-54, 1998.

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

DEL DUCCA, A. P.; MELLONI, E. G. P.; MELLONI, R.; MARTINS, F. B. Crescimento de Milhos Transgênico (Bt) e Não Transgênico Inoculados com Fungos Micorrízicos Arbusculares em Solo Contaminado por Cádmio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 1275-1281, 2015.

DEL DUCCA, A. P. **Crescimento de Milhos Transgênico (Bt) e Não Transgênico Inoculados com Fungos Micorrízicos Arbusculares em Solo Contaminado por Cádmio**. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Itajubá, Universidade Federal de Itajubá, 2014. 69 p.

DEL VAL, C.; BAREA, J.M. ; AZCÓN-AGUILAR, C. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, Granada, v.11, p.261-269, 1999.

DÍAZ, G.; AZCÓN-AGUILAR, C.; HONRUBIA, M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. **Plant and Soil**, v.180, p.241-249, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

FERREIRA; D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FORNAZIER, R. F.; FERREIRA, R. R.; VITÓRIA, A. P.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J. Effects of cadmium on antioxidant enzymes activities in sugar cane. **Biologia Plantarum**, v. 45, p. 91-97, 2002.

GARCIA, K. G. V.; GOMES, V. F. F.; ALMEIDA, A. M. M.; FILHO, P. F. M. Micorrizas arbusculares no crescimento de mudas de sabiá em um substrato proveniente da mineração de manganês. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 11, n. 2, p. 15-20, 2016.

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**, EUA, v. 30, n.3, p. 286-300, 2011.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, Inglaterra, v. 46, n. 2, p. 235-244, July 1963.

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500. 1980.

GRAHAM, J.H.; EISSENSTAT, D.M. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. **Plant and Soil**, EUA, v. 159, p. 179-185, 1994.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1-11, 2002.

HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T.; FIGGE, D.A.H. The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation on heavy metal mine spoil. **Environmental Pollution**, v. 86, p. 171-179, 1994.

JENTSCHKE, G.; WINTER, S.; GODBOLD, D.L. Ectomycorrhizas and cadmium toxicity. In: Norway spruce seedlings. **Tree Physiology**, v.19, p.23-30, 1999.

JONER, E.J.; BRIONES, R.; LEYVAL, C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. **Plant and Soil**, Dordrecht, v, 226, n.2, p.227-234, 2000.

JONER, E.J.; LEYVAL, C. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: A new aspect of rhizosphere interactions. *Sustainable Agriculture*, v. 7p. 885-894, 2009.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace Elements in Soils and Plants**. 3. ed. CRC Press: Londres, 2000. p. 123–167.

KALDORF, M.; KUHN, A.J.; SCHRÖDER, W.H.; HILDEBRANDT, U.; BOTHE, H. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. **Plant Physiology**, Berlin, v.154, p.718-728, 1999.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KLAUBER-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F. S. M.; 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: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.85-144, 2005.

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

KURDZIEL, B.M.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V. **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2. ed. Hyderabad: Springer, 2004. p. 146-181.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M, F, B.; SANTOS, A, F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.2, p.134-139, 2010.

LEITA, L.; DE NOBILI, M.; CESCO, S.; MONDINI, C. Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. **Journal of Plant Nutrition**, v.19, p-527-533, 1996.

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

LINS, C.E.L.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E.V.S. B.; MESSIAS, A.S.; MAIA, L, C. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, v.31, p.181-185, 2006.

LINDERMANN, R.G. Mycorrhizal interactions with the rizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. **Phytopatology**, v.78, p.366-371, 1988.

LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P.; YOUNG, S.D.; SACCHI, G.A. Physiological evidence for a high-affinity cádmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. **New Phytologist**, v.149, p.53-60, 2001.

LOSCH, R. Plant mitochondrial respiration under the influence of heavy metals. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems**. 2 ed. Springer: India, 2004. p.182-200.

LU, A.; WANG, J.; QIN, X.; WANG, K.; HAN, P.; ZHANG, S. Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and origin of heavy metals in the agricultural soils in Shunyi, Beijing, China. **Science of the Total Environment**, v. 425, p. 66-74, 2012.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental, micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos**. São Paulo: Petroquímica, 1994. 153p.

MALCOVÁ, R.; GRYNLER, M. Amelioration of Pb and Mn toxicity to arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* by maize root exudates. **Biology Plant**, v.47, p.297-299, 2003.

MARQUES, M.; AGUIAR, C. R.C.; SILVA, J. J. L. S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa. v. 35, p. 1-11, 2011.

MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas - I: método empregado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 53- 58, jan./mar. 1999.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant Physiology**. Berlim: Springer-Verlag, 1995. 629p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. S. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 730p.

MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, Ithaca, v.37, p.471-491, 1990.

MUGOUEI, R.; BORGHEI, M.; ARJMANDI, R. Phytoremediation of stable Cs from solutions by *Calendula alata*, *Amaranthus chlorostachys* and *Chenopodium album*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2036-2039, 2011

NISHIZONO, H.; KUBOTA, K.; SUZUKI, S.; ISHII, F. Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. **Plant, Cell Physiology**, Fort Collins v.30, p.595-598, 1989.

NOQUEIRA, M. A. Micorrizas Arbusculares e Metais Pesados. In: SILVEIRA, A. P.D.; FREITAS, S.S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p. 219-238. 729 p.

NOGUEIRA, M. A; SOARES, C. R. F. S. Micorrizas arbusculares e elementos-traço. In: Siqueira J. O; SOUZA F. A; CARDOSO, E. J. B. N; TSAI, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 475-501. 716p.

OLGUIN, E. J.; SANCHEZ-GALVAN, G.; PEREZ-PEREZ, T. Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* Baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. **Water Air and Soil Pollution**, v. 181, p. 135-147, 2007.

OLSSON, P.A.; FRANCIS, R.; READ, D.J. & SÖDERSTRÖM, B. Growth of arbuscular mycorrhizal mycelium in calcareous dune sand and its interaction with other soil microorganisms as estimated by measurement of specific fatty acids. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 201, p. 9-16, 1998

OSKARSSON, A.; LINDEN, A.; OLSSON, I. M.; PETERSSON, K. Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. **BioMetals**, v.17, p.531–534, 2004.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O.; MIRANDA, J. R. P.; FERNANDES, A. R. Absorção de Nutrientes por mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* em solução nutritiva contaminada por cádmio. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 189-197, 2004.

PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, v. 239, p. 123-132, 2002.

PEREIRA, A. C. C.; RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, F. S.; GUEDES, J. N.; SOBRINHO, N. M. B. A. Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 641-647, 2012.

PHILLIPS J. M.; HAYMAN D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.56, p.15-39, 2005.

RILLIG, M.C.; MUMMEY, D.L. Mycorrhizas and soils structure. **New Phytologist** v. 171, p. 41-53, 2006.

SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105 n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS. K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D. L.; POLLE, A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Berlim, v. 127, p. 887-898, 2001.

SCOT, J.A.; PALMER, S.J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.221-225, 1990.

SHAH, K.; KUMAR, R. G.; VERMA, S.; DUBEY, R. S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Sciences**, Chicago, v. 161, p. 1135-1144, 2001.

SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems**, India: Springer, 2004. p. 84-126.

SHETTY, K.G.; HETRICK, B.A.D.; SCHWAB, A.P. Effects of mycorrhizae and fertilizers amendments on zinc tolerance of plants. **Environmental Pollution**, v.88, p.307-314, 1995.

SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z. Interaction between cádmium and iron and its effects on photo-synthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Berlin, v. 34, p. 833-841, 1996.

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

SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, v.363, p.67-69, 1993.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. Londres: Academic Press, 2008. 787p.

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.; CARNEIRO, M. A. C. Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas. In: Siqueira J. O; SOUZA F. A; CARDOSO, E. J. B. N; TSAI, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 441-474.

SOUZA, V. L.; SILVA, D. C.; SANTANA, K. B.; MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A. A. F. de; MANGABEIRA, P. A. O.; ROCHA, E. A. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 343-354, 2009.

TRIOLA, M F. **Elementary Statistics**. 11. ed. Boston: Addison-Wesley, 2010.

WAGNER, G.J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, v.51, p.173-212, 1993.

WRIGHT, S.F.; FRANKE-SNYDER, M.; MORTON, J.B.; UPADHYAYA, A. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 181, p. 193-203, 1996.

VALADARES, R. B. S.; MESCOLOTTI, D. L. C.; CARDOSO, E.J.B.N. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 179-196.

VECCHIA, F.D.; LA ROCCA, N.; MORO, I.; DE FAVERI, S.; ANDREOLI, C.; RASCIO, N. Morphogenetic ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. **Plant Science**, v.168, p.329-338, 2005.

VOLLENWEIDER, P.; COSIO, C.; GUNTARDT-GOERG, M.S.; KELLER, C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 1-16, 2005.

YANG, Y.; SONG, Y.; SCHELLER, H. V.; GHOSH, A.; BAN, Y, CHEN, H.; TANG, M. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 86, p. 146-158, 2015.

ZHAO, F.J.; MCGRANT, S.P.; MERRINGTON, G. Estimates of ambient background concentrations of trace metals in soil for risk assessment. **Environmental Pollution**, v. 148, p. 221-229, 2007.