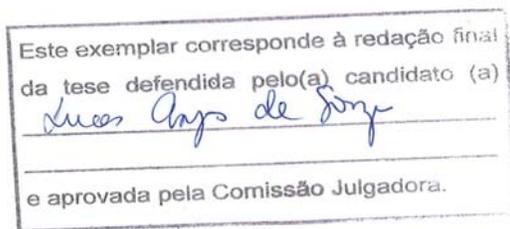


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCAS ANJOS DE SOUZA



**POTENCIAL FITORREMEIADOR DE LEGUMINOSAS
HERBÁCEAS ASSOCIADAS A FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES EM SOLO CONTAMINADO COM
CHUMBO**



**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
como requisito parcial para a obtenção do
Título de Mestre em Biologia Vegetal.**

Schiavinato
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marlene Aparecida Schiavinato
Co-Orientadora: Dr^ª Sara Adrián López de Andrade

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So89p	<p>Souza, Lucas Anjos de Potencial fitorremediador de leguminosas herbáceas associadas a fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com chumbo / Lucas Anjos de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Marlene Aparecida Schiavinato, Sara Adrián López de Andrade. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Plantas – Efeito dos metais pesados. 2. Simbiose. 3. Solos – Teor de chumbo. 4. Fitorremediação. 5. Micorriza arbuscular. I. Schiavinato, Marlene Aparecida, 1953-. II. Andrade, Sara Adrián López de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
--------------	---

Título em inglês: Phytoremediation potential of herbaceous leguminous associated with arbuscular mycorrhizal fungi in lead-contaminated soil.

Palavras-chave em inglês: Plants, Effect of heavy metal on; Symbiosis; Soil – Lead content; Phytoremediation; Arbuscular mycorrhizal.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marlene Aparecida Schiavinato, Adriana Parada Dias da Silveira, Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa.

Data da defesa: 26/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 26 de Fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato (Orientador(a))



Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa



Assinatura

Profa. Dra. Adriana Parada Dias da Silveira



Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Assinatura

Profa. Dra. Mônica Ferreira de Abreu

Assinatura

DEDICATÓRIA

Ofereço e dedico:

Ao meu pai Arlindo (*Em memória*)

À minha mãe Maria de Lourdes

À minha esposa Dirleine

Ao meu filho Mikael

À minha filha Rafaela

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que alcançasse tal objetivo.

À Prof^a. Dr^a. Marlene Aparecida Schiavinato pela orientação, paciência, ajuda, confiança e ensinamentos.

À Dr^a. Sara Adrián López de Andrade pela orientação, paciência, ajuda, sugestões, confiança e ensinamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek por compartilhar o HPLC.

Aos amigos, alunos e funcionários do departamento de Biologia Vegetal: Raphael, Sarah, Sarita, Cláudia, Gilberto, Luciana Benatti, Lilian, Pedro, Luciana Menolli, Luciano, Ises e Adriana.

A todos os demais alunos e funcionários do departamento de Biologia Vegetal pela amizade e contribuição indireta para a realização do trabalho.

Às técnicas de laboratório Néia, Dulce e Denise pelo auxílio com os ensaios laboratoriais.

À minha querida e amada mãe, pelo esforço empenhado, paciência e compreensão durante a realização do mestrado.

À minha esposa pelo companheirismo demonstrado durante a realização do curso.

Aos meus filhos pela compreensão da distância que tive que manter deles durante a temporada em Campinas.

Ao meu irmão Luan, em especial, pela paciência e compreensão durante minha ausência.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1 - Revisão de literatura.....	1
1.1 - Metais pesados no solo.....	1
1.2 - Mecanismos de tolerância da planta a MPs.....	3
1.2.1 - Imobilização na parede celular.....	4
1.2.2 - Exudação de ácidos orgânicos.....	5
1.2.3 - Fitoquelatinas.....	6
1.2.4 - Metalotioneínas.....	7
1.3 - Fitorremediação.....	8
1.4 - Leguminosas e fitorremediação.....	11
1.5 - Micorrizas arbusculares e metais pesados.....	13
2 - Objetivos.....	16
3 - Capítulo I: Desenvolvimento de <i>Canavalia gladiata</i> sob influência de micorriza arbuscular em solo contaminado com chumbo.....	17
Introdução.....	17
Material e métodos.....	19
Resultados.....	23
Discussão.....	30
Conclusões.....	38
4 - Capítulo II: A colonização micorrízica por <i>Glomus etunicatum</i> em <i>Calopogonium mucunoides</i> confere tolerância ao chumbo.....	39

Introdução.....	39
Material e métodos.....	41
Resultados.....	43
Discussão.....	54
Conclusões.....	60
5 - Capítulo III: Tolerância e potencial fitorremediador de <i>Stizolobium aterrimum</i> associada ao fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus etunicatum</i> em solo contaminado com chumbo.....	61
Introdução.....	61
Material e métodos.....	63
Resultados e discussão.....	67
Conclusões.....	81
6 - Considerações gerais.....	82
7 - Referências.....	84

RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias, para exploração do meio ambiente, está intimamente relacionado ao aumento da poluição ambiental, principalmente por metais pesados (MPs). O mais preocupante é quando a contaminação por MPs ocorre em solos agriculturáveis e leva, conseqüentemente, à contaminação de animais e seres humanos. O Pb é um MP que é cumulativo nos organismos vivos e não possui nenhuma função fisiológica vital conhecida até o momento. Esse elemento está presente em baixas concentrações quando o solo não sofreu influência humana. Existe uma grande preocupação em recuperar áreas contaminadas com MPs, mas diversas técnicas empregadas são muito laboriosas e caras. Uma alternativa seria a utilização da técnica de fitorremediação, na qual se utiliza plantas com capacidade de absorver e acumular grandes quantidades do contaminante em seus tecidos para, posteriormente, coletá-las e estocá-las em locais seguros. De uma maneira geral a associação de plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) altera a fisiologia da planta e dessa maneira o potencial fitorremediador pode ser acentuado. O objetivo desse trabalho foi investigar como a associação com o FMA *Glomus etunicatum* pode influenciar o crescimento e o potencial fitorremediador de *Canavalia gladiata*, *Stizolobium aterrimum* e *Calopogonium mucunoides* em solo contaminado com chumbo. Esse experimento foi conduzido utilizando-se as 3 espécies de leguminosas herbáceas citadas acima, inoculadas ou não com FMA, crescendo em diferentes concentrações de Pb (0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹) adicionado sob a forma de acetato de chumbo. Observou-se que a germinação das sementes de nenhuma das espécies estudadas foi afetada pelo Pb no solo. No entanto, o crescimento da parte aérea e das raízes foi afetado diferentemente em cada uma dessas plantas, sendo *C. mucunoides* a que sofreu mais com a presença de Pb no solo. A micorrização teve um papel importante na tolerância de *C. mucunoides* ao Pb, enquanto que nas demais espécies tal efeito não foi

observado. A micorrização favoreceu o acúmulo de Pb em *C. mucunoides* e em *C. gladiata* mas não em *S. aterrimum*. Todas as espécies estudadas apresentaram potencial fitoestabilizador de Pb; *C. mucunoides* apresentou menor translocação de Pb para a parte aérea que *C. gladiata* e *S. aterrimum*. A micorrização se mostrou fundamental apenas para o desenvolvimento de *C. mucunoides* na presença de Pb.

ABSTRACT

The development of new technologies, to the exploration of environment, is intimately related with the increasing environmental pollution, mainly by heavy metals (HMs). This scenario can become more serious when the contamination by HMs involves agricultural soils and results in contamination of crops used in human consumption and it lead to the contamination of animals and human beings. Pb is a HM that is accumulative in the living organisms and it doesn't possess any vital physiological function known until the present. This element is present in the soil in low concentrations when the soil hasn't suffered human influences. There is a great concern in recovering polluted areas with HMs, but several employed techniques are very laborious and expensive. An alternative would be the utilization of the phytoremediation technique that involves the use of plants with capability to absorb and accumulate great amounts of the pollutant in their tissues to, afterward collect and store them in safe places. In a general maner the association of plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) alters plant's physiology and, thus the phytoremediation potential can be enhanced. The objective of this work has been to investigate how the association with the AMF *Glomus etunicatum* can influence the growth and the phytoremediation potential of *Canavalia gladiata*, *Stizolobium aterrimum* and *Calopogonium mucunoides* in a soil contaminated with lead. This experiment was carried out using the 3 species of herbaceous leguminous mentioned above, inoculated or uninoculated with AMF, growing in different Pb concentrations (0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹) added as lead acetate. It was observed that the seeds' germination of all the studied species was not affected by Pb in the soil. However the growth was affected differently in each one of the species where *C. mucunoides* was the one that suffered more with Pb in the soil. The mycorrhization had an important role in the tolerance of *C. mucunoides* to Pb while in the other species we haven't observed such effect.

The mycorrhization favored the accumulation of Pb in *C. gladiata* and in *C. mucunoides* but not in *S. aterrimum*. All the studied plants presented phytostabilization; *C. mucunoides* presented lower translocation of Pb to aerial parts than *C. gladiata* and *S. aterrimum*. The mycorrhization demonstrated it self fundamental only to the development of *C. mucunoides* in the presence of Pb.

1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - METAIS PESADOS NO SOLO

O aumento da quantidade de indústrias e a demanda humana por novas tecnologias tem ocasionado o aumento da concentração de metais pesados (MPs) disponíveis nos solos e em corpos d'água (Islam et al., 2008). Dessa maneira, os MPs constituem um grupo de contaminantes importantes e de muito interesse para as áreas de estudo de preservação do meio ambiente e saúde humana. Chama-se de MP todo elemento metálico cuja densidade é igual ou superior a 5 g cm^{-3} . Os MPs existem naturalmente no meio ambiente e são potencialmente tóxicos dependendo da concentração em que estão presentes nos solos.

Os valores de referência para o Pb segundo o relatório da CETESB de 2005, é de 17 mg kg^{-1} . Entretanto, a concentração de MPs vem aumentando devido às atividades antropogênicas (Sharma e Dubey, 2005), tais como a mineração, a fundição e refinaria (Murakami e Ae, 2009).

Embora alguns MPs façam parte da lista de nutrientes minerais que são requeridos em baixas concentrações para o desenvolvimento pleno do vegetal, MPs tais como Cd, Pb e Hg não estão relacionados a nenhuma função biológica conhecida (Guilherme e Marchi, 2005). Como os organismos não possuem nenhum mecanismo homeostático para lidar com esses contaminantes, podem se tornar perigosos já que se acumulam e são transferidos via cadeia alimentar (Hart et al., 2005). Já outros MPs como Cu, Zn, Ni, Mn, Mo e Fe, que geralmente são co-fatores enzimáticos em reações de óxido-redução, são essenciais, mas quando estão presentes em altas concentrações podem exercer efeito tóxico para os vegetais, bem como para qualquer outro ser vivo.

Vários MPs (Pb, Cd, Zn, Cu, Hg e Al) podem ser encontrados no solo em altas concentrações, mas sua biodisponibilidade depende de características físico-químicas do solo como pH, conteúdo de matéria orgânica, conteúdo de argila, conteúdo de óxidos de Fe e potencial redox (E_h) (Giller et al., 1998). Em plantas, os MPs que não são nutrientes também são absorvidos pelas células por apresentarem semelhanças físicas e químicas com elementos que são nutrientes. No caso de humanos, em que o Pb parece ser absorvido por transportadores do tipo CDF (Cation Diffusion Facilitator), um dos transportadores de Ca^{2+} , e Evans et al. (2003) sugerem que este transportador seja inibido pelo Pb por competição ou bloqueio do canal de entrada dos cátions.

O Pb é um elemento metálico que pertence ao grupo IVA (grupo do Carbono) da tabela periódica, com densidade $11,34 \text{ g cm}^{-3}$, não é necessário à vida das plantas e de nenhum outro organismo vivo, incluindo o homem (Piechalak et al., 2003). O Pb está presente no solo principalmente no estado de oxidação Pb^{+2} (Kabata-Pendias e Pendias, 2001) embora a forma Pb^{+4} também exista. É um dos maiores poluentes do solo que pode estar presente em quantidades extremamente altas em solos próximos a rodovias de grandes cidades (Memon e Schröder, 2009).

No estado de São Paulo, a CETESB elaborou um documento regulamentando medidas para os valores das concentrações de Pb em solos: valor de referência 17 mg kg^{-1} ; valor de prevenção 72 mg kg^{-1} ; valores de intervenção agrícola 180 mg kg^{-1} , intervenção residencial 300 mg kg^{-1} e intervenção industrial 900 mg kg^{-1} (CETESB, 2005).

Aumentos significantes no conteúdo de Pb em solos agriculturáveis têm sido observados perto de áreas industriais (Sharma e Dubey, 2005) o qual se acumula nas camadas mais superficiais do solo e sua concentração vai diminuindo de acordo com o aumento da profundidade do solo.

Um dos principais efeitos da toxicidade dos MPs, inclusive do Pb, é a redução do crescimento radicular (Delhaize e Ryan, 1995; Guo et al., 2004; Iannacone e Alvariño, 2005). Reduções significativas foram observadas no comprimento das raízes de cebola (37%), beterraba (75%), arroz (34%) e rabanete (38%) na concentração de 200 mg L⁻¹ de Pb (Iannacone e Alvariño, 2005). No entanto, várias outras conseqüências negativas também ocorrem devido à presença de Pb, como por exemplo, deficiência e desbalanços nutricionais, redução da capacidade fotossintética, déficit no status hídrico, redução do crescimento, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (Singh et al., 2003; Verma e Dubey, 2003; Sharma e Dubey, 2005; Andrade et al., 2008).

O Pb também pode prejudicar o desenvolvimento vegetal de uma maneira indireta, pois afeta a maneira com que a microbiota do solo se desenvolve, levando a uma diminuição da biomassa microbiana e à desestruturação das comunidades microbianas (Giller et al., 1998), bem como à diminuição da biodiversidade (Chien et al., 2008). Desta maneira, os processos ecológicos governados pelos microrganismos, como a ciclagem de nutrientes e a decomposição de matéria orgânica, são prejudicados como foi observado nos experimentos de Gremion et al. (2004), nos quais a atividade microbiana em solos contaminados com Cd, Cu e Zn foi reduzida. Andrade e Silveira (2004) observaram que o Pb afetou a biomassa e atividade microbiana em um experimento com soja. Sendo assim, a fertilidade do solo pode ficar seriamente comprometida e impedir o bom desenvolvimento dos vegetais (Oliveira e Pampulha, 2006).

1.2 - MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DA PLANTA A MPs

Na planta, os íons metálicos podem ser acumulados em raízes, caules, folhas, frutos e sementes. Os MPs podem ser encontrados livres dentro das células, complexados à matriz

celulósica externa ou acumulados em formas não tóxicas dentro dos vacúolos (Memon e Schröder, 2009).

As plantas possuem diferentes mecanismos de tolerância aos MPs os quais podem ser divididos em dois grandes grupos: mecanismos de acúmulo do elemento nos tecidos e os mecanismos de exclusão do elemento de dentro das células (Arrigada et al., 2005), sendo este último encontrado mais freqüentemente em raízes.

1.2.1 - IMOBILIZAÇÃO NA PAREDE CELULAR

A parede celular, principalmente das células das raízes, é a primeira barreira de retenção dos MPs, pois suas cargas negativas permitem a interação eletrostática com o MP.

A retenção de Pb na parede celular de raízes foi demonstrada por (MacFarlane e Burchett, 2000) em experimentos com *Avicennia marina*, uma planta de manguezal. Deng et al. (2009) também demonstraram que MPs, como Pb, Zn e Fe, também ficaram retidos nas paredes celulares das raízes de várias plantas de pântano, evidenciando o papel importante desta estrutura celular. Entretanto, em plantas de cebola submetidas a doses altas de Pb, este se acumulou dentro das células sob forma complexada e insolúvel (Wierzbicka et al., 2007). Logo, o local de acúmulo do Pb depende muito da planta e seu habitat. Embora pareça desejável que a planta retenha o Pb em suas raízes, evitando assim que este alcance a parte aérea e prejudique a fotossíntese, a capacidade de exploração do solo pelas raízes pode ficar comprometida, já que a retenção de Pb na parede celular pode levar a uma redução do alongamento celular com a conseqüente redução do crescimento radicular (Delhaize e Ryan, 1995; Di Salvatore et al., 2008). Esse efeito sobre o crescimento radicular é devido ao efeito negativo do Pb sobre a organização dos microtúbulos durante a mitose (Samardakiewicz e

Wozny, 2005), prejudicando assim a divisão celular (Kozhevnikova et al., 2009) e reduzindo também a elasticidade das células das raízes na zona de alongamento.

Geralmente, esta redução do crescimento radicular vem acompanhada de escurecimento, presença de protuberância acima do ápice radicular e perda da dominância apical, pois podem aparecer várias raízes secundárias num mesmo eixo radicular (Kopittke et al., 2007).

1.2.2 - EXUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos cítrico, oxálico, tartárico, málico, acético, succínico, fumárico e lático são compostos orgânicos de baixa massa molecular, encontrados freqüentemente na rizosfera, que são exsudados pelas raízes das plantas e microrganismos e/ou liberados durante a decomposição da matéria orgânica do solo (Schwab et al., 2008). Esses ácidos orgânicos atuam como quelantes naturais que favorecem a absorção e o armazenamento do elemento complexado a ele.

São poucos os trabalhos que apresentam a eficiência dos ácidos orgânicos de baixa massa molecular na complexação de diversos MPs, sendo mais freqüente o relato deste mecanismo no sentido de evitar a toxicidade do Al^{3+} (Hall, 2002; Kochian et al., 2004). Segundo Kochian et al. (2004), os ácidos orgânicos são liberados em resposta ao Al^{3+} e formam complexos que, se forem absorvidos, farão com que o Al^{3+} não exerça seu efeito tóxico dentro das células por ficarem retidos dentro do vacúolo ou por serem simplesmente excluídos de dentro das células por transportadores de complexos ácido orgânico – Al.

Exudados das raízes de espécies de *Thlaspi* acumuladoras e não acumuladoras apresentaram altos níveis de níquel complexado com citrato (Salt et al., 2000). Em relação ao Pb, são poucos os estudos que demonstram que ácidos orgânicos auxiliam na diminuição do

estresse; Freitas et al. (2009) observaram que o ácido cítrico estimula a absorção do Pb complexado, embora o ácido cítrico tenha afetado o crescimento das plantas.

1.2.3 - FITOQUELATINAS

Fitoquelatinas (FQs) são peptídeos de baixa massa molecular, ricos em cisteína, que são capazes de se ligar a íons metálicos pelo grupo sulfidrila da cisteína (Grill et al., 1987). O termo fitoquelatina é uma composição de fito, que significa planta, e quelatina, que faz referência aos quelantes de metais (Inouhe, 2005). A estrutura geral de uma FQ é $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ onde “n” pode variar de 2 a 11 repetições (Rauser, 1990; Leopold et al., 1999); entretanto, numa mesma espécie podem haver FQs com diferentes “n”.

Embora as FQs sejam peptídeos, estas moléculas não são sintetizadas via tradução de RNAm nos ribossomos. Isso foi elucidado por Grill et al. (1987) que esses peptídeos eram sintetizados enzimaticamente a partir da glutathione (GSH), um antioxidante, pois observou-se que inibidores da síntese de GSH levavam à diminuição da síntese de FQ e que enquanto a síntese de FQ era induzida o conteúdo de GSH diminuía drasticamente. As FQs possuem uma ligação entre a cadeia lateral do Glu e o grupo amino da Cys (ligação γ -glutamil) e sua ligação com a Gly é catalisada pela reação da enzima sintetase da glutathione. A síntese de FQ se faz pela enzima sintetase da fitoquelatina, que é uma dipeptidil transpeptidase responsável por transferir uma unidade $\gamma\text{-Glu-Cys}$ de uma glutathione para outra e assim aumentar a cadeia (Inouhe, 2005).

As FQs são muito conhecidas por amenizarem os efeitos nocivos dos metais pesados sobre o metabolismo vegetal e, embora a enzima que as produzem seja expressa constitutivamente, a atividade desta enzima é estimulada pela presença de MPs e principalmente na presença de Cd (Zenk, 1996; Hall, 2002; Memon e Schröder, 2009).

Tanto o MP, quanto a FQ ou o complexo MP-FQ são geralmente transportados para o vacúolo (Salt e Rauser, 1995), onde são armazenados sem exercer seu efeito tóxico. O complexo MP-FQ e as FQs são transportados para dentro do vacúolo por um transportador tipo ABC dependente de Mg e ATP (Salt e Rauser, 1995) enquanto que o MP livre é transportado por transporte ativo secundário H⁺-ATPase antiporte.

O Pb é o segundo MP com maior capacidade de induzir a síntese de FQs (Grill et al., 1987), embora outros metais também possam induzir sua síntese. O fato do Pb ser um bom indutor da síntese de FQs evidencia a importância da síntese desses peptídeos entre os mecanismos de detoxificação do Pb (Sharma e Dubey, 2005).

1.2.4 - METALOTIONEÍNAS

Diferentemente das FQs que são sintetizadas enzimaticamente, as metalotioneínas (MTs) são sintetizadas por mecanismo de tradução de RNAm nos ribossomos (Hamer, 1986; Stillman, 1995; Hall, 2002). As MTs são peptídeos de baixa massa molecular, ricos em cisteína e ligantes de metais dentro das células, foram descobertas há mais de 40 anos como proteínas ligantes de Cd em rins de cavalo (Cobbett e Goldsbrough, 2002). As MTs são categorizadas em 3 grupos, as MTs I são características de mamíferos e as demais MTs são classificadas como MTs II e MTs III de acordo com o alinhamento com os resíduos de cisteína altamente conservados característicos das MTs de mamíferos (Cobbett e Goldsbrough, 2002). As MTs possuem a função de se ligarem a metais, principalmente ao Zn, ao Cu e ao Cd sendo que esses metais têm papel na ativação da transcrição das MTs (Briat e Lebrun, 1999).

Uma das funções atribuídas às MTs de plantas é o controle da homeostase de metais pesados essenciais dentro das células (Stillman, 1995; Hall, 2002; Lasat, 2002). No entanto,

outras funções são especuladas devido ao fato de existir mais de um tipo de MTs e a concentração destes subtipos variarem de acordo com o estresse envolvido (Stillman, 1995).

Plantas de tabaco transformadas com MT-2 humana apresentaram maior tolerância ao Cd (Misra e Gedamu, 1989). Plantas de *Arabidopsis thaliana* transformada com MT de ervilha apresentaram maior tolerância e acúmulo de Cu (Evans et al., 1992). Embora seja confirmado que as MTs se ligam a metais, não foi encontrado informações sobre o papel das MTs em plantas submetidas a estresse por Pb.

1.3 - FITORREMEDIAÇÃO

A fitorremediação é uma técnica em que se utiliza o vegetal *in situ* para descontaminação de solos que estejam contaminados por MPs (Gratão et al., 2005). A fitorremediação não é aplicada apenas à remediação de solos contaminados por MPs ou contaminantes inorgânicos, mas também para contaminantes orgânicos como os pesticidas, freqüentemente utilizados na agricultura (Peuke e Rennenberg, 2005). Além disso, as plantas podem exercer seu papel remediador quando os poluentes estão presentes no solo, na água ou no ar (Salt et al., 1998). A fitorremediação é atualmente dividida nos seguintes subtipos: fitoextração, fitodegradação, rizofiltração, fitoestabilização e a fitovolatilização (Peuke e Rennenberg, 2005).

A fitoextração é a absorção e acúmulo de contaminantes, geralmente metais ou poluentes orgânicos, em partes da planta que podem ser coletadas, como folhas ou parte aérea. A fitodegradação é a degradação do contaminante pela planta, sendo que o contaminante é geralmente um composto xenobiótico. A rizofiltração é a absorção e o armazenamento do contaminante em órgãos que podem ser colhidos posteriormente só que, diferentemente da fitoextração, o contaminante fica retido principalmente nas raízes, sendo utilizada em

ambientes aquáticos. A fitoestabilização é a imobilização, redução da mobilidade e da biodisponibilidade do contaminante pelas raízes e a microbiota associada a rizosfera; e, por último, a fitovolatilização é a volatilização do contaminante pela planta, como no caso do Selênio (Se), que algumas plantas são capazes de eliminá-lo por meio da produção de um composto chamado dimetilselenideo que é volátil (Salt et al., 1998).

A vantagem mundialmente conhecida da utilização da fitorremediação ao invés de outras técnicas de remediação de solos contaminados com MPs é o seu custo, que é muito mais baixo que o das demais técnicas. Os maiores custos na fitorremediação são com aragem e preparação do solo, plantio das sementes, controles das ervas invasoras e pragas, colheita e descarte da biomassa. Por outro lado, a desvantagem da fitorremediação é o longo período que se leva para a descontaminação da área contaminada, principalmente porque as plantas que são hiperacumuladoras naturalmente, geralmente, são de crescimento lento. A fitorremediação é uma técnica relativamente barata para descontaminação do solo, pois, uma vez feita a semeadura, deve-se apenas esperar para coletar as plantas após um período determinado, ou seja, os custos são relativamente baixos (Glass, 2000).

As plantas chamadas de hiperacumuladoras possuem a capacidade de estocar pelo menos 100 mg kg^{-1} de Cd; 1000 mg kg^{-1} de Co, Cu, Cr, Ni, Zn e Pb; e 10000 mg kg^{-1} de Mn em sua parte aérea (Reeves e Baker, 2000). Embora as plantas com capacidade de hiperacumular metais sejam alvos para programas de fitorremediação, normalmente não possuem todas as características desejáveis à aplicação de tal técnica como sistema radicular denso e profundo, crescimento rápido e grande produção de biomassa. Por exemplo, a espécie *Brassica juncea* consegue acumular apenas um terço da concentração de Zn que *Thlaspi caerulescens* consegue. No entanto, *B. juncea* é muito mais eficiente na remoção deste elemento do que *T. caerulescens*, que é uma hiperacumuladora de Zn, devido ao fato de

produzir dez vezes mais biomassa (Ebbs et al., 1997). Hiperacumuladoras típicas chegam a levar de 13 a 16 anos para despoluir uma área tipicamente contaminada (Salt et al., 1998).

Embora a família Brassicaceae seja a mais conhecida por ter espécies hiperacumuladoras (Salt et al., 1998), outras famílias como Cariofilaceae, Ciperaceae, Cunouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae e Euphorbiaceae também possuem espécies com essa característica (Gratão et al., 2005).

Outro fator que modifica a capacidade de fitoextração da planta é a biodisponibilidade do contaminante, que é variável. Por exemplo, o Pb além de ser pouco solúvel é muito imóvel no solo e sua taxa de extração é limitada por sua solubilidade e difusão até a superfície da raiz (Lombi et al., 2001).

A remediação de solos altamente contaminados com Pb tem sido realizada com técnicas de engenharia, envolvendo escavação e retirada do solo do local. Entretanto, é um processo caro e geralmente requer a restauração do local que teve o solo removido. *Thlaspi rotundifolium* e *Brassica juncea* têm sido reportadas por apresentarem alta tolerância e boa capacidade de extrair Pb de solos contaminados (Sharma e Dubey, 2005). *Lathyrus sativus*, uma leguminosa, demonstrou boa tolerância ao Pb e, em solução nutritiva, quando submetida a uma dose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Pb acumulou 153 mg g^{-1} de massa de matéria seca de raízes (Brunet et al., 2008).

Uma questão importante a ser considerada na fitorremediação é o que fazer com as plantas coletadas, uma vez que o MP fica armazenado em seus tecidos. Uma opção é a queima do material vegetal coletado para produção de energia e posterior reutilização do MP por um processo denominado fitomineração; no entanto, isto só é possível quando a planta é uma fitoextratora (Peuke e Rennenberg, 2005). Já, para uma planta fitoestabilizadora a consideração seria voltada mais para o lado ecológico, pois o contaminante teria sua

biodisponibilidade reduzida, favorecendo o processo de recuperação de ambientes contaminados. Assim, a fitoestabilização constitui uma alternativa para a recuperação de áreas degradadas.

1.4 - LEGUMINOSAS E FITORREMEDIAÇÃO

As leguminosas constituem um grupo de plantas de elevado potencial para utilização na fitorremediação porque são capazes de interferir no ciclo global do nitrogênio, devido à sua interação com bactérias fixadoras de nitrogênio do solo que possuem a capacidade de fixar nitrogênio molecular (N₂) formando amônia e disponibilizando este composto ao vegetal. Esta é uma prática que reduz a utilização de adubos nitrogenados nas culturas sem que a planta tenha déficit no crescimento e desenvolvimento.

Um dos primeiros relatos de uma leguminosa capaz de hiperacumular MP foi reportado por Duvigneaud (1959) que observou que plantas de *Crotalaria cobalticola* eram capazes de acumular quantidades de cobalto até 530 µg g⁻¹ de massa seca. Wild (1970) também observou concentrações de Ni em espécies de *Pearsonia metallifera* variando entre 1000 e 10000 mg kg⁻¹.

Plantas de *Lupinus albus* L. apresentam boa tolerância ao Cd, crescendo em solução nutritiva com doses de até 45 µmol L⁻¹ de Cd (Zornoza et al., 2002).

Estudos recentes também demonstraram que plantas de *Dorycnium pentaphyllum* Scop. podem ser consideradas promissoras para fitoestabilização de solos contaminados com Zn e Cd (Lefevre et al., 2009).

Plantas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) apresentaram boa tolerância e capacidade em fitoextrair Cd em solução nutritiva (Rossi, 2007).

No que se refere a exposição de leguminosas a concentrações excessivas de Pb ainda existe pouco estudo sobre a resposta dessas plantas a esse metal. Almeida et al. (2008) relataram que plantas de feijão-de-porco toleraram concentrações de até $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb sem apresentarem sintomas de fitotoxicidade na parte aérea. Romeiro et al. (2007) também demonstraram que feijão-de-porco é uma espécie possivelmente utilizável para fitorremediação, uma vez que toleraram doses de até $400 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Plantas do gênero *Canavalia* são de especial interesse para a prática de fitorremediação uma vez que possuem grande produção de biomassa, crescimento rápido, robustez e sistema radicular profundo e denso. Considerando-se que a maioria das leguminosas forma nódulos radiculares, é importante saber como o estabelecimento dessa interação responde na presença de MPs.

Sabe-se que a nodulação é reduzida em condições onde existe grande contaminação por MP. Al-Garni (2006) demonstrou que a nodulação de caupi não ocorre quando há uma concentração de 1000 mg kg^{-1} de Zn no solo. Geralmente esse efeito também é esperado para outros MPs, pois seu efeito tóxico é exercido sobre as bactérias do solo (Wang et al., 2008).

Os MPs podem, por exemplo, reduzir a diversidade de espécies e limitar a reprodução microbiana (Filali et al., 2000; Wei et al., 2009). Desta maneira, um solo que tenha altas concentrações de MPs pode limitar consideravelmente a produção vegetal e por isso é necessário o estudo de espécies de bactérias que sejam tão tolerantes quanto às espécies de leguminosas usadas para projetos de fitorremediação. Como a capacidade de uma planta ser fitorremediadora é também dependente do tipo de poluente presente no solo, é importante que várias espécies sejam testadas para que possam ser detectadas aquelas que possuem maior tolerância ao poluente (Coutinho e Barbosa, 2007).

1.5 - MICORRIZAS ARBUSCULARES E METAIS PESADOS

A associação de fungos com as raízes das plantas forma um tipo de associação mutualística chamada micorriza. A maioria das raízes das plantas superiores forma micorrizas com os fungos Zigomicetos da ordem Glomales (Harrier, 2001). Essa associação ocorre em aproximadamente 80% das plantas vasculares terrestres, dentre elas várias espécies de importância agrônômica (Smith e Read, 1997) e foi decisivo para a colonização do ambiente terrestre pelos vegetais.

As micorrizas podem ser classificadas em dois grandes grupos: as ectomicorrizas e as endomicorrizas. As ectomicorrizas são caracterizadas por formarem uma estrutura ao redor das raízes que é chamada de manto que é constituído por um aglomerado de hifas. As hifas penetram na região cortical da raiz extracelularmente e formam uma estrutura chamada rede de Hartig que é onde ocorre a troca de nutrientes. As endomicorrizas são caracterizadas pela capacidade de penetrarem nas células vegetais das raízes, sem romperem a membrana plasmática, e formarem estruturas de troca de nutrientes entre a planta e o fungo (arbúsculos), além de formar estruturas de armazenamento de substâncias energéticas (vesículas), como lipídeos.

A influência das micorrizas na nutrição mineral de plantas é mais importante para a absorção de elementos de baixa difusão no solo, como P, Zn, Cu ou Fe. Já é muito bem relatado o efeito da micorrização no aumento da absorção de fósforo (P) devido à maior capacidade exploratória do solo pelas hifas do fungo. Não obstante, a eficiência da micorriza, no que diz respeito à aquisição de nutrientes, difere entre genótipos de FMA e entre as espécie da planta hospedeira (Marschner, 1995).

A micorrização aumenta a resistência da planta a estresses de tipo biótico, como os causados por agentes fitopatogênicos, e abióticos, como a seca, a salinidade e/ou o excesso de

metais (Leyval et al., 2002). O efeito dos FMAs na absorção de metais pelas plantas é um pouco confuso. Dependendo da concentração de MP as micorrizas atuam de forma diferente aumentando ou restringindo a absorção do MP (Göhre e Paszkowski, 2006). Gildon e Tinker (1983); Weissenhorn e Leyval (1995) observaram que plantas micorrizadas absorveram mais MP, enquanto que Leyval et al. (1991) e Andrade et al. (2004) observaram menor absorção de MP pelas plantas micorrizadas. As hifas podem funcionar como uma proteção para a planta, uma vez que a parede celular do fungo também pode funcionar como uma barreira de retenção do contaminante (Galli et al., 1994). Isso foi demonstrado por (Joner e Leyval, 1997), que indicaram que a transferência do metal à planta é dificultada devido à imobilização do metal pela parede celular do fungo.

Plantas de *Chrysanthemum moritolum* e *Miscanthus florodulus* associadas a FMA em solo contaminado com Pb, Zn, Cu, Cd e As têm a absorção destes elementos reduzida, mas sem afetar a transferência de outros nutrientes (Leung et al., 2007).

Plantas de milho colonizadas por diferentes isolados do FMA *Glomus intraradices* apresentaram maior concentração de Pb que plantas não micorrizadas ou com grau de micorrização baixo (Sudova e Vosatka, 2007). Rashid et al. (2009) demonstraram que plantas de *Dichanthium annulatum* e *Desmostachya bipinnata* apresentaram concentrações de Cd mais altas que o comum para esta espécie e atribuíram tal fato à micorrização.

A revegetação e descontaminação de locais contaminados com MPs pode ser facilitada utilizando-se plantas associadas a FMAs. A capacidade da micorrização em aumentar a absorção de Pb foi demonstrada por Rabie (2005) que mostrou que em plantas de trigo micorrizadas o transporte de Pb para a parte aérea é muito maior que em plantas não micorrizadas e em plantas não micorrizadas o acúmulo se dá nas raízes. Andrade et al. (2003) também demonstraram que soja foi capaz de absorver e transportar quantidades altas de Pb

para a parte aérea, quando associadas a FMA, em solos com níveis de saturação por base de 63%.

Como o excesso de MPs afeta todas as formas de vida presentes no solo, eles podem reduzir a colonização intrarradicular do FMA (Andrade et al., 2004; Citterio et al., 2005) e também inibir processos como germinação de esporos e crescimento de hifas, retardando a colonização radicular. No entanto, existem casos em que concentrações excessivas de MPs não afetaram a colonização radicular do FMA (Rivera-Becerril et al., 2002), sugerindo certa tolerância aos metais.

De uma maneira geral, as leguminosas são plantas bem micorrizáveis, sendo que a associação com FMAs incrementa a eficiência de fixação de nitrogênio e a própria associação com bactérias fixadoras de nitrogênio estimula a micorrização natural nas plantas (Barea e Azcón-Aguilar, 1983).

Dessa maneira, é importante levar em consideração a capacidade de tolerância não só da planta, mas também dos microssimbiontes que realizam associações simbióticas com as plantas, a fim de obter uma combinação perfeita para o melhor crescimento, desenvolvimento e potencial fitorremediador.

OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a tolerância de *Canavalia gladiata*, *Stizolobium aterrimum* e *Calopogonium mucunoides* ao MP chumbo.
- ✓ Avaliar o efeito do fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* na tolerância das plantas ao chumbo.
- ✓ Avaliar o potencial fitorremediador das 3 espécies de leguminosas em solo contaminado por chumbo.
- ✓ Avaliar o efeito do chumbo no estabelecimento da associação de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares com as leguminosas estudadas.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO DE *Canavalia gladiata* SOB INFLUÊNCIA DE MICORRIZA ARBUSCULAR EM SOLO CONTAMINADO COM CHUMBO

INTRODUÇÃO

Os metais pesados (MPs) existem naturalmente no solo sob a forma de minerais específicos e são liberados para o meio ambiente por meio do intemperismo da rocha mãe. A concentração de MPs, em especial o chumbo (Pb), vem aumentando devido às atividades antrópicas (Sharma e Dubey, 2005) e dentre elas se destacam a mineração, a fundição e a refinaria (Murakami e Ae, 2009).

O Pb é um elemento químico não necessário à vida das plantas e de nenhum outro organismo vivo, incluindo o homem e por isso torna-se de grande importância entender os mecanismos pelos quais algumas plantas conseguem se desenvolver em ambientes contaminados com esse metal (Piechalak et al., 2003). Um dos principais efeitos da toxicidade dos MPs é a redução do crescimento radicular (Delhaize e Ryan, 1995; Guo et al., 2004; Iannacone e Alvariño, 2005), já que a raiz é a primeiro órgão de contato do vegetal com o contaminante. Outros efeitos como redução da biomassa, da área foliar (Gopal e Rizvi, 2008) e da síntese de clorofilas (Bekiaroglou e Karataglis, 2002) também são observados quando as plantas estão submetidas a estresse por excesso de MPs.

Várias estratégias para a recuperação de solos contaminados com MPs são utilizadas (Xia et al., 2009). Métodos químicos, como o uso de quelantes, são utilizados para remediar o solo contaminado, mas este é um processo caro e o contaminante ainda permanece no solo. Por isso, o desenvolvimento de uma tecnologia emergente, a fitorremediação, que utiliza plantas para imobilizar e/ou acumular o contaminante em seus tecidos (Gratão et al., 2005)

está sendo estudada intensamente por se tratar de uma técnica que além de retirar o contaminante do solo é mais econômica e menos agressiva ao meio ambiente.

Geralmente plantas com capacidade de hiperacumular MPs não possuem características favoráveis à fitorremediação, tais como crescimento rápido e grande produção de biomassa. Por exemplo, no caso de *Thlaspi caerulescens*, hiperacumuladora de Zn, seriam necessários nove ciclos de culturas completas para reduzir a concentração de Zn do solo de 440 para 300 mg kg⁻¹ (McGrath et al., 1993). Uma alternativa seria o estudo da resposta de plantas que tenham essas características, quanto à tolerância a MPs.

Algumas espécies de leguminosas são potencialmente úteis à fitorremediação, já que possuem crescimento rápido e grande produção de biomassa. Além disso, muitas delas formam associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, o que pode também ser considerada uma característica vantajosa à planta, por melhorar a eficiência de uso do nitrogênio do ambiente em solos contaminados, que muitas vezes apresentam também deficiência em nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal.

Além da associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, deve-se considerar a associação da maioria das espécies vegetais com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), formando a simbiose conhecida como micorriza. Nesta associação os MPs podem ser absorvidos pelas hifas e transferidos aos tecidos vegetais. Em alguns casos, as plantas associadas a FMA podem aumentar a absorção de MPs e o seu transporte às raízes, caule ou folhas enquanto que em outros casos a associação com o fungo pode contribuir para a imobilização do MP nas hifas extra-radiculares ou nas raízes. Assim, a contribuição da micorriza para a fitorremediação de solos contaminados com MPs é dependente da interação planta-fungo-MPs e das condições do solo (Göhre e Paszkowski, 2006). O efeito benéfico dos fungos micorrízicos associados a plantas sob estresse por excesso de MPs já foi relatado por

diversos autores (Andrade et al., 2004; Al-Garni, 2006; Göhre e Paszkowski, 2006). Dentro desse contexto, é necessário mais informações sobre a interação entre as raízes das plantas, os simbiontes FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio, pois há poucos estudos sobre o uso de leguminosas associadas aos rizóbios e fungos micorrízicos na avaliação do potencial fitorremediador em associação com esses microrganismos (Khan et al., 2000).

O gênero *Canavalia* possui algumas espécies com boas características morfológicas e fisiológicas para a fitorremediação como demonstrado em *Canavalia ensiformis* para o Pb (Romeiro et al., 2007) e para o Cd (Rossi, 2007). A espécie *Canavalia gladiata* é uma leguminosa tropical que possui grande produção de biomassa, crescimento rápido, raízes densas e profunda e por isso pode ser uma espécie com potencial fitorremediador.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial fitorremediador de plantas de *Canavalia gladiata*, inoculadas ou não com FMA, bem como a resposta de alguns marcadores bioquímicos em solo contaminado com Pb.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4. Os tratamentos consistiram da inoculação ou não de FMA e da adição de quatro concentrações de Pb ao solo: 0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹, com sete repetições para cada tratamento.

Preparo do solo

O solo utilizado foi do tipo latossolo vermelho-amarelo de textura argilosa. Foi realizada análise físico-química do solo utilizado no experimento, o qual apresentou pH (CaCl₂) de 4,6; 25 g dm⁻³ de matéria orgânica; 9 mg dm⁻³ de P e 2, 7 e 29 mmol_c dm⁻³ de K,

Mg e Ca, respectivamente. A amostra de solo foi esterilizada por autoclavagem, a 121°C por 1h, com o fim de eliminar os propágulos infectivos de FMAs, e posteriormente acondicionada em vasos plásticos com dois litros de capacidade. O solo de cada vaso recebeu Pb, sob a forma de solução aquosa de acetato de chumbo, nas concentrações de Pb determinadas para cada tratamento (0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹). Os nutrientes P e K, que apresentaram concentrações abaixo do adequado foram corrigidos, utilizando-se 10 mL de solução de fosfato de potássio 45 g L⁻¹ em um volume de 2 litros de solo, de acordo com o indicado pelo Boletim 100 (Raij et al, 1996) para culturas anuais. Posteriormente, o solo foi deixado em repouso para estabilização por aproximadamente 15 dias e nova análise de solo foi realizada apresentando-se os resultados na tabela 1.

Tabela 1 – Características químicas do solo após a adição de Pb e correção da fertilidade.

Pb (mg kg ⁻¹)	pH	V	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Pb
		%	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	mmolc dm ⁻³				mg dm ⁻³					
0	5,8	65	15	25	3,0	30	5	20	0,16	3,4	7	11,9	0,9	0,61
250	5,8	60	16	21	2,9	26	5	22	0,18	3,8	9	6,7	0,6	126
500	5,8	63	15	21	2,9	26	5	20	0,17	3,6	8	6,0	0,7	268
1000	5,7	63	17	23	2,8	26	5	20	0,16	3,8	8	9,2	0,7	520

Material biológico

As sementes de *Canavalia gladiata*, obtidas na área experimental da casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP – Campinas, SP, foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 25% por 10 minutos. Os rizóbios específicos para *Canavalia ensiformis* foram cedidos da coleção do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e para a produção do inóculo foram transferidos para frascos contendo meio líquido YMB (Yeast Manitol Broth) e esses mantidos no escuro, sob agitação constante, durante 6 dias em temperatura ambiente. As sementes foram imersas na suspensão de rizóbios antes da semeadura durante 5 minutos. O inóculo de FMA foi colocado nas covas

das sementes imediatamente antes da semeadura das mesmas. Foram utilizados 10 ml de inóculo misto de FMA, contendo areia-solo, esporos, hifas e raízes colonizadas de *Brachiaria brizantha*, que continha aproximadamente 2700 esporos de *Glomus etunicatum*. Foram semeadas 4 sementes por vaso e após a emergência foi feito um desbaste deixando-se apenas uma planta por vaso. A seguir, foi realizada uma re-inoculação de suspensão de rizóbio.

Germinação

A germinação das sementes foi acompanhada durante nove dias e considerou-se a emergência do hipocótilo como germinação. A partir dos dados obtidos, foi estimada a porcentagem de germinação. Nesse parâmetro, não foi considerado o tratamento que recebeu inoculação de FMA.

Coleta do material vegetal

Após o período de crescimento de aproximadamente 90 dias, três plantas de cada tratamento foram coletadas, lavadas, subdivididas em raízes e parte aérea e secas em estufa a 60°C até atingirem massa constante. As quatro plantas restantes de cada tratamento tiveram a quarta folha trifoliolada completamente expandida coletada, armazenada em saquinhos de papel alumínio e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. Posteriormente essas folhas foram armazenadas em freezer a -40°C, onde permaneceram até o momento das análises bioquímicas.

Medidas de crescimento, nodulação e colonização micorrizica

Foram realizadas as seguintes medidas de crescimento: altura, número de folhas, massa da matéria seca da parte aérea, massa da matéria seca de raízes e massa da matéria seca de

nódulos. Foi contado o número de nódulos para estimar a taxa de nodulação. O clareamento das raízes foi realizado de acordo com o método proposto por Phillips e Hayman (1970) e a colonização micorrízica foi baseada no método proposto por Giovanetti e Mosse (1980) em microscópio óptico com aumento de 400x, observando três lâminas por raiz, com 10 segmentos de raiz de um centímetro cada uma.

Determinações analíticas

Para a extração dos diferentes compostos, aproximadamente 10 mg de tecido foliar liofilizado foi imerso em 3 mL de solução de metanol:clorofórmio:água (MCW) de acordo com Bieleski e Turner (1966) na proporção 12:5:3 (v/v/v), respectivamente. O material permaneceu em geladeira a 4°C, por 4 dias. A esta solução foi acrescentada uma mistura de clorofórmio e água na proporção de 1:1,5 (v/v); esta solução foi agitada e deixada em repouso em geladeira por 24 horas e posteriormente foram coletados 3 mL da fração aquosa-metanólica, que foi seca em concentrador a vácuo (SpeedVac) e ressuspensa em 0,5 mL de água mili-Q para análises bioquímicas. O nitrato foi determinado de acordo com o método descrito por Cataldo et al. (1975), utilizando-se KNO_3 para a curva padrão; a amônia foi determinada de acordo com o método descrito por McCullough (1967), utilizando-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a curva padrão; a concentração de aminoácidos solúveis totais foi determinada de acordo com o método proposto por Cocking e Yemm (1954), utilizando-se leucina para a curva padrão e a peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) Calmak e Horst (1991). As concentrações de P, S, Fe, Zn e Pb em raízes e parte aérea foram determinadas após digestão nítrico-perclórica segundo Abreu et al. (2000) e analisados por ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy).

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e teste de Tukey para a comparação de médias utilizando-se o software SISVAR. Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno $(x/100)^{1/2}$ e os referentes a contagens foram transformados em $\log(x+1)$ antes da análise estatística.

RESULTADOS

Germinação

A adição de doses crescentes de Pb ao solo não influenciou significativamente a germinação das sementes de *C. gladiata*, uma vez que em todas as doses de Pb utilizadas as sementes culminaram em uma porcentagem final de germinação maior que 85% (Figura1).

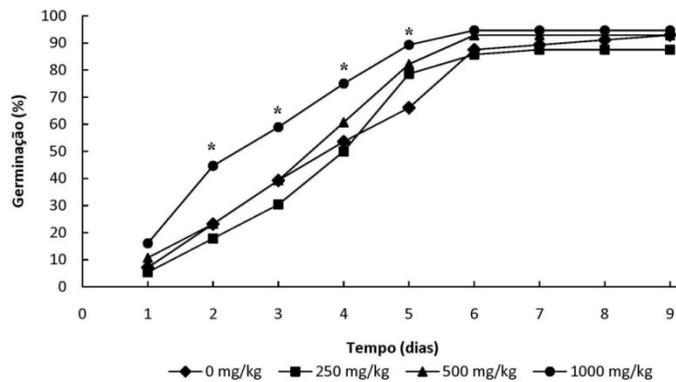


Figura 1 – Porcentagem de germinação de sementes de *Canavalia gladiata* em diferentes concentrações de Pb no solo. Médias representativas para n=14. *: diferença significativa entre tratamentos com diferentes concentrações de Pb pelo teste de Tukey a 5%.

Medidas de crescimento e nodulação

Plantas não colonizadas apresentaram uma redução significativa na altura com o incremento das doses de Pb, enquanto que a altura das plantas colonizadas não foi influenciada pela adição do metal. A massa da matéria seca de parte aérea (MSPA), a massa

da matéria seca das raízes (MSR) e o número de folhas não foram influenciados significativamente pelo aumento da concentração de Pb no solo (Tabela 1).

A massa da matéria seca de nódulos (MSN) diminuiu linearmente com o aumento do Pb no solo e a inoculação do FMA não influenciou esta variável. Foram observadas reduções da MSN superiores a 73%, independentemente se colonizadas ou não por FMA (Tabela 1).

Tabela 1 – Altura, número de folhas, massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN) de plantas de *Canavalia gladiata* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) pelo FMA *Glomus etunicatum*.

Pb (mg kg ⁻¹)	Altura (m)		N° de folhas		MSPA (g)		MSR (g)		MSN (g)	
	NM	M	NM	M	NM	M	NM	M	NM	M
0	3,48 a	3,28 a	13 a	12 a	15,06 a	14,10 a	1,36 a	1,23 a	0,41 a	0,48 a
250	3,37 a	3,48 a	13 a	13 a	11,00 a	12,03 a	1,06 a	1,30 a	0,49 a	0,32 b
500	3,23 a	3,11 a	12 a	10 a	14,10 a	11,56 a	1,33 a	1,16 a	0,20 a	0,18 a
1000	3,05 a	3,22 a	10 a	11 a	11,36 a	12,46 a	1,16 a	1,26 a	0,11 a	0,10 a
Regressão	x	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	x	x
Significância	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***

As letras representam a comparação das médias para cada medida entre os tratamentos NM e M, pelo teste de Tukey a 5% com n=3. Análise de regressão em NM e M para resposta às doses de Pb. x: regressão linear; ns: regressão não significativa. * P<0,05 e *** P<0,001.

O número de nódulos foi afetado pelo aumento da concentração de Pb no solo, seguindo um ajuste de regressão de tipo quadrático e apresentando uma redução de mais de 90% da nodulação em plantas colonizadas e não colonizadas no tratamento com 1000 mg kg⁻¹ de Pb (Figura 2).

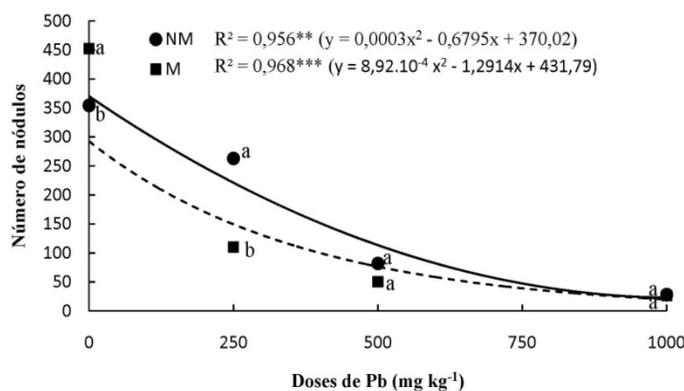


Figura 2 – Número de nódulos em raízes de plantas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M – linha tracejada) e não-micorrizadas (NM – linha contínua) em resposta ao incremento de Pb no solo. Letras diferentes: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias dos tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. R²: coeficiente de determinação, ** P<0,01; *** P<0,001.

Colonização micorrízica

Houve uma redução de aproximadamente 25% na colonização micorrízica nas plantas cultivadas nos solos com adição de Pb em relação às aquelas no solo controle (Figura 3). A partir da dose de 250 mg kg⁻¹ a resposta das demais concentrações de Pb permaneceu semelhante.

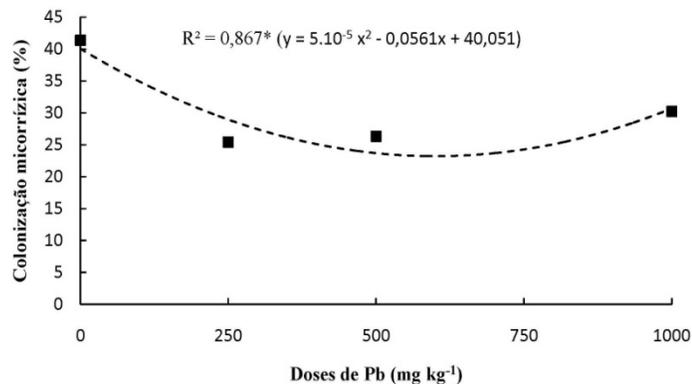


Figura 3 – Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de plantas de *Canavalia gladiata* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. R²: coeficiente de determinação, * P<0,05.

Determinações bioquímicas

O teor de nitrato aumentou linearmente com o aumento da concentração de Pb no solo em plantas não colonizadas. Assim, no solo com adição de 1000 mg kg⁻¹ de Pb as plantas apresentaram uma concentração de nitrato 47% maior que as plantas no solo controle, enquanto que em plantas colonizadas não houve variação significativa no teor deste metabólito em resposta ao aumento do Pb no solo (Figura 4).

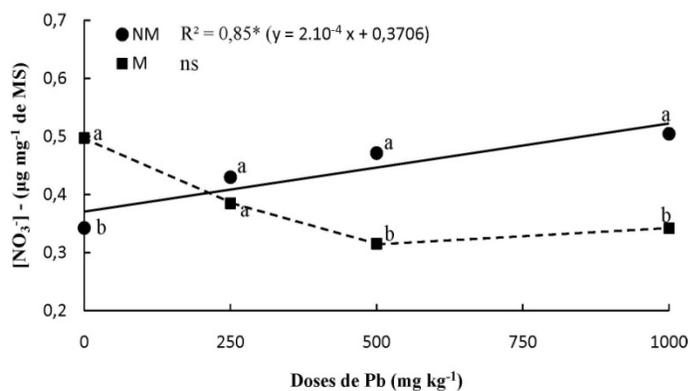


Figura 4 – Concentração de nitrato em folhas de plantas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras diferentes: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias dos tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS: matéria seca, R²: coeficiente de determinação, * P<0,05 e ns: não significativo.

A concentração do íon amônia nas folhas não variou em função do aumento da concentração de Pb no solo, mas variou entre plantas micorrizadas ou não (Figura 5), enquanto que a concentração de aminoácidos solúveis totais nas folhas não foi influenciada significativamente pelos dois fatores em estudo, inoculação de FMA e incremento de chumbo no solo (Figura 6).

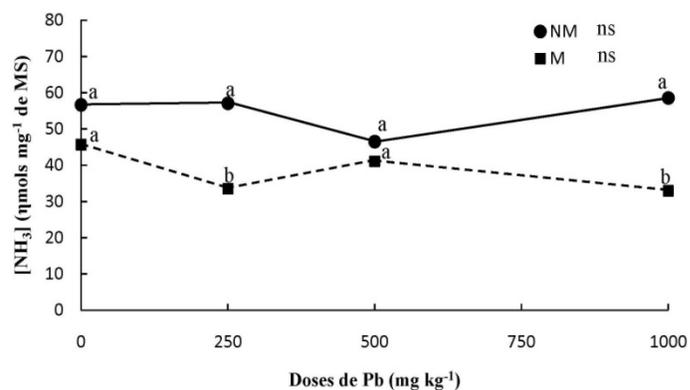


Figura 5 – Concentração de amônia livre em folhas de plantas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras diferentes: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS: matéria seca. ns: não significativo.

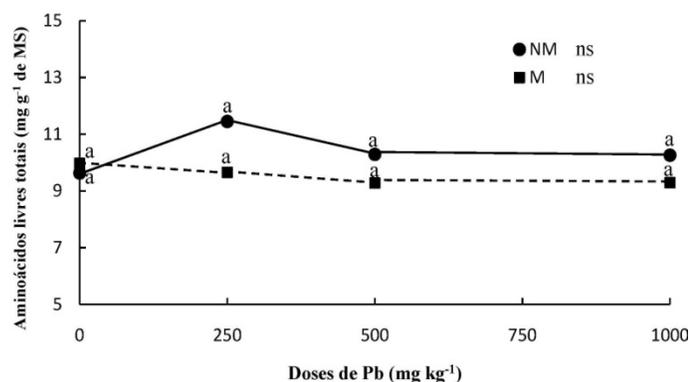


Figura 6 – Concentração total de aminoácidos solúveis livres em folhas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras diferentes: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS: matéria seca. ns: não significativo.

Em plantas não micorrizadas a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas folhas não foi influenciada significativamente pelo aumento de Pb no solo. Por outro lado, em plantas micorrizadas houve uma diminuição de TBARS em resposta ao aumento da concentração de Pb. Plantas não micorrizadas crescendo nas doses de 250 e 1000 mg kg⁻¹ de Pb apresentaram nas folhas, níveis maiores de TBARS do que plantas micorrizadas (Figura 7).

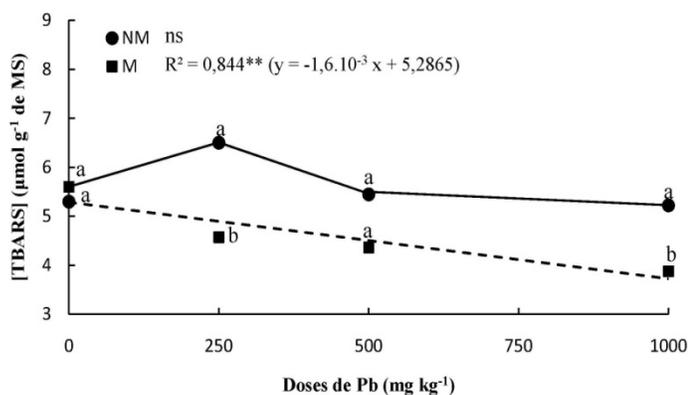


Figura 7 – Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em folhas de plantas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (M – linha contínua) pelo FMA *G. etunicatum* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras diferentes: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS: matéria seca, R²: coeficiente de determinação, ** P<0,01 e ns: não significativo.

Nutrientes e Pb

O teor de fósforo (P) na parte aérea e nas raízes foi maior em plantas associadas a FMA. Na parte aérea de plantas não micorrizadas houve uma diminuição do teor de P em função do incremento de Pb no solo, o que não foi observado em plantas micorrizadas (Tabela 2). O teor de P nas raízes aumentou com o incremento do Pb no solo em plantas não colonizadas e colonizadas por FMA (Tabela 3). Tanto na parte aérea como nas raízes houve aumento da concentração de S e em alguns tratamentos a concentração de S foi maior em plantas colonizadas (Tabelas 2 e 3). Em parte aérea de plantas não micorrizadas o teor de Fe foi reduzido de acordo com o aumento da concentração de Pb no solo, enquanto que em plantas micorrizadas houve aumento do teor de Fe até o tratamento de 500 mg kg⁻¹ e um declínio na maior dose de Pb (Tabela 2). Em raízes de plantas não micorrizadas foram observadas variações no teor de Fe em função do aumento de Pb no solo seguindo um ajuste de regressão quadrático, enquanto que em raízes de plantas colonizadas não houve variações significativas (Tabela 3). Em parte aérea de plantas não micorrizadas houve uma redução do teor de Zn em função do aumento do Pb, enquanto que em plantas micorrizadas houve um aumento de Zn com o aumento de Pb no solo, seguindo um ajuste quadrático (Tabela 2). Em raízes houve aumento do teor de Zn em função do aumento da concentração de Pb no solo, independentemente da planta estar colonizada ou não por FMA (Tabela 3).

Tabela 2 – Concentração de P (g kg⁻¹), S (g kg⁻¹), Fe (mg kg⁻¹) e Zn (mg kg⁻¹) em parte aérea de plantas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M) e não micorrizadas (NM) em solos com adição de Pb.

Pb - mg kg ⁻¹	P		S		Fe		Zn	
	NM	M	NM	M	NM	M	NM	M
0	0,99 a	0,98 a	1,60 a	1,39 a	319,33 a	171,00 b	14,09 a	10,56 b
250	0,79 b	0,97 a	1,44 b	1,79 a	195,00 a	207,33 a	10,76 a	12,93 a
500	0,88 b	1,03 a	1,69 b	2,04 a	181,66 a	296,33 a	11,27 b	14,95 a
1000	0,89 b	1,06 a	2,26 a	1,95 b	165,00 a	128,66 a	10,10 a	12,14 a
Regressão	x²	ns	x²	x²	x	x²	x	x²
Significância	*	ns	*	**	*	*	**	**

Médias representativas com n=3 e teste de Tukey a 5%. x: regressão linear, x²: regressão quadrática, ns: regressão não significativa. Nível de significância para regressões: * P<0,05; ** P<0,01.

Tabela 3 – Concentração de P (g kg^{-1}), S (g kg^{-1}), Fe (mg kg^{-1}) e Zn (mg kg^{-1}) em raízes de plantas de *C. gladiata* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) pelo FMA *G. etunicatum*.

Pb - mg kg^{-1}	P		S		Fe		Zn	
	NM	M	NM	M	NM	M	NM	M
0	1,06 a	1,28 a	5,26 a	5,53a	4623,66 a	4905,33 a	17,72 a	18,23 a
250	0,93 b	1,33 a	7,08 a	7,61 a	4755,66 a	5752,66 a	19,39 a	26,78 a
500	1,07 b	1,54 a	6,38 b	8,23 a	7333,33 a	5499,33 b	27,32 a	29,52 a
1000	1,46 a	1,55 a	8,7 a	7,64 a	5194,33 a	4818,66 a	29,47 a	33,18 a
Regressão	x	x	x	x²	x²	ns	x	x
Significância	**	*	***	**	**	ns	**	**

Médias representativas com n=3 e teste de Tukey a 5%. x: regressão linear, x²: regressão quadrática, ns: regressão não significativa. Nível de significância para regressões: * P<0,05; ** P<0,01 e ***P<0,001.

A concentração de Pb na parte aérea e nas raízes de *C. gladiata* aumentou linearmente de acordo com o aumento de Pb no solo independente da inoculação com o FMA (Figuras 8 e 9). Em parte aérea e raízes de plantas micorrizadas a concentração de Pb, nas doses de 250 e 500 mg kg^{-1} , foi aproximadamente 30% maior que em plantas não micorrizadas (Figuras 8 e 9). A distribuição de Pb nos tecidos vegetais foi predominantemente nas raízes, tanto de plantas não micorrizadas como de micorrizadas (Figura 10).

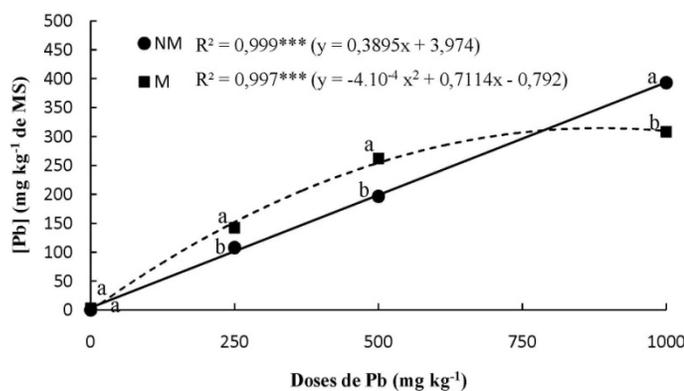


Figura 8 – Concentração de Pb em parte aérea (folhas e caules) de plantas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) pelo FMA *G. etunicatum* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras diferentes: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS – matéria seca, R²: coeficiente de determinação, *** P<0,001.

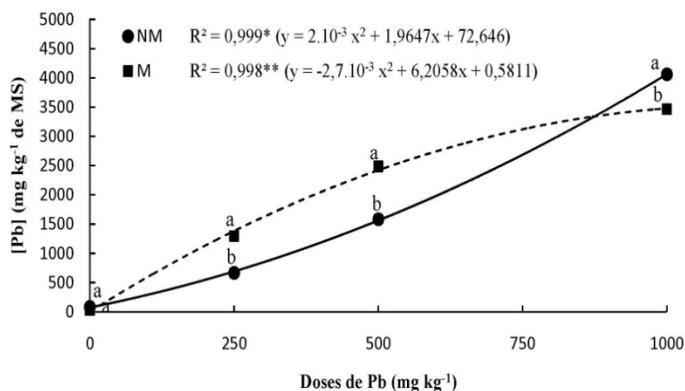


Figura 9 – Concentração de Pb em raízes de plantas de *Canavalia gladiata* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) pelo FMA *G. etunicatum* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. (Letras diferentes: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS – matéria seca, R²: coeficiente de determinação, * P<0,05; ***P<0,001).

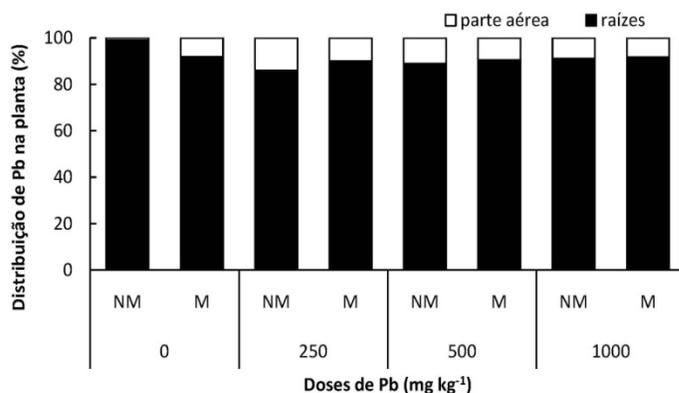


Figura 10 – Distribuição de Pb nas raízes e parte aérea de *Canavalia gladiata* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M).

DISCUSSÃO

A presença de contaminantes no solo, tal como MP, pode reduzir a capacidade de germinação de sementes devido ao efeito tóxico dos mesmos. No presente trabalho, observou-se que a germinação não foi alterada com o aumento da concentração de Pb no solo. Esse resultado está de acordo com os encontrados por outros autores que observaram que altas concentrações de Pb, Cd, Ni e Cu não inibiram a germinação das sementes de *Arabidopsis*, alface, brócolis, tomate e rabanete (Li et al., 2005; Di Salvatore et al., 2008). Entretanto,

concentrações de Pb acima de 5 mmol.L⁻¹ inibiram moderadamente a germinação de sementes de abóbora (Munzuroglu e Geckil, 2002). Esses resultados controversos podem ser explicados pela diferença de permeabilidade do tegumento das sementes de espécies diferentes como demonstrado por Wierzbicka e Obidzinska (1998), pois para que o contaminante afete a germinação ele precisa entrar na semente e prejudicar o progresso do desenvolvimento do embrião. Por exemplo, Li et al. (2005) observaram que concentrações de Cu, Pb e Zn muito inferiores às que não inibiram a germinação das sementes de *Arabidopsis thaliana* foram suficientes para inibir severamente o desenvolvimento do embrião. No caso de *C. gladiata* fica claro que o tegumento desempenhou um papel importante em conferir tolerância ao Pb nas doses utilizadas nesse experimento já que no final do acompanhamento da germinação não houve diferença entre os tratamentos.

Os MPs podem ser tóxicos ao vegetal após a germinação, visto que as células das raízes passam a estar em contato com o contaminante presente no solo. O principal efeito negativo sobre o crescimento é a redução do crescimento radicular (Delhaize e Ryan, 1995; Guo et al., 2004; Iannacone e Alvariño, 2005). Isso é observado devido ao efeito negativo do Pb sobre a organização dos microtúbulos (Samardakiewicz e Wozny, 2005) durante a mitose, prejudicando assim a divisão celular (Kozhevnikova et al., 2009). Embora o Pb, de fato, tenha efeito negativo sobre a divisão celular, isso aparentemente não ocorreu nesse experimento em nenhum dos tratamentos, uma vez que a massa da matéria seca das raízes foi aproximadamente igual em todos eles. Esses resultados indicam a relativa tolerância de *C. gladiata* às altas concentrações de Pb no solo. O Pb também afeta o desenvolvimento da parte aérea, principalmente na fase de plântula (Singh et al., 2003). Gopal e Rizvi (2008) observaram que o Pb retardou o crescimento de rabanete e reduziu a sua produção de biomassa em aproximadamente 50%, enquanto que Kopittke et al. (2007) observaram redução

de aproximadamente 10% do crescimento de caule em caupi na presença de Pb. Entretanto, geralmente o caule das plantas é menos afetado pelo Pb, uma vez que este metal fica retido preferencialmente nas raízes devido às cargas negativas da parede celular e à formação de sais insolúveis (Almeida et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, no qual o Pb ficou retido prioritariamente nas raízes, chegando a alcançar uma concentração 10 vezes maior do que o observado na parte aérea, no tratamento com a maior dose de Pb adicionada. A altura foi afetada em plantas não micorrizadas, corroborando os resultados de outros autores (Singh et al., 2003; Kopittke et al., 2007; Gopal e Rizvi, 2008). Estas características apontam esta espécie como uma planta robusta com capacidade de se desenvolver em solos contaminados com Pb.

Associações simbióticas também são relevantes, pois, quando a planta está associada a certos microorganismos do solo, ela pode ter sua nutrição mineral melhorada. No entanto, altas concentrações de Pb podem exercer efeito tóxico em microorganismos do solo como bactérias e fungos. Decréscimos na nodulação e na colonização micorrízica foram observados em caupi na presença de Zn e Cd (Al-Garni, 2006) e também em soja na presença de Pb (Andrade et al., 2004). Resultados semelhantes também foram encontrados neste estudo, no qual houve uma redução de mais de 90% na nodulação e de aproximadamente 25% na colonização micorrízica. Esses decréscimos são devidos à toxicidade do Pb sobre os microorganismos do solo onde a comunidade de rizóbios pode ser reduzida, dificultando assim a nodulação de possíveis plantas hospedeiras. No entanto, a colonização micorrízica pode ter sido prejudicada devido ao efeito deletério desse metal na germinação de esporos, prejudicando a capacidade infectiva dos simbiontes fúngicos (Andrade et al., 2004), ou também devido às altas concentrações de Pb nas estruturas celulares que podem ter afetado o crescimento das hifas no interior radicular.

As fontes de nitrogênio no solo disponíveis à planta são o nitrato e a amônia. Embora a amônia possa ser absorvida, o nitrato é a forma preferencialmente absorvida pelas plantas. O nitrato, uma vez absorvido, é reduzido a nitrito e amônia pelas enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, respectivamente, e a amônia gerada é incorporada em moléculas orgânicas pela via glutamina sintetase/glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase, também conhecida como GS/GOGAT. Sabe-se que o Pb pode reduzir ou inibir a atividade de várias enzimas, por se ligar a grupos sulfidrilas (SH) dos resíduos de aminoácido do sítio catalítico das enzimas (Van Assche e Clijsters, 1990) e assim interferir na sua atividade.

Existe pouca informação na literatura a respeito de como a via assimilatória de nitrogênio, a partir do nitrato, é alterada em resposta a MPs. O efeito do Pb é mais conhecido sobre a atividade das enzimas da via de assimilação de carbono (Van Assche e Clijsters, 1990; Wahid et al., 2007). Singh et al. (2003) observaram decréscimo de aproximadamente 68% na atividade da enzima redutase do nitrato em *Vigna radiata* submetida a estresse por Pb. Esses resultados corroboram com essa hipótese, uma vez que observou-se aumento linear do teor de nitrato foliar em resposta ao aumento de Pb no solo, sendo que plantas tratadas com 1000 mg kg⁻¹ Pb apresentaram 47% mais nitrato do que as plantas crescendo no solo controle. Entretanto, em plantas associadas a FMA não houve aumento do teor de nitrato foliar e nos tratamentos com as maiores doses de Pb (500 e 1000 mg kg⁻¹) observou-se que em plantas micorrizadas a concentração deste metabólito foi inferior à concentração encontrada em plantas não micorrizadas, sugerindo assim um efeito benéfico da associação micorrízica levando à atenuação do estresse causado pelo Pb.

A diminuição da atividade da redutase do nitrato poderia acarretar em decréscimo na concentração de amônia e assim alterar o metabolismo do nitrogênio na planta. Entretanto, isto

não foi observado nesse experimento, no qual os níveis de amônia não apresentaram variações significativas em resposta ao aumento da concentração de Pb.

O teor de aminoácidos livres totais nas folhas de *C. gladiata* não foi alterado com o aumento das doses de Pb nem com a inoculação micorrízica. Os aminoácidos, além de constituírem os monômeros fundamentais das proteínas, são metabólitos que podem ser acumulados quando a planta está submetida a diversos estresses abióticos, inclusive ao estresse por exposição a excesso de MPs (Sharma e Dietz, 2006), sendo seu acúmulo considerado indicador de estresse ou mecanismo de tolerância. Andrade et al. (2009) observaram aumento no teor de aminoácidos livres totais em folhas de *C. ensiformis* submetidas a níveis excessivos de Zn, além de verificarem que a micorrização também influenciou o conteúdo e composição de aminoácidos livres. Pelo fato de o teor de aminoácidos livres totais e amônia não terem sido alterados com o aumento da concentração de Pb nem com a inoculação de FMA, sugere-se que esta planta possui um mecanismo de regulação do metabolismo de nitrogênio na presença de Pb no solo, pois, embora a assimilação de nitrato tenha sido afetada levando a um acúmulo de nitrato nas folhas da planta, os outros metabólitos estudados relacionados ao metabolismo de nitrogênio permaneceram constantes.

É sabido que o Pb pode prejudicar a fotossíntese de maneira indireta, por inibir a atividade da enzima desidratase do ácido δ -aminolevulínico que sintetiza porfobilinogênio a partir do ácido δ -aminolevulínico na via de biossíntese da clorofila (Van Assche e Clijsters, 1990). Desta forma, pode ser gerado um excesso de espécies ativas de oxigênio (EAO), as quais têm a capacidade de degradar diversas estruturas membranosas das células, uma vez que o fluxo de elétrons da fotossíntese pode ser prejudicado, reduzindo o oxigênio a formas mais reativas. Um dos indicativos dos efeitos tóxicos das EAO é a quantidade de malondialdeído, um subproduto da peroxidação de ácidos graxos insaturados, que é determinado pela

quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) presente nos tecidos. Esse metabólito tem sido usado freqüentemente como indicador de peroxidação lipídica mediada por EAO (Apel e Hirt, 2004; Balestrasse et al., 2006; Wang et al., 2008). Embora seja evidente que os MPs são capazes de induzir a produção de EAO e aumentar os níveis de malondialdeído, isto não foi observado no presente estudo. No entanto, plantas micorrizadas apresentaram menor concentração desse metabólito nas concentrações de 250 e 500 mg kg⁻¹ de Pb no solo, sugerindo que, possivelmente, plantas micorrizadas apresentam menor estresse oxidativo. Estudos que relacionam esse tipo de estresse em plantas associadas a FMA são poucos, sendo assim difícil explorar a literatura para explicar como essa associação simbiótica pôde reduzir a peroxidação lipídica ao mesmo tempo em que aumentou o acúmulo de Pb na planta.

O P é um nutriente mineral requerido em altas concentrações, dado que existe uma grande demanda por esse elemento dentro das células. Ele é absorvido sob a forma de ortofosfato, PO₄⁻³, através de transportadores específicos na membrana celular dos pêlos radiculares. O P é um dos constituintes dos monômeros dos ácidos nucléicos e também do ATP, principal fonte de energia prontamente disponível às células. Dessa maneira, o P é um fator limitante ao crescimento e desenvolvimento vegetal uma vez que é requerido para uma ampla gama de processos metabólicos. O P é um elemento de baixa difusão no solo, formando-se uma zona de depleção de P ao redor da raiz (Bucher, 2006). A associação das plantas com FMAs pode aumentar a absorção deste nutriente, pois, quando a planta está colonizada por esses fungos a absorção de P não se limita à zona de alcance dos pêlos radiculares e nem à zona de depleção, visto que as hifas extra-radiculares se estendem além da zona de depleção da raiz, absorvendo o P do solo e transportando-o às raízes na forma de polifosfato (Bucher, 2006). Estes fosfatos absorvidos pelos fungos passam às células vegetais

através de estruturas especializadas denominadas arbúsculos, que são compostas por estruturas celulares da planta e do fungo, altamente especializadas com transportadores específicos para translocação de nutrientes entre o fungo e a planta (Parniske, 2008). Por isso, plantas micorrizadas têm maior acessibilidade ao P do solo podendo ter o seu crescimento incrementado. De modo geral, a micorrização teve influência sobre a concentração de P tanto em folhas como em raízes. O aumento do teor de P em raízes tanto de plantas não micorrizadas como de plantas micorrizadas, em resposta às diferentes concentrações de Pb, mostra que o MP não influenciou na absorção de P. No entanto, em raízes de plantas micorrizadas houve maior teor de P que em raízes de plantas não micorrizadas, como também foi demonstrado por alguns autores (Andrade et al., 2003; Stürmer, 2004), confirmando o efeito da micorriza na absorção de P. Mas, embora tenha havido aumento da concentração de P nas raízes, isto não correspondeu a um aumento de P na parte aérea, pois em plantas não colonizadas houve uma redução de aproximadamente 10% do teor de P na parte aérea entre o tratamento controle e o tratamento com a maior dose de Pb (1000 mg.kg^{-1}). Estes resultados são contrastantes com os que foram encontrados por Gopal e Rizvi (2008) que trabalharam com rabanete, crescendo em meio contaminado por Pb, e observaram que houve maior teor de P em parte aérea que em raízes. Possivelmente o Pb afetou a translocação do nutriente para a parte aérea, fazendo assim com que a concentração deste elemento tenha diminuído na parte aérea em resposta ao incremento do Pb no solo.

Os nutrientes minerais S, Fe e Zn tiveram suas concentração influenciadas pela concentração de Pb no solo. O decréscimo na concentração de Fe na parte aérea sugere que o Pb afeta o transporte deste elemento à parte aérea quando as plantas não estão micorrizadas.

Semelhantemente ao Fe, o Zn teve sua absorção aumentada em resposta ao aumento de Pb, tanto em plantas não colonizadas como em plantas colonizadas. No entanto, a translocação

do elemento à parte aérea foi maior em plantas colonizadas, enquanto que em plantas não colonizadas houve uma redução de aproximadamente 30% deste elemento. Tais diferenças entre aumento e redução de absorção e transporte de nutrientes em resposta ao aumento da concentração de Pb já foi relatado por Päivöke (2002), que sugere que o Pb pode bloquear fisicamente os canais de absorção de nutrientes. Entretanto, o Pb também pode alterar a atividade de proteínas transportadoras de tais elementos para o xilema e assim, embora haja uma alta concentração em raízes, não é possível observar tal concentração na parte aérea. Tal efeito pode ser melhorado quando as plantas estão colonizadas por FMA, como foi observado para Zn e Fe neste estudo, mostrando que a colonização por FMA é benéfica também para outros nutrientes minerais além de P.

O acúmulo de Pb foi maior em raízes, sendo que em plantas micorrizadas a retenção desse contaminante foi maior. A relação entre a colonização e a absorção/retenção do contaminante é um fator dependente da espécie de fungo utilizada, da planta hospedeira e do tipo de MP que está sendo considerado, pois a micorrização pode tanto aumentar o acúmulo de MPs como reduzi-lo (Göhre e Paszkowski, 2006). Ambos os efeitos podem ser benéficos, dependendo do ponto de vista de utilização. Para a fitoextração, é mais interessante que a planta acumule mais Pb na parte aérea quando micorrizadas, enquanto que para fitoestabilização o contaminante pode ter sua absorção aumentada, mas em contra partida, este fica retido nas raízes. Neste estudo, a concentração de Pb na parte aérea de plantas micorrizadas crescendo nos solos com adição de 250 e 500 mg kg⁻¹ de Pb foi 31% e 33% maior que em plantas não micorrizadas, respectivamente. Já nas raízes de plantas micorrizadas esse aumento na concentração de Pb foi 95% e 57% maior que em plantas não colonizadas, respectivamente, para as mesmas concentrações de Pb no solo citadas anteriormente. Esses

resultados são diferentes dos encontrados para soja sob estresse por Pb em que a micorrização provocou a redução da concentração de Pb nas plantas (Andrade et al., 2004).

As concentrações de Pb consideradas fitotóxicas estão entre 100 e 400 mg kg⁻¹ para plantas tolerantes (Malavolta, 1994), enquanto que para plantas sensíveis esses valores variam de 30 a 100 mg kg⁻¹ (Fairbrother, 1997). Dessa maneira, podemos considerar a *C. gladiata* uma planta tolerante ao Pb uma vez que a concentração de Pb na parte aérea chega ao limite da fitotoxicidade e em raízes esses valores são ultrapassados aproximadamente 10 vezes. O presente estudo também mostrou que a planta responde bem ao aumento de Pb disponível no solo, aumentando a absorção e acúmulo do metal. No entanto, a maior parte do Pb é acumulado nas raízes, sugerindo que a planta é uma boa espécie para ser utilizada como fitoestabilizadora em solos contaminados com Pb.

CONCLUSÕES

- A planta *Canavalia gladiata* possui boa tolerância ao Pb até a dose de 1000 mg kg⁻¹.
- A micorrização não influenciou o desenvolvimento de *Canavalia gladiata* em solo contaminado com Pb.
- *C. gladiata* é uma espécie de leguminosa com potencial para fitoestabilização de solos contaminados com Pb.

CAPITULO II

MICORRIZAÇÃO DE *Calopogonium mucunoides* POR *Glomus etunicatum* CONFERE TOLERÂNCIA AO CHUMBO

INTRODUÇÃO

A contaminação de solos por metais pesados (MPs) tem aumentado drasticamente em função das atividades antrópicas, principalmente a mineração, os esgotos industriais, a utilização de lodo de esgoto e a aplicação de fertilizantes e pesticidas no ambiente agrícola (Malavolta, 1994). O conteúdo natural de Pb no solo depende da composição mineralógica da rocha mãe que, por meio do intemperismo, pode liberar este metal ao solo.

O acúmulo de MPs no solo não só contribui para a redução da capacidade produtiva das culturas, mas também pode afetar indiretamente a saúde humana e animal (Freitas et al., 2009). O Pb é um MP pouco solúvel que ocorre na solução do solo principalmente como Pb^{+2} , embora o estado de oxidação Pb^{+4} também possa ser encontrado, e que ainda pode formar vários minerais de alta insolubilidade.

A calagem é uma prática agrícola que pode reduzir a solubilidade do Pb no solo por aumentar o pH e é muito usada em solos ácidos onde existe uma maior tendência em haver Pb prontamente disponível à absorção (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Embora o Pb ocorra naturalmente nos vegetais, ainda não foi demonstrado nenhum papel essencial desse metal no metabolismo. Seu principal efeito de toxicidade visual sobre o desenvolvimento vegetal é a redução de crescimento (Bekiaroglou e Karataglis, 2002; Sharma e Dubey, 2005; Gopal e Rizvi, 2008; Han et al., 2008).

Os vegetais possuem diferentes respostas de tolerância às altas concentrações de Pb no meio de crescimento, sendo que plantas que acumulam um teor de Pb igual ou maior a 1000

mg kg⁻¹ de matéria seca são consideradas hiperacumuladoras de Pb. As plantas hiperacumuladoras são de interesse em programas de fitorremediação, em que são utilizadas plantas tolerantes ao contaminante para absorvê-lo e acumulá-lo em seus tecidos (Salt et al., 1998; Meagher, 2000; Gratão et al., 2005; Peuke e Rennenberg, 2005). As plantas que possuem capacidade de hiperacumular MPs geralmente possuem um sistema radicular pequeno, que não penetra profundamente no solo, além de baixa e lenta produção de biomassa (Arrigada et al., 2005), características que não são desejadas à fitorremediação. No entanto, as plantas hiperacumuladoras podem ser utilizadas em estudos de melhoramento genético e para transgenia dos caracteres que lhes conferem a tolerância.

Associações simbióticas são de grande relevância no que diz respeito à tolerância dos vegetais ao Pb. Em leguminosas, a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio proporciona a utilização do N₂ e incrementa o crescimento, enquanto que a associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode conferir melhoria no crescimento aumentando a absorção de P e contribuem para a tolerância a MPs. Segundo Al-Garni (2006) a inoculação dupla com rizóbios e FMA conferiu maior tolerância e estimulou o crescimento de caupi sob estresse por Zn e Cd.

Os FMAs são muito conhecidos por aumentarem a absorção e utilização de P pelas plantas associadas (Chen et al., 2005; Ma et al., 2006), mobilizando do P que normalmente está fortemente adsorvido às partículas do solo (Bucher, 2006). A colonização micorrízica pode tanto aumentar a capacidade de absorção de MPs pelas plantas (Chen et al., 2005; Andrade et al., 2008; Soares e Siqueira, 2008) como reduzir a absorção dos mesmos (Andrade et al., 2004; Ma et al., 2006). Embora diversos trabalhos tenham sido publicados relatando os efeitos benéficos da associação com FMAs em solos com altas concentrações de metais (Khan et al., 2000; Arrigada et al., 2005; Rabie, 2005), sabe-se que a contaminação por Pb pode

reduzir a colonização micorrízica em diversas espécies (Andrade et al., 2004; Wong et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do FMA *Glomus etunicatum* e da adição de Pb sobre o crescimento e alguns aspectos do metabolismo de plantas de *Calopogonium mucunoides* (calopogônio), visando avaliar se essa espécie possui potencial como fitorremediadora.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (sem inóculo e com inóculo de FMA e adição de quatro concentrações de Pb no solo: 0, 250, 500 e 100 mg kg⁻¹), com sete repetições para cada tratamento.

Preparo do solo, inóculo micorrízico e cultivo das plantas

Foi utilizado um solo do tipo latossolo vermelho-amarelo de textura argilosa (tabela 1) e uma amostra desse solo foi esterilizada em autoclave com o fim de eliminar os possíveis propágulos infectivos de FMA e posteriormente foi acondicionada em vasos plásticos com dois litros de capacidade. Cada vaso recebeu a adição de Pb, sob a forma de solução aquosa de acetato de chumbo, nas concentrações determinadas para cada tratamento (0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹) e foi deixado em repouso para estabilização por aproximadamente 15 dias.

Foi utilizado inóculo misto do FMA *Glomus etunicatum* contendo areia, solo com esporos, hifas e raízes colonizadas de *Brachiaria brizantha*, e a cada vaso foram adicionados aproximadamente 2700 esporos de *G. etunicatum*. A inoculação do FMA foi realizada imediatamente antes da semeadura, em covas com aproximadamente 3 cm de profundidade.

Antes do plantio, as sementes de *C. mucunoides* foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 25% por 10 minutos, a seguir, imersas em suspensão de rizóbios e então semeadas quatro sementes por vaso. Após a germinação foi feito o desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

As plantas cresceram em casa de vegetação por aproximadamente 90 dias e das sete plantas (repetições) de cada tratamento, três repetições foram utilizadas para medidas de crescimento e quatro repetições foram utilizadas para as determinações bioquímicas e as raízes das mesmas utilizadas para avaliar a taxa de colonização micorrízica.

Tabela 1 – Características químicas do solo após a adição de Pb.

Pb (mg kg ⁻¹)	pH	V %	M.O. g dm ⁻³	P mg dm ⁻³	mmolc dm ⁻³				mg dm ⁻³					
					K	Ca	Mg	H+Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Pb
0	5,8	65	15	25	3,0	30	5	20	0,16	3,4	7	11,9	0,9	0,61
250	5,8	60	16	21	2,9	26	5	22	0,18	3,8	9	6,7	0,6	126
500	5,8	63	15	21	2,9	26	5	20	0,17	3,6	8	6,0	0,7	268
1000	5,7	63	17	23	2,8	26	5	20	0,16	3,8	8	9,2	0,7	520

Medidas de crescimento e avaliação da nodulação e da colonização micorrízica

Foram realizadas as seguintes medidas de crescimento: altura, área foliar, número de folhas, massa da matéria seca da parte aérea, das raízes e dos nódulos. A taxa de nodulação foi determinada pela contagem do número de nódulos; as raízes foram clareadas de acordo com o método proposto por Phillips e Hayman (1970) e a colonização micorrízica foi determinada pelo método proposto por Giovanetti e Mosse (1980), em microscópio óptico com lente objetiva de 40x, observando 10 campos para cada segmento de raiz de aproximadamente um centímetro de comprimento cada.

Determinações analíticas e bioquímicas

As concentrações de P, Ca, S, Fe e Pb em raízes e em partes aéreas foram determinadas após digestão nítrico-perclórica de acordo com Abreu et al. (2000) e analisado por ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy).

A determinação de peroxidação lipídica foi realizada pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pelo método descrito por Calmak e Horst (1991).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, análise de regressão, e teste de Tukey para a comparação de médias. Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno $(x/100)^{1/2}$, e os dados referentes a contagem foram transformados em $\log(x+1)$, previamente à análise estatística.

RESULTADOS

Medidas de crescimento

A altura das plantas de *C. mucunoides* não associadas ao FMA reduziu linearmente em função do incremento das doses de Pb no solo, enquanto que em plantas micorrizadas não observou-se tal efeito. Plantas não micorrizadas apresentaram uma redução no crescimento de aproximadamente 90% na maior dose de Pb utilizada no experimento (1000 mg kg^{-1}) em relação às plantas crescendo no solo controle, sem adição de Pb. Em todos os tratamentos com Pb as plantas micorrizadas apresentaram médias significativamente maiores que as não micorrizadas. Plantas micorrizadas crescendo no solo com a maior concentração de Pb apresentaram altura 20 vezes maior do que as plantas não micorrizadas (Figura 1).

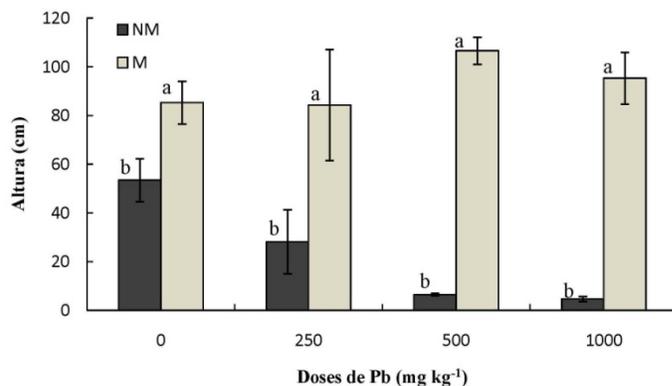


Figura 1 – Altura de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Médias representativas com n=3. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb.

A área foliar de plantas micorrizadas foi significativamente maior do que a de plantas não micorrizadas em todas as concentrações de Pb no solo (Figura 2).

A área foliar de plantas não micorrizadas reduziu aproximadamente 90% no tratamento com a maior concentração de Pb no solo, em relação às plantas controle, enquanto que em plantas micorrizadas não foi observada redução. Inclusive, a adição de Pb na concentração de 250 mg kg⁻¹ pareceu estimular o crescimento de plantas micorrizadas, pois a área foliar deste tratamento foi aproximadamente 30% maior que a observada nos demais tratamentos, inclusive no tratamento controle. A análise de regressão não apresentou ajuste para esse parâmetro tanto nas plantas micorrizadas como nas não micorrizadas.

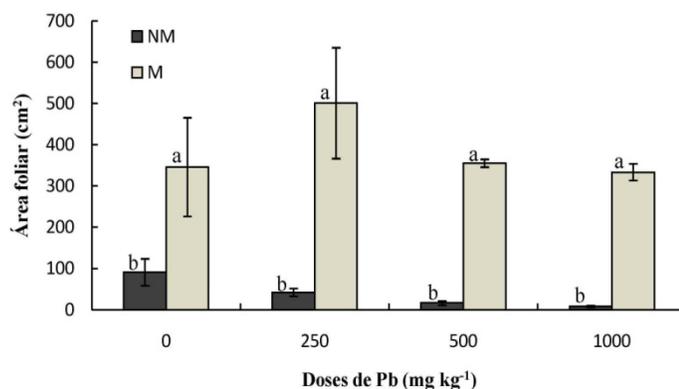


Figura 2 – Área foliar de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) em resposta a doses crescentes de Pb. Médias representativas com n=3. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb.

Uma redução de aproximadamente 66% no número de folhas foi observada em plantas não micorrizadas em função do incremento da concentração de Pb no solo, enquanto que em plantas micorrizadas o número de folhas foi aproximadamente constante, exceto no tratamento com 250 mg kg⁻¹ de Pb no solo que, novamente, pareceu estimular o crescimento, aumentando a produção de folhas em aproximadamente 30%. As plantas micorrizadas apresentaram maior número de folhas que plantas não micorrizadas independentemente da concentração de Pb no solo, mas para a resposta desta variável em função do Pb a regressão não foi significativa (Figura 3).

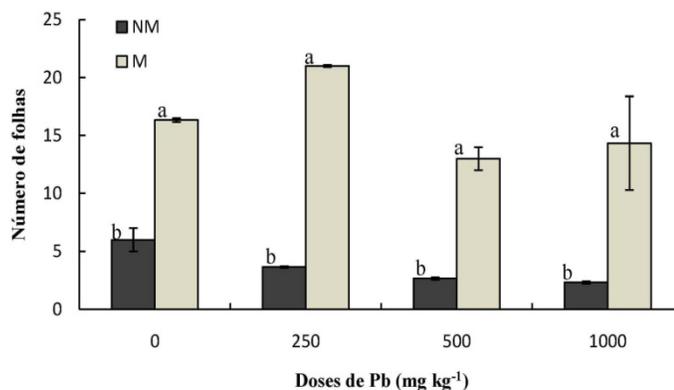


Figura 3 – Número de folhas de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) em resposta a doses crescentes de Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb.

Em plantas não micorrizadas o incremento da concentração de Pb no solo causou uma redução de 88% na massa da matéria seca da parte aérea (MSPA). Plantas micorrizadas apresentaram MSPA significativamente maior do que a de plantas não micorrizadas e somente em solos com concentrações de Pb maiores que 250 mg kg⁻¹ houve redução da MSPA, havendo 20% de redução da MSPA em plantas micorrizadas crescendo no solo com adição de 1000 mg kg⁻¹ (Figura 4).

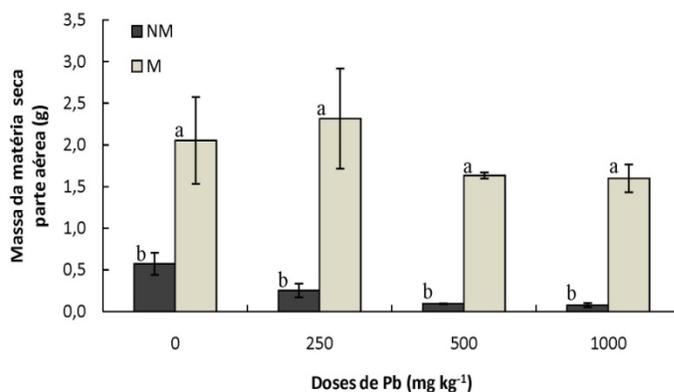


Figura 4 – Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) em resposta a doses crescentes de Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb.

A massa da matéria seca de raízes (MSR) reduziu 78% em plantas não micorrizadas no tratamento com maior concentração de Pb (1000 mg kg⁻¹), enquanto que em plantas micorrizadas houve estímulo da produção de biomassa de raízes quando a planta cresceu em solo contaminado com 250 mg kg⁻¹ (Figura 5). Concentrações maiores deste elemento causaram diminuição na produção de biomassa da raiz, reduzindo até 27% na maior concentração de Pb adicionada ao solo. Como no caso das medidas anteriores, a MSR foi significativamente maior em plantas micorrizadas do que em plantas não micorrizadas, e não houve ajuste na análise de regressão tanto para NM como para M.

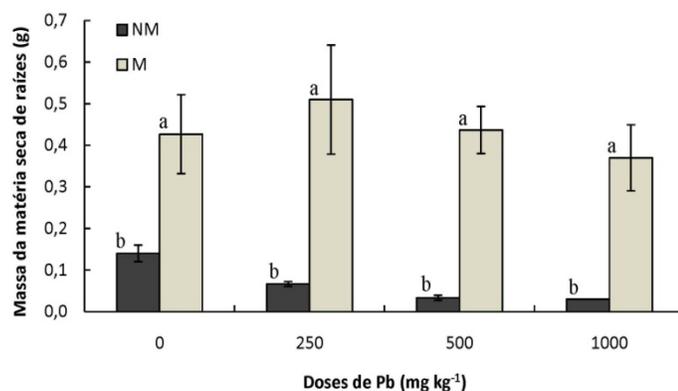


Figura 5 – Massa da matéria seca das raízes (MSR) de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) em resposta a doses crescentes de Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb.

Curiosamente, as plantas que não receberam inóculo de FMA não apresentaram formação de nódulos radiculares em nenhum dos tratamentos com Pb; somente as plantas que receberam o inóculo de FMA nodularam. A massa da matéria seca de nódulos reduziu 40% e o número de nódulos reduziu pouco mais de 50% no tratamento com a maior dose de Pb em comparação com o tratamento controle (Figura 6).

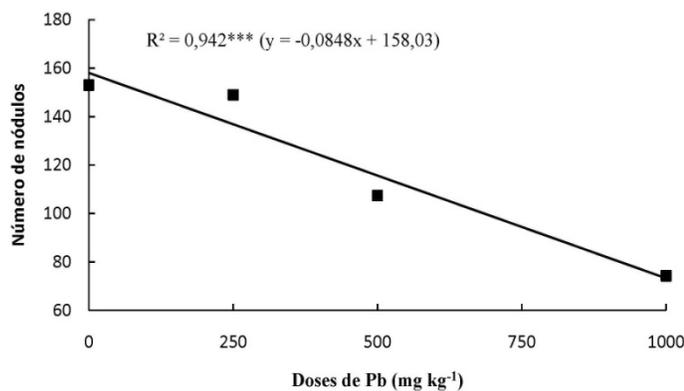


Figura 6 – Formação de nódulos em raízes de plantas de *Calopogonium mucunoides* micorrizadas (M) em resposta a doses crescentes de Pb. Médias representativas com n=7, R²: coeficiente de determinação, *** P < 0,001.

A colonização micorrizica foi reduzida em aproximadamente 30% em resposta ao incremento das doses de Pb no solo e raízes de plantas que não receberam inóculo de FMA não apresentaram estruturas típicas da associação micorrizica (Figura 7).

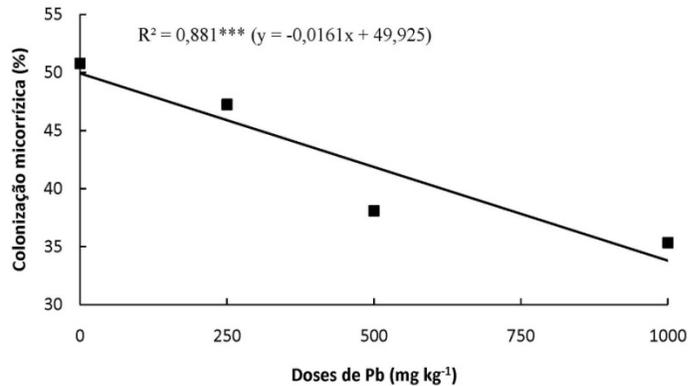


Figura 7 – Colonização micorrizica (%) em plantas de *Calopogonium mucunoides* em resposta a doses crescentes de Pb. Médias representativas com n=4, R²: coeficiente de determinação, *** P < 0,001.

Peroxidação lipídica

A concentração de malondialdeído (MDA) é representada pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nas folhas a concentração de MDA aumentou em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo em plantas não micorrizadas, seguindo um ajuste quadrático e as plantas micorrizadas apresentaram concentração de MDA constante em função do aumento do Pb com análise de regressão não significativa (Figura 8). Plantas não associadas a FMA apresentaram concentrações foliares de MDA maiores que plantas micorrizadas nos tratamentos com doses de 500 e 1000 mg kg⁻¹ de Pb.

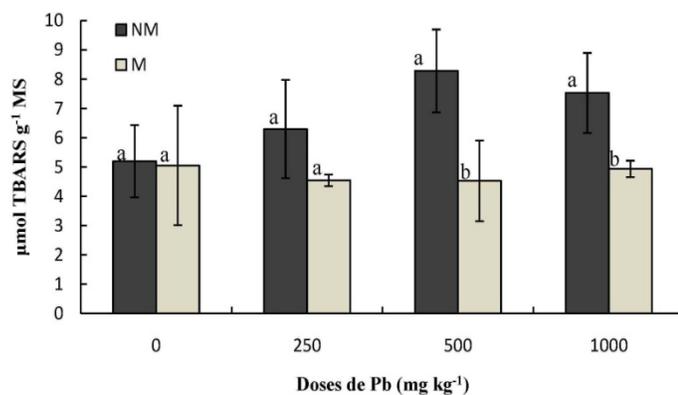


Figura 8 – Peroxidação lipídica, expressa como concentração de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), em folhas de plantas de *Calopogonio mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M) em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb.

Nutrição mineral

Plantas não micorrizadas apresentaram, na parte aérea, concentração e conteúdo de P muito inferiores aos de plantas micorrizadas (Tabela 2). A concentração e o conteúdo de P na parte aérea de plantas não micorrizadas não teve análise de regressão significativa, enquanto que em plantas micorrizadas houve um ajuste linear com o aumento da concentração de Pb no solo. Em raízes de plantas não micorrizadas a concentração e conteúdo de P não se ajustaram pela análise de regressão realizada, enquanto que em raízes das plantas micorrizadas a concentração de P se ajustou a uma regressão linear e o conteúdo se ajustou a uma regressão quadrática. De maneira geral, na parte aérea, o conteúdo de P em plantas micorrizadas foi 25 vezes maior que em plantas não micorrizadas e a concentração de P foi aproximadamente três vezes maior. A mesma tendência foi observada nas raízes, sendo que em plantas micorrizadas, de um modo geral, o conteúdo de P foi aproximadamente 18 vezes maior e a concentração foi aproximadamente 3 vezes maior do que em raízes de plantas não micorrizadas.

Tabela 2 – Conteúdo de P (mg planta⁻¹) e concentração de P (g kg⁻¹) em parte aérea e raízes de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M).

Pb - mg kg ⁻¹	Concentração de P				Conteúdo de P			
	Parte aérea		Raízes		Parte aérea		Raízes	
	NM	M	NM	M	NM	M	NM	M
0	0,69 b	2,28 a	0,8 b	1,86 a	0,40 b	4,60 a	0,11 b	0,77 a
250	0,72 b	1,98 a	0,83 b	1,73 a	0,18 b	4,48 a	0,06 b	0,86 a
500	0,63 b	2,56 a	0,67 b	2,71 a	0,06 b	4,19 a	0,02 b	1,18 a
1000	0,72 b	2,52 a	0,67 b	2,50 a	0,06 b	4,00 a	0,02 b	0,93 a
Regressão	ns	x	ns	x	ns	x	ns	x ²
Significância	ns	*	ns	***	ns	*	ns	**

Letras comparam as médias dos tratamentos NM e M pelo teste de Tukey a 5% dentro de cada dose de Pb. Regressão não significativa (ns), regressão linear (x) e regressão quadrática (x²). Nível de significância para regressão: * P < 0,05; ** P < 0,01.

A concentração de Ca diminuiu linearmente em função do aumento das doses de Pb somente em raízes de plantas não micorrizadas, enquanto em raízes de plantas micorrizadas e em parte aérea de plantas não micorrizadas e micorrizadas não houve ajuste significativo (Tabelas 3 e 4).

Em parte aérea de plantas não micorrizadas e micorrizadas houve aumento do teor de S em resposta ao aumento das doses de Pb no solo, seguindo ajuste quadrático em ambas. As plantas micorrizadas apresentaram maior concentração de S em parte aérea que as plantas não micorrizadas. Já em raízes a dose de 250 mg kg⁻¹ de Pb estimulou o acúmulo de S em plantas não micorrizadas e micorrizadas e nas demais doses de Pb (500 e 1000 mg kg⁻¹) o acúmulo deste elemento foi reduzido. A análise de regressão não foi significativa em raízes de plantas micorrizadas e não micorrizadas. As raízes de todas as plantas micorrizadas apresentaram maior concentração de S que as raízes de plantas não micorrizadas (Tabelas 3 e 4)

Em plantas não micorrizadas, a adição de 1000 mg kg⁻¹ de Pb no solo causou uma redução de 90% no teor de Fe na parte aérea. Já em plantas micorrizadas na dose de 250 mg kg⁻¹ observamos que a concentração de Fe aumentou, enquanto que nas demais doses o teor de Fe diminuiu, seguindo um modelo de ajuste quadrático. Plantas micorrizadas apresentaram maior teor de Fe que plantas não micorrizadas (Figuras 3 e 4).

Em raízes de plantas não micorrizadas o Pb parece ter estimulado o acúmulo de Fe, pois houve um aumento linear do teor de Fe em resposta ao aumento das doses de Pb no solo, enquanto que em raízes de plantas micorrizadas houve uma diminuição no teor de Fe na dose de 250 mg kg⁻¹ de Pb e nas demais doses observamos aumento do teor de Fe, não havendo ajuste na análise de regressão. Em todos os tratamentos de Pb o teor de Fe foi maior em plantas não micorrizadas que em plantas micorrizadas (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 – Concentração de Ca (g kg⁻¹), S (g kg⁻¹) e Fe (mg kg⁻¹) em parte aérea de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M).

Pb - mg kg ⁻¹	Ca		S		Fe	
	NM	M	NM	M	NM	M
0	12,66 a	15,26 a	1,62 b	2,38 a	451,85 a	265,52 a
250	13,84 b	17,67 a	2,00 b	2,79 a	305,57 b	594,38 a
500	15,62 a	16,04 a	2,65 b	3,21 a	75,16 b	551,68 a
1000	15,03 a	15,42 a	2,38 b	2,95 a	49,88 b	410,38 a
Regressão	ns	ns	x ²	x ²	x	x ²
Significância	ns	ns	*	*	**	*

Letras comparam as médias dos tratamentos NM e M pelo teste de Tukey a 5% dentro de cada dose de Pb. Regressão não significativa (ns), regressão linear (x) e regressão quadrática (x²). Nível de significância para regressão: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Tabela 4 – Concentração de Ca (g kg⁻¹), S (g kg⁻¹) e Fe (mg kg⁻¹) em raízes de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M).

Pb - mg kg ⁻¹	Ca		S		Fe	
	NM	M	NM	M	NM	M
0	8,76 a	8,01 a	5,45 b	9,06 a	4085,16 a	5151,35 a
250	8,39 a	6,68 a	6,15 b	10,04 a	7528,82 a	3980,24 b
500	6,45 a	6,18 a	4,32 b	9,23 a	11281,4 a	4352,24 b
1000	5,63 a	6,02 a	4,70 b	7,86 a	13408,8 a	6298,51 b
Regressão	x	ns	ns	ns	x	ns
Significância	**	ns	ns	ns	***	ns

Letras comparam as médias dos tratamentos NM e M pelo teste de Tukey a 5% dentro de cada dose de Pb. Regressão não significativa (ns), regressão linear (x). Nível de significância para regressão: ** P < 0,01; *** P < 0,001.

As plantas não micorrizadas concentraram mais Pb na parte aérea que plantas micorrizadas, na dose de 1000 mg kg⁻¹. Até a dose de 500 mg kg⁻¹ plantas não micorrizadas e micorrizadas não diferiram nas concentrações de Pb absorvidas. A concentração de Pb, em parte aérea, de plantas não micorrizadas seguiram um ajuste linear enquanto que em plantas micorrizadas o ajuste foi quadrático (Figura 9).

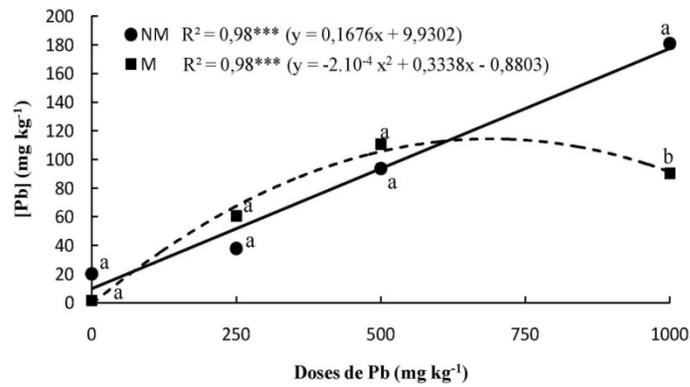


Figura 9 – Concentração de Pb em parte aérea de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM e linha contínua) e micorrizadas (M e linha tracejada). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Regressão linear para NM e quadrática para M. Nível de significância para a regressão: *** P < 0,001.

Em raízes de plantas não micorrizadas houve um aumento linear da concentração de Pb, enquanto que em plantas micorrizadas houve um ajuste quadrático. A concentração de Pb diferiu entre os tratamentos NM e M somente na dose de 500 mg kg⁻¹ (Figura 10).

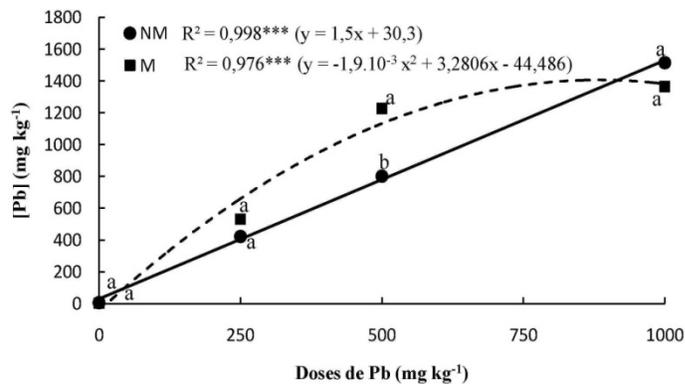


Figura 10 – Concentração de Pb em raízes de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM e linha contínua) e micorrizadas (M e linha tracejada). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Regressão linear para NM e quadrática para M. Nível de significância para a regressão: *** P < 0,001.

O conteúdo de Pb na parte aérea de plantas não micorrizadas não foi influenciado significativamente pelo incremento das doses de Pb no solo, enquanto que em plantas micorrizadas o conteúdo de Pb aumentou seguindo um ajuste quadrático em resposta ao

aumento da concentração de Pb. No geral, em plantas micorrizadas o acúmulo de Pb foi muito maior que em plantas não micorrizadas (Figura 11).

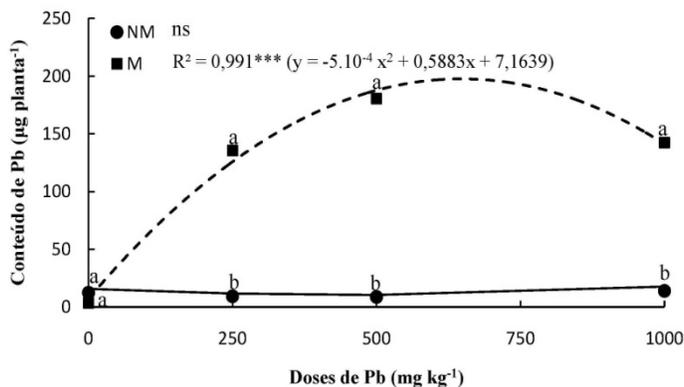


Figura 11 – Conteúdo de Pb em parte aérea de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM e linha contínua) e micorrizadas (M e linha tracejada). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Regressão não significativa (ns). Nível de significância para a regressão: *** P < 0,001.

O conteúdo de Pb em raízes de plantas não micorrizadas não foi influenciado pelo aumento das doses de Pb, enquanto que nas raízes de plantas micorrizadas o conteúdo de Pb aumentou seguindo um ajuste de tipo quadrático. Em plantas micorrizadas o acúmulo de Pb foi muito maior que em plantas não micorrizadas, sendo que no tratamento com dose de 500 mg kg⁻¹ de Pb o acúmulo foi superior a 20 vezes ao conteúdo de plantas não micorrizadas (Figura 12).

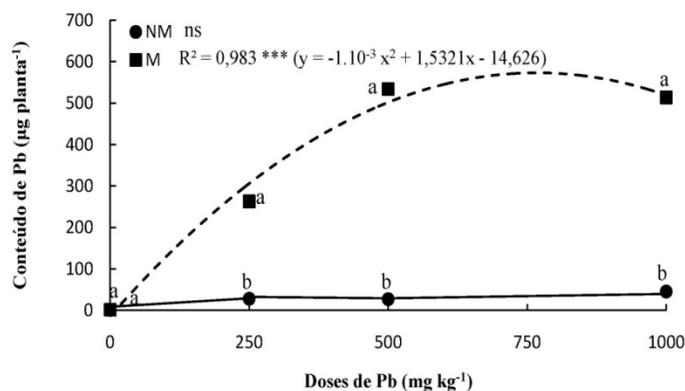


Figura 12 – Conteúdo de Pb em raízes de plantas de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM e linha contínua) e micorrizadas (M e linha tracejada). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Regressão não significativa (ns). Nível de significância para a regressão: *** P < 0,001.

O Pb ficou retido principalmente nas raízes das plantas, exceto no tratamento controle, pois houve uma pequena contaminação de Pb no solo deste tratamento. Isso era esperado, pois quando as concentrações de Pb no solo são baixas a planta é capaz de transportá-lo com mais eficiência (Figura 13).

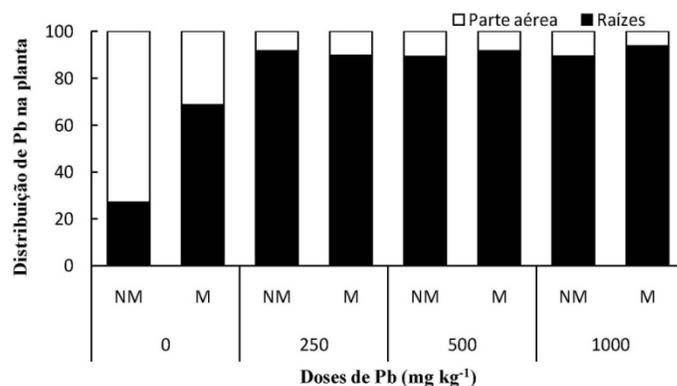


Figura 13 – Distribuição de Pb nas raízes e órgãos aéreos de *Calopogonium mucunoides* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M).

DISCUSSÃO

Os efeitos deletérios que os MPs podem causar no crescimento e desenvolvimento vegetal são diversos, variando desde alterações no metabolismo até no nível de expressão gênica. Entretanto, quando o vegetal está associado a FMAs estes efeitos negativos podem ser

atenuados devido à imobilização do metal nas estruturas fúngicas, melhoria do estado nutricional da planta ou a mudanças na fisiologia da planta (Göhre e Paszkowski, 2006). Neste estudo, podemos observar o quanto foi benéfica a inoculação do FMA *Glomus etunicatum* para o crescimento de calopogônio, o que indica a alta dependência micorrízica desta espécie. Em todos os parâmetros de crescimento utilizados para avaliar o efeito tóxico do Pb, as plantas micorrizadas mostraram maior produção de biomassa que as não micorrizadas. Já é bem conhecido que a associação das plantas com FMAs melhora o desempenho dos vegetais crescendo em solos contaminados com MPs (Gaur e Adholeya, 2004). Plantas de *Canavalia ensiformis*, cultivadas em solo com concentrações crescentes de Zn, apresentaram melhor crescimento quando associadas a FMAs, o que foi relacionado ao melhor estado nutricional e a mudanças na fisiologia da planta (Andrade et al., 2009).

Em um experimento com trigo e feijão utilizando plantas micorrizadas e não micorrizadas crescendo em solo contaminado com Cu, Pb, Zn e Cd, Rabie (2005) observou que as plantas micorrizadas apresentaram maior produção de biomassa. Sudova e Vosatka (2007) também concluíram que a inoculação com o FMA *Glomus intraradices* de diferentes estirpes resultou em maior tolerância e maior produção de biomassa em plantas de milho submetidas a estresse por Pb. Todas estas informações corroboram com os dados obtidos neste estudo, em que plantas micorrizadas tiveram um melhor desempenho, tanto no solo controle como no solo contaminado com Pb, apresentando em média 7,5 vezes maior produção de biomassa na parte aérea e aproximadamente 6 vezes mais massa de raízes que plantas não micorrizadas, confirmando assim o incremento da produção de biomassa em função da associação micorrízica, mesmo quando há estresse por Pb. Tal melhora no crescimento pode ser atribuído ao fato das plantas micorrizadas possuírem um melhor suprimento de nutrientes.

Os MPs não são tóxicos somente às plantas, os microrganismos também são prejudicados pelo estresse causado pelo excesso de metais e elementos potencialmente tóxicos no solo. A população de microrganismos pode ser significativamente reduzida quando existe uma concentração excessiva de MPs livres no solo e, desta forma, as associações simbióticas entre planta e microrganismos podem ser prejudicadas. Neste estudo observou-se que plantas não micorrizadas não foram capazes de produzir nódulos radiculares nem mesmo no tratamento controle, sem adição de Pb. Entretanto, plantas micorrizadas nodularam abundantemente, embora tenha havido redução da nodulação de acordo com o aumento das doses de Pb no solo.

Alguns autores relatam que a presença de FMA pode melhorar a capacidade de nodulação das leguminosas (Andrade et al., 2004; Barea et al., 2005) e parece que a ausência de nodulação pode estar associada ao baixo suprimento de nutrientes, principalmente de P, pois os nódulos constituem um local de alta demanda por ATP, molécula rica em P, necessária à fixação biológica de nitrogênio (Jesus et al., 2005). Desta maneira, podemos sugerir que a falta de nodulação neste experimento tenha sido em função baixa absorção de P pelas plantas não micorrizadas, que foi aproximadamente 20 vezes menor que em plantas micorrizadas.

A colonização micorrízica também foi afetada pelas doses de Pb que acarretou um decréscimo linear de 30% em plantas crescidas no solo com adição de 1000 mg kg^{-1} . Sabe-se que os MPs podem prejudicar o processo de germinação de esporos, como demonstrado por Göhre e Paszkowski (2006) que, realizando ensaios *in vitro*, observaram que altas concentrações dos metais Zn, Pb e Cd inibiram completamente a germinação de esporos fúngicos. O Pb também pode reduzir a colonização micorrízica por reduzir o desenvolvimento do FMA no solo (Arrigada et al., 2005). Outro fator que também pode influenciar a colonização é a concentração interna do MP, que pode impedir o crescimento da hifa no córtex

radicular quando a planta está com uma concentração elevada do contaminante dentro de suas células.

Vários processos metabólicos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e a respiração celular e a fotossíntese são os processos mais conhecidos que geram ERO (Asada, 2006). No entanto, estresses ambientais podem desequilibrar esta produção normal de ERO e levar à produção excessiva destes compostos. Os MPs estão envolvidos em diferentes meios de geração de ERO dentro das células e assim podem causar estresse oxidativo (Cardoso et al., 2005; Dey et al., 2007; Pompeu et al., 2008). O Pb interrompe o fluxo de elétrons na fotossíntese e desta forma leva à produção de superóxido e oxigênio singleto (Asada e Takahashi, 1987), que desencadeiam a produção de hidroxilas.

Uma maneira de avaliar o efeito tóxico dos MPs é determinando a concentração de malondialdeído (MDA), que é um produto da peroxidação de ácidos graxos insaturados. A micorrização pareceu atenuar a geração excessiva de ERO dado que os níveis de TBARS em folhas foram constantes em todas as doses de Pb utilizadas e, em contrapartida, nas folhas das plantas não micorrizadas parece ter ocorrido uma maior produção de TBARS em resposta ao Pb. O Pb estimulou a produção de TBARS em plântulas de trigo submetidas a doses de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrato de chumbo (Dey et al., 2007). Segundo esses autores o aumento dos níveis de MDA nos tecidos da planta pode ser um indicativo da prevalência do estresse oxidativo e talvez um dos mecanismos pelo qual o Pb exerce sua toxicidade. Em experimento com mudas de tomate, o Pb causou aumento da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas, o que foi relacionado à indução da geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Wang et al., 2008). Desta maneira, os níveis de MDA podem ser utilizados como bioindicadores confiáveis de estresse oxidativo.

Os MPs também podem interferir na absorção e no transporte de nutrientes essenciais e desta forma alterar o estado nutricional da planta. O Fe é um micronutriente essencial aos organismos vivos uma vez que é constituinte de centros redox de proteínas essenciais à fotossíntese e à respiração celular (Gross et al., 2003). Redução na absorção e transporte de P e Fe sob estresse por Cu foi observado em *Rumex japonicus* (Ke et al., 2007). De fato, no presente experimento foram encontrados resultados semelhantes em plantas não micorrizadas, que tiveram a concentração destes dois elementos reduzida na parte aérea e aumentada nas raízes pelo aumento da concentração de Pb no solo. Por outro lado, em plantas micorrizadas o conteúdo total de P aumentou significativamente em relação às não micorrizadas.

O S, que está presente como grupo tiol em vários compostos orgânicos e possui função bem relatada contra o estresse ocasionado por MPs (Stolt et al., 2003), teve seu teor reduzido sutilmente nas raízes de plantas não micorrizadas e micorrizadas, enquanto que na parte aérea a concentração deste elemento aumentou em resposta às doses de Pb. A maior concentração de S em parte aérea de plantas micorrizadas pode ser um indicativo de que a micorrização favoreceu o acúmulo deste elemento e ele pode estar relacionado com o aumento da tolerância ao Pb nessa planta.

O Ca é um importante componente sinalizador envolvido na sinalização de estresses bióticos e abióticos e alterações em seu conteúdo têm sido associadas à toxicidade por Cd, Zn, Cu e Al (Kinraide et al., 2004). Há pouca literatura disponível sobre o efeito do Pb no teor de Ca na planta, no entanto, os resultados do presente estudo corroboram os de Andrade et al. (2003) que afirmam que o Pb não causou redução do teor de Ca em plantas associadas ou não a FMAs. O Pb talvez não esteja envolvido no mecanismo de inibição dos transportadores de Ca, que pode levar à redução da entrada deste elemento nas células, como foi relatado por Antosiewicz e Hennig (2004) e Wojas et al. (2007) e isso pode ser uma característica

diferencial de *C. mucunoides*. De uma maneira geral, ficou claro que a micorrização exerceu um efeito favorável para a absorção de certos nutrientes, como Fe, P e S, e não influenciou a absorção e/ou acúmulo de Ca.

As micorrizas são conhecidas por melhorarem a nutrição mineral das plantas, principalmente de P (Quilambo, 2003). Outros minerais também podem ser mais acumulados pelas plantas quando elas estão associadas simbioticamente com FMAs. No entanto, as informações sobre a influência da micorrização no aumento ou na diminuição da absorção e acúmulo de MPs nas plantas são controversas (Sudova e Vosatka, 2007). Sudova e Vosatka (2007) observaram que plantas de milho colonizadas por *G. intraradices* crescendo em solo contaminado com Pb absorveram menos que plantas não micorrizadas, enquanto que Chen et al. (2005) observaram que *Kummerowia striata*, *Ixeris denticulate*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens* e *Echinochloa crusgalli* crescendo em solo contaminado com Pb nas concentrações de 300 e 600 mg kg⁻¹, quando estavam micorrizadas absorveram mais Pb que as plantas não micorrizadas.

Nesse experimento constatou-se que as plantas aumentaram a translocação de Pb para a parte aérea até o limite de 500 mg Pb kg⁻¹ de solo e que após esse limite as plantas micorrizadas translocam menos Pb. Em raízes, o acúmulo é gradual conforme se aumenta a concentração de Pb no solo. Embora plantas micorrizadas e não micorrizadas tenham apresentado um aumento na concentração de Pb quando a concentração desse elemento no solo foi aumentada, quando se analisa o conteúdo de Pb por planta, verifica-se que o efeito de diluição fica minimizado em função da maior produção de biomassa.

Isto é interessante porque quando se considera os dados para fins de fitorremediação deve-se levar em conta a biomassa produzida e, analisando apenas a concentração em mg kg⁻¹

parece que plantas micorrizadas e não micorrizadas têm o mesmo potencial de acumular Pb, mas esta informação não é real quando observamos o conteúdo de Pb presente por planta.

Uma consideração importante a se fazer é que a espécie *C. mucunoides*, quando associada a *G. etunicatum*, é capaz de crescer e se desenvolver em solos com concentrações acima do limite da fitotoxicidade, que varia entre 100 e 400 mg kg⁻¹ Pb para plantas tolerantes (Malavolta, 1994).

Estes dados mostram as diferentes habilidades dos FMAs em restringir ou aumentar a absorção do MP pela planta, e esta característica pode estar relacionada com a origem tanto do FMA como da planta associada a ele. No presente estudo a associação com o *G. etunicatum* favoreceu o acúmulo de Pb ao invés de restringir sua entrada na planta. Neste caso a associação se mostrou favorável ao acúmulo de Pb nas plantas micorrizadas.

CONCLUSÕES

- A micorrização confere tolerância a *Calopogonium mucunoides* em solo contaminado por chumbo.
- A micorrização favorece o acúmulo de chumbo em *C. mucunoides*.
- Plantas de *C. mucunoides* associadas ao FMA *Glomus etunicatum* podem ser utilizadas para fitoestabilização de Pb.

CAPÍTULO III

TOLERÂNCIA E POTENCIAL FITORREMEDIADOR DE *Stizolobium aterrimum* ASSOCIADA AO FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR *Glomus etunicatum* EM SOLO CONTAMINADO POR CHUMBO

INTRODUÇÃO

A poluição de solos por (MPs) tem se tornado um problema global crescente com o desenvolvimento industrial, a mineração e a aplicação de lodo de esgoto (Chen et al., 2000). O chumbo (Pb) é um MP que se concentra preferencialmente nas camadas superficiais do solo e sua disponibilidade é dependente das condições do solo (Päivöke, 2002).

Em solos agriculturáveis o Pb pode levar à diminuição do rendimento das culturas diretamente, por afetar o desenvolvimento das plantas, ou indiretamente, por comprometer a atividade microbiana do solo. O Pb afeta principalmente o desenvolvimento das raízes das plantas e este aspecto pode ser usado para avaliar o potencial de tolerância das espécies ao contaminante (Di Salvatore et al., 2008).

Diversos métodos têm sido utilizados para remediar solos contaminados com MPs, no entanto, muitos deles são muito agressivos ao ecossistema. A utilização de ácidos fortes tais como ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido clorídrico é eficiente, mas estes trazem prejuízo ao solo (Tuin e Tels, 1990). Ácidos orgânicos também são efetivos na imobilização de Pb (Renella et al., 2004) e a utilização de agentes quelantes como o EDTA é eficiente no aumento da solubilidade de certos MPs (Piechalak et al., 2003). Além desses métodos citados, também pode ser realizada a remoção de parte do solo contaminado, o que causa efeito negativo sobre o solo, já que expõe os horizontes do mesmo.

Uma tecnologia menos agressiva, a fitorremediação, tem como princípio a absorção e acúmulo de MPs pelas plantas, as quais posteriormente podem ser coletadas e armazenadas para um gerenciamento seguro. A fitorremediação abrange, entre outras técnicas, a fitoextração a qual se baseia no acúmulo do contaminante na parte aérea, e a fitoestabilização que se baseia na imobilização do contaminante nas raízes reduzindo dessa forma a sua disponibilidade para outros organismos (Gratão et al., 2005). As plantas são caracterizadas como fitoextratoras de acordo com a concentração do contaminante que elas são capazes de acumular na parte aérea. Segundo Lombi et al. (2001), para o Pb esta concentração deve ser de pelo menos 1000 mg kg^{-1} , ou seja, a planta deve acumular pelo menos 0,1% de Pb na massa da matéria seca da parte aérea.

Espécies da família Brassicaceae, são consideradas geralmente hiperacumuladoras, mas, no entanto, estas possuem crescimento lento e baixa produção de biomassa, características não desejadas para fitorremediação, uma vez que o ideal seria a produção de grande quantidade de biomassa para uma maior remoção do contaminante.

A associação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode conferir maior tolerância e melhorar a capacidade de fitoextração de metais pouco solúveis como o Pb. A associação dos FMAs *Glomus mosseae* e *G. deserticola* e dos fungos saprófitos *Fusarium concolor* e *F. koningii* com *Eucalyptus globulus* propiciou a fitoextração de Pb, permitindo um acúmulo superior a 1000 mg.kg^{-1} de Pb na massa seca da planta (Arrigada et al., 2005).

Dessa maneira, o trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associadas ou não ao FMA *Glomus etunicatum* em solo contaminado com Pb.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (inoculação ou não de FMA e quatro concentrações de Pb: 0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹), com sete repetições para cada tratamento.

Preparo do solo

No experimento foi utilizado solo do tipo latossolo vermelho-amarelo de textura argilosa. Uma amostra desse solo foi encaminhada para realização de análise físico-química no Laboratório de Análise de Solos do Instituto Agronômico de Campinas – IAC tendo apresentado pH (CaCl₂) de 4,6; 25 g dm⁻³ e 9 mg dm⁻³ de matéria orgânica e P, respectivamente; e 2, 7 e 29 mmol_c dm⁻³ de K, Mg e Ca, respectivamente. A amostra de solo foi desinfestada por autoclavagem com a finalidade de eliminar os propágulos infectivos de FMAs e posteriormente acondicionada em vasos plásticos com capacidade para dois litros. O solo de cada vaso recebeu Pb, sob a forma de solução aquosa de acetato de chumbo, nas concentrações de Pb determinadas para cada tratamento (0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹). Os nutrientes Mg, P e K, que apresentaram concentrações abaixo do adequado, foram corrigidos. Posteriormente, o solo foi deixado em repouso para estabilização por aproximadamente 15 dias e nova análise de solo foi realizada, apresentando-se os resultados na tabela 1.

Tabela 1 – Características químicas do solo após a adição de Pb.

Pb (mg kg ⁻¹)	pH	V %	M.O. g dm ⁻³	P mg dm ⁻³	mmolc dm ⁻³				mg dm ⁻³					
					K	Ca	Mg	H+Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Pb
0	5,8	65	15	25	3,0	30	5	20	0,16	3,4	7	11,9	0,9	0,61
250	5,8	60	16	21	2,9	26	5	22	0,18	3,8	9	6,7	0,6	126
500	5,8	63	15	21	2,9	26	5	20	0,17	3,6	8	6,0	0,7	268
1000	5,7	63	17	23	2,8	26	5	20	0,16	3,8	8	9,2	0,7	520

Material biológico

As sementes de *S. aterrimum*, obtidas do estoque de sementes do laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia da UNICAMP, foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 25% por 10 minutos, imersas a seguir em suspensão de rizóbios específicos para *S. aterrimum*, cultivados durante 6 dias em meio líquido YMB (Yeast Manitol Broth), e então colocadas oito sementes por vaso. Foi utilizado inóculo misto de FMA, contendo areia-solo, esporos, hifas e raízes colonizadas de *Brachiaria brizantha*, com aproximadamente 2700 esporos de *Glomus etunicatum* para cada vaso. A inoculação do FMA foi realizada imediatamente antes da semeadura, em covas com aproximadamente 3 cm de profundidade. Após a emergência foi feito o desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

Germinação

A germinação das sementes foi acompanhada durante 8 dias e, a partir dos dados obtidos, foi estimada a porcentagem de germinação, considerando-se como tal a emergência do hipocótilo. Para este parâmetro não foi considerado o tratamento que recebeu inoculação de FMA.

Coleta do material vegetal

Após o período de crescimento, três plantas de cada tratamento foram coletadas, lavadas, subdividas em raízes e parte aérea e mantidas para secar em estufa a 60°C até atingirem massa constante. As quatro plantas restantes de cada tratamento tiveram a quarta folha trifoliolada completamente expandida coletada, armazenada em saquinhos de papel

alumínio e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. Posteriormente essas folhas foram armazenadas em freezer a -40°C até o momento das análises bioquímicas.

Medidas de crescimento, nodulação e colonização micorrízica

Foram realizadas as seguintes medidas de crescimento: altura, área foliar e massa da matéria seca de partes aéreas, raízes e nódulos. Foi contado o número de nódulos para estimar nodulação. Após clareamento das raízes de acordo com o método proposto por Phillips e Hayman (1970), a colonização micorrízica foi determinada de acordo com Giovanetti e Mosse (1980) em microscópio óptico com aumento final de 400x, observando-se 10 campos para cada segmento de 1 cm de raiz.

Determinações analíticas

Para extração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais foram utilizados quatro discos foliares de cada planta, com aproximadamente 0,6 cm de diâmetro, e estes foram colocados em tubos de ensaio contendo 3,5 ml de solução PA de DMSO (Dimetilsulfóxido). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por aproximadamente 30 minutos e depois mantidos no escuro para esfriar (Hiscox e Israelstam, 1978). Para a quantificação dos pigmentos citados acima foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 470, 646 e 663 nm e utilizadas as equações propostas por (Lichtenthaler, 1987).

Para a extração dos diferentes compostos, aproximadamente 10 mg de tecido foliar liofilizado foram imersos em 3 mL de solução de metanol:clorofórmio:água na proporção 12:5:3 (v/v/v) respectivamente, segundo o método proposto por Bialeski e Turner (1966). O material permaneceu em geladeira a 4°C, por 4 dias. A esta solução foi acrescentada uma mistura de clorofórmio e água na proporção de 1:1,5 (v/v), respectivamente, para separação de

fases; esta solução foi agitada e deixada em repouso em geladeira por 24 horas e posteriormente foram coletados 3 mL da fração aquosa-metanólica, que foi seca em concentrador a vácuo (SpeedVac) e ressuspendida em 0,5 mL de água mili-Q para análises bioquímicas.

O nitrato foi determinado de acordo com o método descrito por Cataldo et al. (1975), utilizando-se KNO_3 para a curva padrão; a amônia foi determinada de acordo com o método descrito por McCullough (1967) utilizando-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a curva padrão; a concentração de aminoácidos solúveis totais foi determinada de acordo com o método proposto por Cocking e Yemm (1954), utilizando-se leucina para a curva padrão e a peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por Calmak e Horst (1991).

A concentração de P e Pb em raízes e parte aérea foram determinados após digestão nítrico-perclórica de acordo com o método proposto por Abreu et al. (2000) e analisado por espectroscopia de emissão em plasma induzido em argônio, ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy).

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação de médias entre os tratamentos com e sem inoculação do FMA. Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno $(x/100)^{1/2}$ e os referentes a contagens foram transformados em $\log(x+1)$, previamente à análise estatística. Foi utilizado o software de estatística SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação

A germinação das sementes é um ponto fundamental ao desenvolvimento das plantas em solos contaminados. Nesse estudo observou-se que o aumento da concentração de Pb no solo não influenciou a germinação das sementes, e, de maneira geral, somente houve variação na taxa de germinação do 1º ao 3º dia, o que poderia ser atribuído a diferenças fisiológicas das próprias sementes e do 4º dia em diante não houve diferença entre os tratamentos e a porcentagem final de germinação nos solos com diferentes concentrações de Pb, variou entre 60% e 75% (Figura 1). A capacidade de germinar em solos com altas concentrações de Pb pode se atribuída ao fato dos tecidos circundantes ao embrião atuarem como uma barreira seletiva à entrada de MPs, evitando possíveis danos no embrião (Li et al., 2005). A capacidade de germinação de sementes em solos contaminados com MPs pode ser utilizada como um parâmetro para determinar a tolerância a contaminantes (Di Salvatore et al., 2008).

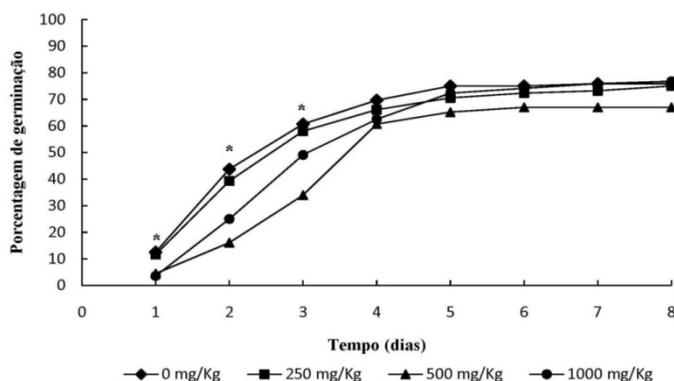


Figura 1 – Porcentagem de germinação de sementes de *Stizolobium aterrimum* em resposta ao aumento da concentração de Pb no solo. Médias representativas para n=14. (*: diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% entre tratamentos com diferentes concentrações de Pb).

Medidas de crescimento

O crescimento é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a tolerância de plantas a ambientes contaminados com MPs (Peralta-Videa et al., 2004; Romeiro et al., 2007; Rossi,

2007; Almeida et al., 2008; Andrade et al., 2008; Castaldi et al., 2009). Diversos atributos podem ser considerados no que diz respeito ao crescimento, como altura, área foliar e biomassa do vegetal e esses são geralmente afetados pelos contaminantes do solo. O Pb pode afetar diretamente o crescimento dos vegetais, principalmente as raízes, reduzindo seu comprimento (Di Salvatore et al., 2008) e sua massa Gopal e Rizvi (2008). Todas estas variáveis que geralmente são influenciadas pela presença de MPs no solo podem ser atenuadas pela associação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Os FMAs têm demonstrado aliviar o estresse causado por MPs em plantas (Hildebrandt et al., 2007). Os mecanismos pelos quais a micorriza arbuscular atenua o desenvolvimento da planta hospedeira em solos contaminados com MPs compreendem a imobilização de MPs na parede celular das hifas intra ou extra-radicaís, a melhoria no estado nutricional da planta e a quelação de MPs no solo por uma glicoproteína insolúvel chamada glomalina que é secretada em grandes quantidades no solo pelos FMAs, o que pode diminuir a disponibilidade do metal para as plantas (Nichols, 2003; González-Chávez et al., 2004).

Nesse estudo observou-se que a micorrização da mucuna teve efeito positivo no desempenho somente em plantas cultivadas em solos com adição de 500 mg kg^{-1} de Pb, aumentando a área foliar e a produção de massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), no entanto, a altura e a massa seca de raízes não foram influenciadas pela associação micorrízica (Tabela 2).

Tabela 2 – Altura, área foliar, massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de plantas de *Stizolobium aterrimum* micorrizadas (M) ou não micorrizadas (NM) e cultivadas em solo com adição de concentrações crescentes de Pb.

Pb - mg kg ⁻¹	Altura		Área foliar		MSPA		MSR	
	NM	M	NM	M	NM	M	NM	M
0	2,11 a	2,14 a	1671,59 a	1670,43 a	7,56 a	7,6 a	1,43 a	1,6 a
250	2,12 a	1,92 a	1298,20 a	1033,34 a	5,8 a	4,83 a	1,36 a	1,0 a
500	1,90 a	2,06 a	822,93 b	1375,73 a	3,93 b	6,63 a	1,0 a	1,16 a
1000	2,06 a	2,16 a	1116,23 a	1176,92 a	5,66 a	5,36 a	1,36 a	1,0 a
Regressão	ns	ns	x ²	ns	x ²	ns	ns	ns
Significância	ns	ns	**	ns	**	ns	ns	ns

Médias representativas com n=3. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. Análise de regressão: não significativa (ns), linear (x) e quadrática (x²). Significância: ** P < 0,01 e *** P < 0,001.

Embora seja bem documentado que a micorrização melhora o status mineral dos vegetais, este resultado benéfico depende muito do tipo de fungo e de planta considerados na associação. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os de Jankong e Visoottiviseth (2008) que relatam que a biomassa total de plantas micorrizadas de *Tagetes erecta* crescidas em solo contaminado com As não diferiu da biomassa das não micorrizadas, enquanto que no mesmo experimento plantas de *Melastoma malabathricum* apresentaram uma biomassa muito maior quando micorrizadas. Este tipo de observação é importante, pois para implantação da técnica de fitorremediação é necessário levar em conta o tipo de FMA existente na região em que a planta será plantada, para proporcionar uma melhor interação FMA-planta e obter o melhor resultado possível.

Associações simbióticas

A nodulação foi reduzida drasticamente com o incremento do Pb no solo, com aproximadamente 70% de redução em plantas micorrizadas ou não. Além disso, a massa seca dos nódulos de plantas cultivadas no solo com 1000 mg kg⁻¹ de Pb também foi reduzida em aproximadamente 50% em relação às plantas crescendo no solo controle, tanto em plantas micorrizadas como em não micorrizadas (Figuras 2 e 3). Wani et al. (2008) também

observaram redução na nodulação, a qual foi acompanhada por redução da massa de nódulos, em plantas de ervilha crescendo em solo contaminado com Cu. A redução da nodulação pode ser devida ao efeito tóxico dos MPs diretamente sobre os microrganismos do solo, como explicado por (Giller et al., 1998). Já, a redução da massa dos nódulos formados, possivelmente esteja relacionada às alterações metabólicas, tanto nas células radiculares como nas bactérias, que prejudicam o desenvolvimento da estrutura simbiótica.

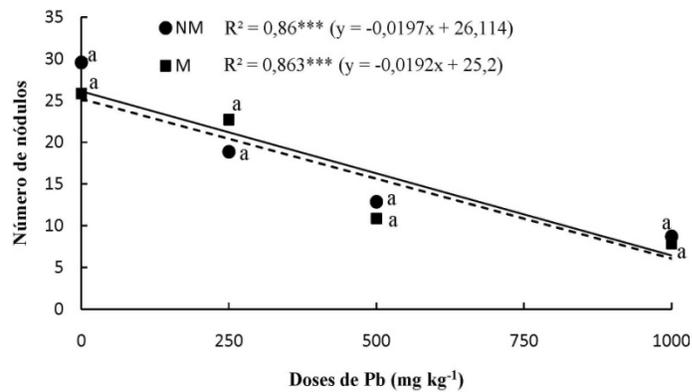


Figura 2 – Formação de nódulos radiculares em raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Médias representativas com n=14. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. R²: coeficiente de determinação. Significância: *** P < 0,001.

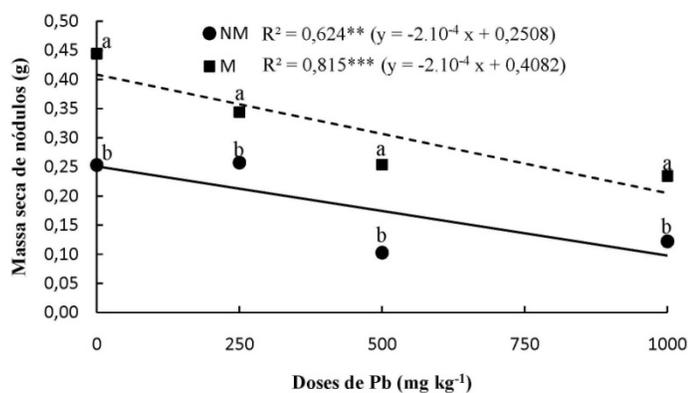


Figura 3 – Massa seca de nódulos de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Médias representativas com n=14. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. R²: coeficiente de determinação. Significância: *** P < 0,001.

Embora existam relatos de que a presença de MPs no solo pode reduzir a colonização micorrízica, como reportado por Rabie (2005) em plantas de trigo e feijão crescendo em solo contaminado com Zn, Cu, Pb e Cd, no presente estudo observou-se uma redução não significativa da colonização micorrízica de 19% (Figura 4). Isto pode sugerir que a associação de *G. etunicatum* com *S. aterrimum* é uma associação relativamente tolerante, já que a porcentagem de colonização das raízes é um fator que leva em consideração os dois parceiros simbióticos envolvidos.

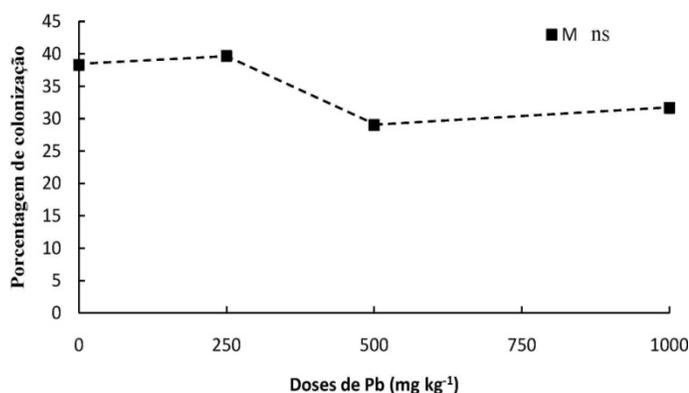


Figura 4 – Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. (ns: regressão não significativa).

Pigmentos fotossintéticos

Os conteúdos de clorofilas e carotenóides não foram influenciados pelas doses crescentes de Pb no solo e, de maneira geral, a associação com o *G. etunicatum* não influenciou significativamente estas variáveis (Tabela 3).

Tabela 3 – Teor de clorofila *a*, *b*, razão clorofila *a/b* e carotenóides totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de MF) em folhas de plantas de *Stizolobium aterrimum*, não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M), crescendo em solo contaminado com Pb.

Pb - mg kg^{-1}	Clorofila a		Clorofila b		Razão Clr. a/b		Carotenóides	
	NM	M	NM	M	NM	M	NM	M
0	0,78 a	0,92 a	0,26 a	0,28 a	3,00 a	3,28 a	0,35 a	0,39 a
250	0,78 a	0,76 a	0,24 a	0,23 a	3,25 a	3,30 a	0,33 a	0,33 a
500	0,72 b	0,87 a	0,23 a	0,27 a	3,13 a	3,22 a	0,31 b	0,38 a
1000	0,89 a	0,87 a	0,25 a	0,24 a	3,56 a	3,62 a	0,37 a	0,37 a
Regressão	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Significância	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. (ns: regressão não significativa).

O Pb pode afetar a síntese de clorofilas já que este metal pode interferir na absorção de Fe e Mg e assim inibir a síntese destas moléculas (Burzynsky, 1987; Van Assche e Clijsters, 1990; Drazkiewicz, 1994). No entanto, o teor destes pigmentos não foi afetado pelo incremento de Pb em *S. aterrimum*. Outros estudos conduzidos com mudas de arroz utilizando Cd nas concentrações de 10, 100 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ observaram redução do teor de clorofila *a*, *b* e da razão clorofila *a/b* (He et al., 2006) e, segundo este mesmo autor, a redução da razão entre as clorofilas *a* e *b* pode indicar que a síntese de clorofila *a* é mais sensível ao contaminante que a síntese de clorofila *b*.

Os carotenóides são pigmentos acessórios com diversas funções celulares, mas que atuam principalmente no processo de fotossíntese, onde auxiliam na transferência da energia luminosa ao centro de reação do complexo antena (Taiz e Zeiger, 2004). Dados que corroboram com os encontrados neste estudo foram reportados por (MacFarlane e Burchett,

2001), que não observaram alterações no teor de carotenóides em folhas de *Avicennia marina* na presença de Pb nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g g}^{-1}$.

É importante ressaltar que efeitos diretos ou indiretos sobre a fotossíntese como, por exemplo, a redução do teor dos pigmentos envolvidos em tal processo pode comprometer seriamente o desenvolvimento vegetal e, visto que na planta estudada o Pb teve um efeito quase nulo sobre a síntese destes pigmentos, pode-se supor que o processo de fotossíntese tenha sido pouco afetado, embora fossem necessários estudos de medida da fotossíntese líquida para confirmação exata.

Utilização de formas de nitrogênio

O nitrogênio pode ser absorvido do solo e utilizado pelas plantas nas formas de nitrato ou amônio (Taiz e Zeiger, 2004). Entretanto, em leguminosas, o nitrogênio atmosférico também pode ser utilizado graças à associação simbiótica de bactérias do grupo *Rhizobium* com as raízes, formando nódulos radiculares fixadores de N_2 . Diversas enzimas estão envolvidas no processo de assimilação das diversas fontes de nitrogênio pelas plantas e as atividades das mesmas podem ser afetadas pela presença de MPs no solo, já que estes podem alterar o sítio catalítico por se ligarem às enzimas no lugar de seus co-fatores metálicos originais. O acúmulo de nitrato nos tecidos é um dos principais indícios de que um determinado MP, como constatado para o Cd e o Cr, está reduzindo a atividade da enzima nitrato redutase (Wahid et al., 2007; Rai et al., 2004). Entretanto, o Pb parece não ter causado efeito sobre esta enzima em *S. aterrimum*, pois o teor de nitrato foliar não foi influenciado pela adição de doses crescentes de Pb no solo. A inoculação do FMA também não mostrou influência significativa já que também não foram observadas diferenças entre plantas não micorrizadas e micorrizadas (Figura 5).

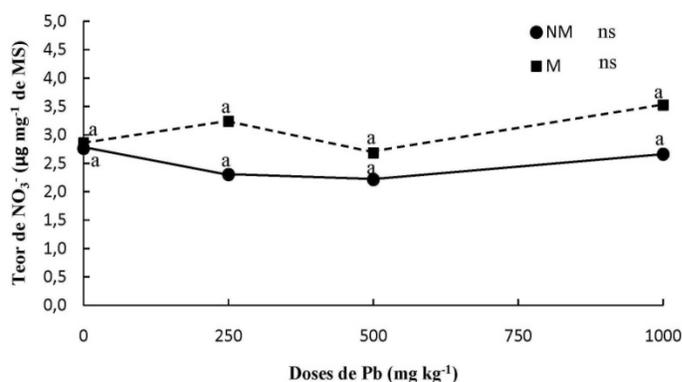


Figura 5 – Teor de nitrato em folhas de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo com concentrações crescentes de Pb. Médias representativas com n = 4. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. ns: regressão não significativa.

A fixação biológica de nitrogênio também foi avaliada, para verificar se o Pb exerceria algum efeito negativo sobre a atividade da enzima nitrogenase. Observou-se que a atividade da nitrogenase em plantas micorrizadas foi estimulada até a dose de 500 mg kg⁻¹ e diminuiu na dose de 1000 mg kg⁻¹, seguindo um ajuste de tipo quadrático, e os valores observados nas doses de 500 e 1000 mg kg⁻¹ em plantas micorrizadas foram maiores que os observados em plantas não micorrizadas nas mesmas concentrações (Figura 6).

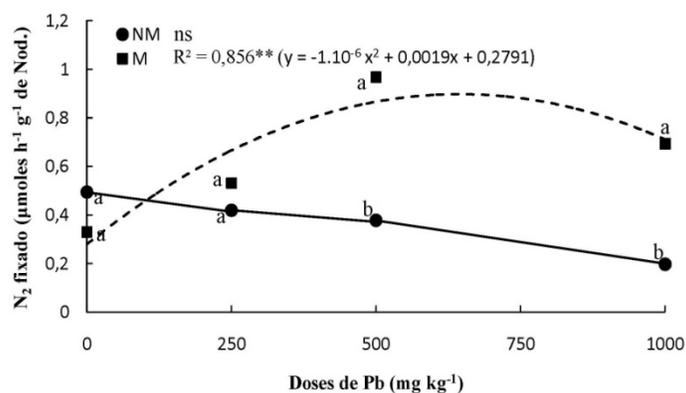


Figura 6 – Atividade da nitrogenase em nódulos de raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo com concentrações crescentes de Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. ns: regressão não significativa.

O produto direto, utilizável pela planta, da atividade da enzima nitrogenase é o íon amônio que é assimilado pela via GS/GOGAT (Taiz e Zeiger, 2004). Observou-se que a concentração deste composto também aumentou até a dose de 500 mg kg⁻¹ e que na dose de 1000 mg kg⁻¹ a concentração foi reduzida, seguindo um ajuste de tipo quadrático (Figura 7).

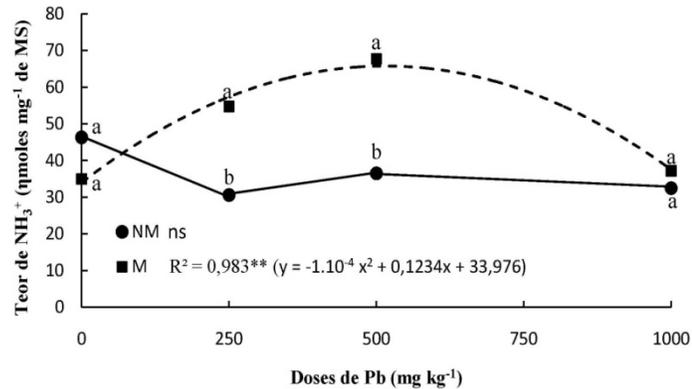


Figura 7 – Teor de amônia em folhas de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo com doses crescentes de Pb. Médias representativas com n = 4. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. R²: coeficiente de determinação; ** P < 0,001; ns: regressão não significativa.

Pode-se sugerir que, possivelmente, o acúmulo de NH₃⁺ tenha ocorrido devido ao estímulo da fixação de nitrogênio e uma eventual redução da atividade da via GS/GOGAT, mas o aumento dos níveis de amônia também pode estar relacionado ao aumento da atividade de proteases induzindo a degradação de proteínas, como reportado por Chiraz et al. (2003) que estudaram a toxicidade de Cd no cultivo de tomateiros.

Peroxidação de lipídeos

A peroxidação dos lipídeos das membranas pode ser iniciada pelo ataque de espécies reativas de oxigênio nos ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipídicas. A presença de teores excessivos de MPs pode aumentar a geração destas moléculas agressivas, induzindo a peroxidação dos lipídeos das membranas, e uma maneira comum de avaliar este tipo de

estresse é pela determinação da concentração de malondialdeído (MDA) formado como produto da peroxidação. Embora o Pb não seja um metal oxido-redutor a indução de estresse oxidativo parece ocorrer de uma maneira indireta, aumentando a produção de formas reativas de oxigênio (Sharma e Dubey, 2005). Constatou-se neste experimento que, de modo geral, plantas micorrizadas apresentaram maiores teores de MDA que plantas não micorrizadas e que em plantas micorrizadas houve um decréscimo muito leve, mas significativo, no teor de MDA foliar em função do incremento de Pb no solo (Figura 8).

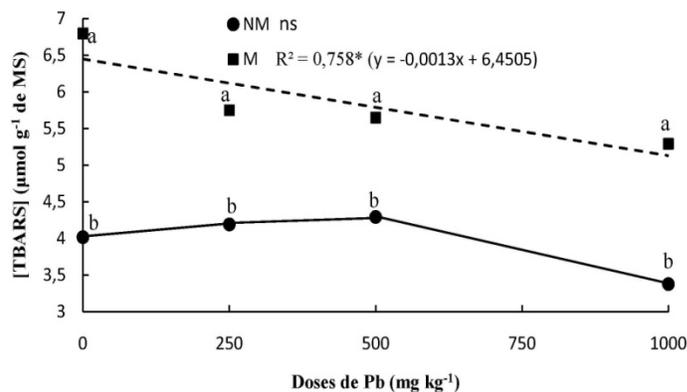


Figura 8 – Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em folhas de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. R²: coeficiente de determinação; * P < 0,05; ns: regressão não significativa.

Estes resultados diferem dos encontrados por Dey et al. (2007), que observaram aumento gradativo de MDA tanto em raízes como em folhas de plantas de trigo submetidas a doses crescentes de Pb. O excesso de Pb nos tecidos vegetais, pode gerar estresse oxidativo e induzir a atividade das enzimas do sistema antioxidante (Gratão et al., 2005). O aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaicol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato peroxidase (DHAR), glutatona redutase (GR) e a inibição da atividade de catalase (CAT) são algumas das alterações citadas por Sharma e Dubey (2005). A redução dos níveis de MDA em plantas micorrizadas pode ter ocorrido devido à indução da atividade de tais enzimas que atuam no controle de espécies reativas de

oxigênio, que podem ter evitado que ocorresse peroxidação das membranas nos tecidos foliares de *S. aterrimum*.

Absorção de fósforo

A micorrização favoreceu a absorção de P por *S. aterrimum* nos tratamentos controle e de 250 mg kg⁻¹ de Pb, visto que foram observadas concentrações de P muito inferiores em plantas não micorrizadas. O incremento de Pb afetou a concentração de P na parte aérea das plantas micorrizadas. Em plantas que cresceram no solo com adição de 1000 mg kg⁻¹ de Pb houve redução de 25% no teor de P, e a análise da regressão seguiu ajuste de tipo linear (Figura 9).

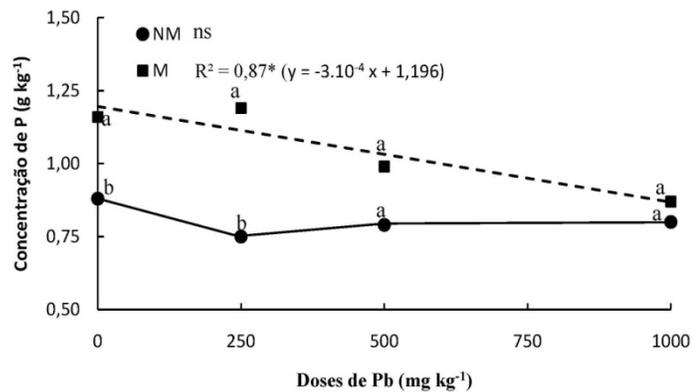


Figura 9 – Concentração de P em parte aérea de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Médias representativas com n = 3. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. R²: coeficiente de correlação; * P < 0,05; ns: regressão não significativa.

Porém, a concentração de P nas raízes não foi influenciada significativamente pelo incremento de Pb no solo. Plantas micorrizadas também apresentaram maiores teores deste elemento nas raízes do que plantas não micorrizadas (Figura 10).

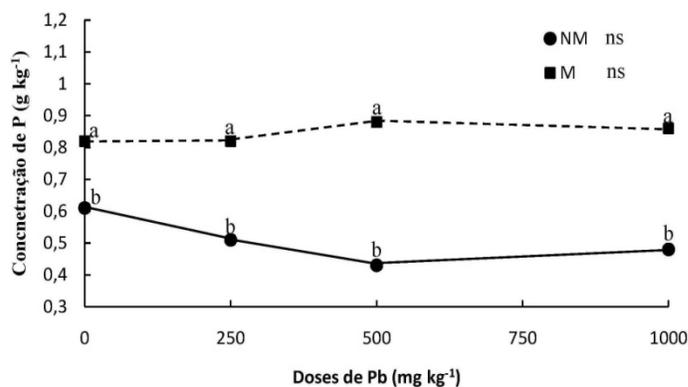


Figura 10 – Concentração de P em raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM – linha contínua) e micorrizadas (M – linha tracejada) crescendo em solo contaminado com Pb. Médias representativas com $n = 3$. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. R^2 : coeficiente de determinação; * $P < 0,05$; ns: regressão não significativa.

A associação com FMAs oferece benefícios consideráveis em termos de crescimento e absorção de nutrientes (Gosling et al., 2006). Os presentes resultados mostraram que plantas micorrizadas absorveram mais P que as não micorrizadas e corroboram os resultados encontrados por Andrade et al. (2004) em soja crescendo em solo contaminado com Pb. A redução da concentração de P em parte aérea de plantas micorrizadas pode ter ocorrido em função do efeito tóxico do Pb sobre o desenvolvimento das estruturas de trocas de nutrientes.

Acúmulo de chumbo

As plantas responderam ao aumento das concentrações de Pb no solo aumentando linearmente a concentração deste elemento tanto em parte aérea como em raízes (Figuras 11 e 12). Este tipo de resultado foi observado por Romeiro et al. (2007) e Almeida et al. (2008) trabalhando com *Canavalia ensiformis* em meio contaminado com Pb e Andrade et al. (2003) trabalhando com soja em meio contaminado por Pb.

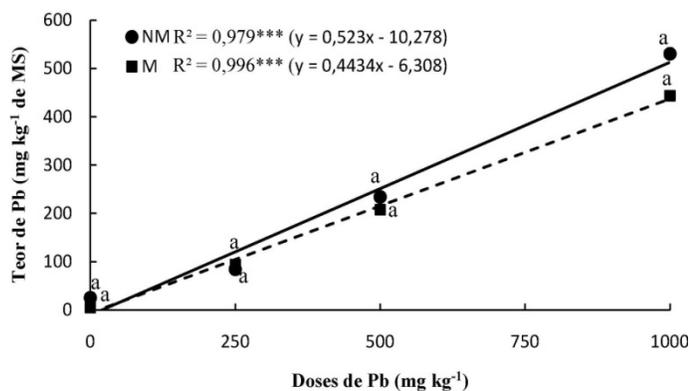


Figura 11 – Concentração de Pb em parte aérea de plantas de *Stizolobium aterrimum* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) pelo FMA *Glomus etunicatum* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS – massa seca, R^2 : coeficiente de correlação, *** $P < 0,001$).

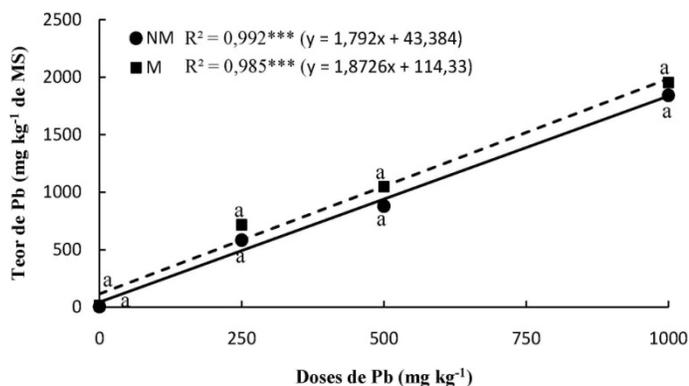


Figura 12 – Concentração de Pb em raízes de plantas de *Stizolobium aterrimum* micorrizadas (M – linha tracejada) e não micorrizadas (NM – linha contínua) pelo FMA *Glomus etunicatum* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% entre os tratamentos NM e M, dentro de cada dose de Pb. MS – massa seca, R^2 : coeficiente de correlação, *** $P < 0,001$).

Analisar este tipo de resposta é importante do ponto de vista fisiológico para a fitorremediação, porque existem ocasiões em que a concentração de MP é tão elevada que a planta não é capaz de se desenvolver e logo não extrai o contaminante. Apesar de as plantas terem aumentado a absorção de Pb em resposta ao aumento deste no solo, as concentrações deste MP na parte aérea não alcançaram concentrações consideradas típicas para plantas hiperacumuladoras, 1000 mg kg^{-1} de massa seca (Lombi et al., 2001). Entretanto, as plantas

de *S. aterrimum* mostraram-se boas candidatas para utilização em técnicas de fitoestabilização, já que na maior dose de Pb adicionada ao solo estas plantas acumularam aproximadamente 2000 mg kg⁻¹ de Pb na massa seca da raiz.

A micorrização é conhecida por produzir substâncias estimuladoras do crescimento vegetal aumentando a biomassa e favorecendo a fitorremediação (Khan et al., 2000). Entretanto, no presente trabalho observou-se que a micorrização não influenciou o crescimento e nem a absorção de Pb. Alguns estudos mostram que a associação com FMA aumenta a absorção de MPs (Joner e Leyval, 1997; Khan et al., 2000), mas a redução da absorção de MPs também tem sido relatada (Heggo et al., 1990). Estes resultados podem ser devidos às diferenças nas espécies de microsimbiontes e hospedeiros associados simbioticamente, pois se sabe que ecotipos de FMA procedentes de áreas contaminadas possuem maior tolerância a altas concentrações de metais e podem ser mais eficientes quanto a conferir tolerância à planta (Galli et al., 1994). O Pb se acumulou principalmente nas raízes, porém, em plantas não micorrizadas crescidas em solo controle (sem adição de Pb) houve maior porcentagem de Pb na parte aérea enquanto que em plantas micorrizadas a translocação à parte aérea foi menor. No solo controle havia concentrações baixas de Pb, o que é normalmente encontrado no solo, e nessa situação alguns MPs têm seu transporte à parte aérea acentuado (Figura 13).

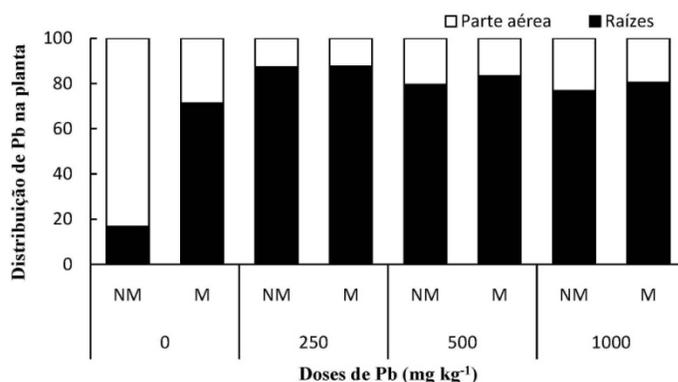


Figura 13 – Distribuição de Pb nas raízes e órgãos aéreos de *Stizolobium aterrimum* não micorrizadas (NM) e micorrizadas (M).

CONCLUSÕES

A planta *Stizolobium aterrimum* possui tolerância ao Pb e pode ser utilizada como fitoestabilizadora em solos contaminados com esse MP.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste trabalho verificou-se que cada espécie de leguminosa herbácea estudada responde diferentemente ao excesso de Pb no solo e que a associação com FMA foi de fundamental importância para o desenvolvimento do calopogônio, espécie que mostrou-se mais sensível ao Pb. Dentre as plantas estudadas *C. gladiata* e *S. aterrimum* apresentaram bom desenvolvimento no solo contaminado com Pb e podem ser de interesse em projetos de fitorremediação de solos contaminados com esse metal, agindo como fitoestabilizadoras. *C. mucunoides*, apesar de ter apresentado um bom desenvolvimento quando associada a *G. etunicatum*, pode não ser uma espécie favorável à fitorremediação em função de baixa produção de biomassa.

A fitorremediação é uma técnica que começou a ser empregada após o descobrimento de espécies que possuíam a capacidade de tolerar, translocar e acumular grandes quantidades de metais pesados em tecidos da parte aérea (Salt et al., 1998) e a estas plantas foi atribuída a denominação de hiperacumuladoras. No entanto, as plantas que até então foram caracterizadas como hiperacumuladoras geralmente possuem crescimento lento e pouca produção de biomassa (Salt et al., 1998) e estas características não são favoráveis à fitorremediação. Tendo em vista este aspecto “negativo” das plantas hiperacumuladoras, existe uma necessidade em se estudar plantas com características que sejam contrárias às apresentadas pelas plantas consideradas hiperacumuladoras até o momento.

Vale ressaltar que as plantas respondem diferentemente a diferentes metais pesados e por isso são necessários estudos envolvendo outros tipos de metais pesados e solos contaminados com mais de um tipo de metal pesado, visto que essa é uma situação mais comum que a contaminação por apenas um tipo de metal pesado.

No que se refere à associação simbiótica com FMAs é interessante salientar que a associação micorrízica está presente em mais de 80% das plantas terrestres (Gosling et al., 2006) e que o crescimento normal de certas espécies em solos contaminados com MP pode muito provavelmente ser devido ao efeito benéfico que esta associação propicia às plantas. Esses efeitos podem ir desde a melhora do estado nutricional da planta, aumentando a disponibilidade de P, até a prevenção da transferência de MPs às plantas, pois sabe-se que um dos mecanismos pelo qual os FMAs “protegem” as plantas contra a toxicidade de MPs é a imobilização do metal na parede celular fúngica. Outra razão para o estudo com FMAs é a tolerância destes ao próprio MP, pois FMAs nativos de regiões contaminadas por MPs são mais prováveis de tolerarem concentrações mais altas do contaminante existente no solo. Dessa maneira, combinações perfeitas seriam a utilização de espécies de FMAs nativos de regiões contaminadas por MPs com espécies de plantas com características morfológicas e de crescimento ideais para fitorremediação.

Finalizando, o presente estudo demonstrou que algumas leguminosas herbáceas possuem potencial para serem aplicadas como espécies fitorremediadoras e que espécies intolerantes a MPs podem ter essa característica melhor explorada quando associadas a FMAs e assim podem ter seu potencial fitorremediador melhorado.

REFERÊNCIAS

Abreu, M.F., Abreu, C.A., Bataglia, O.C., Marques, J.C. (2000) Protocolo analítico para caracterização química de substrato para plantas. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em solos e recursos ambientais - Instituto Agronômico de Campinas.

Al-Garni, S.M.S. (2006) Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer *Rhizobium* bacterium. *African Journal of Biotechnology*. 5:2 133-142.

Almeida, A-A.F., Valle, R.R., Mielke, M.S., Gomes, F.P. (2007) Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19: 83-98.

Almeida, E.L., Marcos, F.C.C., Schiavinato, M.A., Lagôa, A.M.M.A., Abreu, M.F. (2008) Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. *Bragantia* **67**: 569-576.

Andrade, A.F.M., Amaral Sobrinho, N.M.B., Magalhães, M.O.L., Nascimento, V.S., Mazur, N. (2008) Zinco, chumbo e cádmio em plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) cultivadas em solo após adição de resíduo siderúrgico. *Ciência Rural* **38**: 1877-1885.

Andrade, S.A.L., Abreu, C.A., Abreu, M.F., Silveira, A.P.D. (2003) Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **27**: 945-954.

Andrade, S.A.L., Abreu, C.A., Abreu, M.F., Silveira, A.P.D. (2004) Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Applied Soil Ecology* **26**: 123-131.

Andrade, S.A.L., Silveira, A.P.D., Jorge, R.A., Abreu, M.F. (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International Journal of Phytoremediation* **10**: 1-13.

Andrade, S.A.L., Gratao, P.L., Schiavinato, M.A., Silveira, A.P.D., Azevedo, R.A., Mazzafera, P. (2009) Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere* **75**: 1363-1370.

Andrade, S.A.L., Silveira, A.P.D. (2004) Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **39**: 1191-1198.

Antosiewicz, D.M., Hennig, J. (2004) Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environmental Pollution* **129**: 237-245.

Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.

Arrigada, C.A., Herrera, M.A., Ocampo, J.A. (2005) Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. *Water, Air and Soil Pollution*. **166**: 31-47.

Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**: 391-396.

Asada, K., Takahashi, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Photoinhibition*, ed. DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, pp. 227–297. New York: Elsevier.

Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. (2006) Aluminium stress affects nitrogen fixation and assimilation in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Growth Regulation* **48**: 271-281.

Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. (1983) Mycorrhizae and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Advances in Agronomy* **36**: 1-46.

Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1761-1778.

Bekiaroglou, P., Karataglis, S. (2002) The effect of lead and zinc on *Mentha spicata*. *Journal of Agronomy & Crop Science* **188**: 201-205.

Bieleski, R.L., Turner, N.A. (1966) Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry* **17**: 278-293.

Briat, J.F., Lebrun, M. (1999) Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **322**: 43-54.

Brunet, J., Repellin, A., Varrault, G., Terryn, N., Zuily-Fodil, Y. (2008) Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *Comptes Rendus Biologies* **331**: 859-864.

Bucher, M. (2006) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* **173**: 11-26.

Burzynsky, M. (1987) The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **9**: 229-238.

Calmak, I., Horst, W.J. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* **83**: 463-468.

Cardoso, P.F., Gratão, P.L., Gomes-Junior, R.A., Medici, L.O., Azevedo, R.A. (2005) Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 267-272.

Castaldi, P., Melis, P., Silvetti, M., Deiana, P., Garau, G. (2009) Influence of pea and wheat growth on Pb, Cd, and Zn mobility and soil biological status in a polluted amended soil. *Geoderma* **151**: 241-248.

Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrander, L.E., Youngs, V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **6**: 71-80.

CETESB (2005) Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente.

Chen, H.M., Zheng, C.R., Tu, C., Shen, Z.G. (2000) Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* **41**: 229-234.

Chen, X., Wu, C., Tang, J., Hu, S. (2005) Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere* **60**: 665-671.

Chien, C., Kuo, Y., Chen, C., Hung, C., Yeh, C., Yeh, W. (2008) Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* **20**: 359-363.

Chiraz, C., Houda, G., Habib, G.M. (2003) Nitrogen metabolism in tomato plants under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 1617-1634.

Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S., Berta, G. (2005) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. *Chemosphere* **59**: 21-29.

Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 159-182.

Cocking, E.C., Yemm, E.W. (1954) Estimation of aminoacids by ninhidrin. *Biochemical Journal* **58**: 12-12.

Coutinho, H.D., Barbosa, A.R. (2007) Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. *Silva Lusitana*. **15 (1)**: 103-117.

Delhaize, E., Ryan, P.R. (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Update on Environmental Stress*. **107**: 315-321.

Deng, H., Ye, Z.H., Wong, M.H. (2009) Lead, zinc and iron (Fe²⁺) tolerances in wetland plants and relation to root anatomy and spatial pattern of ROL. *Environmental and Experimental Botany* **65**: 353-362.

Dey, S.K., Dey, J., Patra, S., Pothal, D. (2007) Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. **19**: 53-60.

Di Salvatore, M., Carafa, A.M., Garratù, G. (2008) Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*. **73**: 1461-1464.

Drazkiewicz, M. (1994) Chlorophyll-ocurrence, functions, mechanisms of action and external factors. *Photosynthetica* **30**: 321-331.

Duvigneaud, P. (1959) Plant cobaltophytes in Upper Katanga (inf Fr.). *Bull. Soc. R. Bot. Belg.* **91**: 111-134.

Ebbs, S.D., Lasat, M.M., Brandy, D.J., Cornish, J., Gordon, R., Kochian, L.V. (1997) Heavy metals in the environment: phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **26**: 1424-1430.

- Evans, K.M., Gatehouse, J.A., Lindsay, W.P., Shi, J., Tommey, A.M., Robinson, N.J.** (1992) Expression of the pea metallothionein like gene Ps MTA in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications of Ps MTA function. *Planta Molecular Biology* **20**: 1019-1028.
- Evans, T.J., James-Kracke, M.R., Kleiboeker, S.B., Casteel, S.W.** (2003) Lead enters Rcho-1 trophoblastic cells by calcium transport mechanisms and complexes with cytosolic calcium-binding proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology* **186**: 77-89.
- Fairbrother, A.** (1997) Hazard classification of metals in terrestrial systems - a discussion paper. International Council on Metals and the Environment - ICME: 30p.
- Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M., Blaghen, M.** (2000) Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*. **41**: 151-156.
- Freitas, E.V.D., Nascimento, C.W.A., Silva, A.J., Duda, G.P.** (2009) Citric acid enhances lead phytoextraction from a soil contaminated by automotive batteries. *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo* **33**: 467-473.
- Freitas, E.V.S., Nascimento, C.W.A., Biondi, C.M., Silva, J.P.S., Souza A.P.** (2009) Dessorção e lixiviação de chumbo em espodossolo tratado com agentes quelantes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **33**: 517-525.
- Galli, U., Schuepp, H., Brunold, C.** (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* **92**: 364-368.
- Gaur, A., Adholeya, A.** (2004) Prospect of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* **86**: 528-534.
- Gildon, A., Tinker, P.B.** (1983) Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants II. The effects of infection on uptake of copper. *New Phytologist* **95**: 263-268.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P.** (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology & Biochemistry* **30**: 1389-1414.
- Giovanetti, M.E., Mosse, B.** (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. **84**: 482-500.
- Glass, D.J.** (2000) Economic potential of phytoremediation. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. 15-31.
- Göhre, V., Paszkowski, U.** (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* **223**: 1115-1122.
- González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Wright, S.F., Nichols, K.A.** (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* **130**: 317-323.
- Gopal, R., Rizvi, A.H.** (2008) Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere* **70**: 1539-1544.

Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture Ecosystems & Environment* **113**: 17-35.

Gratão, P.L., Prasad, M.N.V., Cardoso, P.T., Lea, P.J., Azevedo, R.A. (2005) Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. **17 (1)**: 53-64.

Gremion, F., Chatzinotas, A., Kaufmann, K., Von Sigler, W., Harms, H. (2004) Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *Fems Microbiology Ecology* **48**: 273-283.

Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1987) Phytochelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 439-443.

Gross, J., Stein, R.J., Fett-Neto, A.G., Fett, J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology* **26**: 477-497.

Guilherme, L.R.G., Marchi, G. (2005) Elemento - traço: Os metais pesados no solo. *DBO Agrotecnologia* **2**: 20-21.

Guo, T., Zhang, G., Zhou, M., Wu, F., Chen, J. (2004) Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant and Soil* **259**: 241-248.

Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53 (366)**: 1-11.

Hamer, D.H. (1986) Metallothioneins. *Annual Review of Biochemistry* **55**: 913-951.

Han, Y.L., Huang, S.Z., Gu, J.G., Qiu, S., Chen, J.M. (2008) Tolerance and accumulation of lead by species of *Iris L.* *Ecotoxicology* **17**: 853-859.

Harrier, L.A. (2001) The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. *Journal of Experimental Botany* **52**: 469-478.

Hart, A.D., Oboh, C.A., Barimalaa, I.S., Sokari, T.G. (2005) Concentration of trace metals (lead, iron, copper and zinc) in crops harvested in some oil prospecting locations in rivers state, Nigeria. *African journal of Food and Nutritional Sciences* **5 (2)**: - 1-21.

He, H., Zhiting, X., Minjing, L., Shuanglian, X., Shenglan, L., Mba, F.O. (2006) Effect of cadmium and herbicides on the growth, chlorophyll and soluble sugar content in rice seedlings. *Wuahn University Journal of Natural Science* **11 (3)**: - 742-748.

Heggo, A., Angle, J.S., Chaney, R.L. (1990) Effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on heavy-metal uptake by soybeans. *Soil Biology & Biochemistry* **22**: 865-869.

Hildebrandt, U., Regvar, M., Bothe, H. (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **68**: 139-146.

- Hiscox, J.D., Israelstam, F.** (1978) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* **57**: 1332-1334.
- Iannacone, J., Alvaríño, L.** (2005) Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. *Agricultura Técnica*. **65 (2)**: 198-203.
- Inouhe, M.** (2005) Phytochelatin. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 65-78.
- Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., Tian, S., Li, J.** (2008) Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* **154**: 914-926.
- Jankong, P., Visoottiviseth, P.** (2008) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic contaminated soil. *Chemosphere* **72**: 1092-1097.
- Jesus, E.C., Schiavo, J.A., Faria, S.M.** (2005) Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Revista Árvore* **29**: 545-552.
- Joner, E.J., Leyval, C.** (1997) Uptake of Cd-109 by roots and hyphae of a *Glomus mosseae/Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist* **135**: 353-360.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H.** (2001) Trace Elements in Soil and Plants. 3rd ed. CRC Press, boca Raton, FL, 403p.
- Ke, W.S., Xiong, Z.T., Chen, S.J., Chen, J.J.** (2007) Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 59-67.
- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J.** (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* **41**: 197-207.
- Kinraide, T.B., Perler, J.F., Parker, D.R.** (2004) Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in wheat induced by copper, zinc, aluminum, sodium, and low pH. *Plant Soil* **259**: 201-208.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Pineros, M.A.** (2004) How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 459-493.
- Kopittke, P.M., Asher, C.J., Kopittke, R.A., Menzies, N.W.** (2007) Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Pollution*. **150**: 280-287.
- Kozhevnikova, A.D., Seregin, I.V., Bystrova, E.I., Belyaeva, A.I., Kataeva, M.N., Ivanov, V.B.** (2009) The effects of lead, nickel, and strontium nitrates on cell division and elongation in maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**: 242-250.
- Lasat, M.M.** (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* **31**: 109-120.

Lefevre, I., Marchal, G., Correal, E., Zanuzzi, A., Lutts, S. (2009) Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regulation* **59**: 1-11.

Leopold, I., Günther, D., Schmidt, J., Neumann, D. (1999) Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **50**: 1323-1328.

Leung, H.M., Ye, Z.H., Wong, M.H. (2007) Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere* **66**: 905-915.

Leyval, C., Berthelin, J., Schontz, D., Weissenhorn, I., Morel, J.L. (1991) Influence of endomycorrhizae on maize uptake of Pb, Cu, Zn and Cd applied as mineral salts or sewage sludges. In: Farmer JG. (ed.) *Heavy metal in the environment*. CEP Consultants Ltd., Edinburgh: 204-207.

Leyval, C., Jones, E.J., Del Val C., Haselwandter, K. (2002) Potencial of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In: Gianinazzi, S.; Schüepp, H.; Barea, J.M.; Haselwandter, K. (Eds), *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin.: 175-186.

Li, W., Khan, M.A., Yamaguchi, S., Kamiya, Y. (2005) Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Planta Growth Regulation* **46**: 45-50.

Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382.

Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P. (2001) Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*. **30**: 1919-1926.

Ma, Y., Dickinson, N.M., Wong, M.H. (2006) Beneficial effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on establishment of leguminous trees on Pb/Zn mine tailings. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1403-1412.

MacFarlane, G.R., Burchett, M.D. (2000) Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquatic Botany* **68**: 45-59.

MacFarlane, G.R., Burchett, M.D. (2001) Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin* **42**: 233-240.

Malavolta, E. (1994) Micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificações e fatos. *Produquímica*: 140p.

Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press San Diego, 862p.

McCullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* **17**: 297-304.

McGrath, S.P., Sidoli, C.M.D., Baker, A.J.M., Reeves, R.D. (1993) The potential for the use of metal-accumulating plants for the in situ decontamination of metal-polluted soils. p. 673–676. In H.J.P.

Eijsackers and T. Hamers (ed.) Integrated soil and sediment research: A basis for proper protection. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, the Netherlands.

Meagher, R.B. (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants (vol 3, pg 153, 2000). *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 435-435.

Memon, A.R., Schröder, P. (2009) Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science and Soil Pollution Research*. **16**: 162-175.

Misra, S., Gedamu, L. (1989) Heavy-metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theoretical and Applied Genetics* **78**: 161-168.

Munzuroglu, O., Geckil, H. (2002) Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **43**: 203-213.

Murakami, M., Ae, N. (2009) Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oriza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Hazardous Materials*. **162**: 1185-1192.

Nichols, K.A. (2003) Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. Dissertation to the degree of Doctor of Philosophy - Faculty of the Graduate School of the University of Maryland at College Park: 306p.

Oliveira, A., Pampulha, M.E. (2006) Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **102 (3)**: 157-161.

Päivöke, A.E.A. (2002) Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*. *Environmental and Experimental Botany* **48**: 61-73.

Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 763-775.

Peralta-Videa, J.R., de la Rosa, G., Gonzalez, J.H., Gardea-Torresdey, J.L. (2004) Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research* **8**: 679-685.

Peuke, A.D., Rennenberg, H. (2005) Phytoremediation: Molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention and feasibility. *European Molecular Biology Organization*. **6 (6)**: 497-501.

Phillips, J.M., Hayman, D.S. (1970) Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158-161.

Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz. (2003) Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry*. **64**: 1239-1251.

Pompeu, G.B., Gratão, P.L., Vitorello, V.A., Azevedo, R.A. (2008) Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola* **65**: 548-552.

Quilambo, O.A. (2003) The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. African Journal of biotechnology **2**: 539-546.

Rabie, G.H. (2005) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. African Journal of Biotechnology. **4 (4)**: 332-345.

Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S. (2004) Effects of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. Plant Science **167**: 1159-1169.

Raij, B. van.; Cantarella, H.; Quaggio, J. A.; Furlani, A.M.C. (1996) Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo, 2. ed. Campinas, Instituto Agronômico & Fundação IAC, 285p.

Rashid, A., Ayub, N., Ahmad, T., Gul, J., Khan, A.G. (2009) Phytoaccumulation prospects of cadmium and zinc by mycorrhizal plant species growing in industrially polluted soils. Environmental Geochemistry and Health **31**: 91-98.

Rausser, W.E. (1990) Phytochelatin. Annual Review of Biochemistry **59**: 61-86.

Reeves, R.D., Baker, A.J.M. (2000) Metal-accumulating plants. In: Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment: 193-230.

Renella, G., Landi, L., Nannipieni, P. (2004) Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. Geoderma **122**: 311-315.

Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J.P., Belimov, A.A., Gianinazzi, S., Strasser, R.J., Gianinazzi-Pearson, V. (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. Journal of Experimental Botany **53**: 1177-1185.

Romeiro, S., Lagôa, A.M.M.A., Furlani, P.R., Abreu, C.A., Pereira, B.F.F. (2007) Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. Bragantia **66**: 327-334.

Rossi, S.C. (2007) Fisiologia de leguminosas com potencial fitoextrator para o metal pesado cádmio. Dissertação - Instituto Agronômico de Campinas IAC - Campinas: 72p.

Salt, D.E., Kato, N., Kramer, U., Smith, R.D., Raskin, I. (2000) The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC: 189-200.

Salt, D.E., Rausser, W.E. (1995) MgATP-Dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. Plant Physiology **107**: 1293-1301.

Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998) Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. **49**: 643-668.

Samardakiewicz, S., Wozny, A. (2005) Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. Aquatic Botany **83**: 289-295.

Schwab, A.P., Zhu, D.S., Banks, M.K. (2008) Influence of organic acids on the transport of heavy metals in soil. Chemosphere **72**: 986-994.

- Sharma, P., Dubey, R.S.** (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. **17 (1)**: 35-52.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J.** (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 711-726.
- Singh, R.P., Tripathi, R.D., Dabas, S., Rizvi, S.M.H., Ali, M.B., Sinha, S.K., Gupta, D.K., Mishra, S., Rai, U.N.** (2003) Effect of lead on growth and nitrate assimilation of *Vigna radiata* (L.) Wilczek seedlings in a salt affected environment. *Chemosphere* **52**: 1245-1250.
- Smith, S., Read, D.** (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego and London 2nd ed. 605p.
- Soares, C.R.F.S., Siqueira, J.O.** (2008) Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. *Biology and Fertility of Soils* **44**: 833-841.
- Stillman, M.J.** (1995) Metallothioneins. *Coordination Chemistry Reviews* **144**: 461-511.
- Stolt, J.P., Sneller, F.E.C., Bryngelsson, T., Lundborg, T., Schat, H.** (2003) Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environmental and Experimental Botany* **49**: 21-28.
- Stürmer, S.L.** (2004) Efeito de diferentes isolados fúngicos da mesma comunidade micorrízica no crescimento e absorção de fósforo em soja e trevo vermelho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **28**: 611-622.
- Sudova, R., Vosatka, M.** (2007) Differences in the effects of three arbuscular mycorrhizal fungal strains on P and Pb accumulation by maize plants. *Plant and Soil* **296**: 77-83.
- Taiz, L., Zeiger, E.** (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 573p.
- Tuin, B.J.W., Tels, M.** (1990) Removing heavy metals from contaminated clay soils by extraction with hydrochloric acid, edta or hypochlorite solutions. *Environmental Technology* **11**: 1039 - 1052.
- Van Assche, F., Clijsters, H.** (1990) Effects of metals on enzymes activity in plants. *Plant, Cell and Environment* **13**: 195-206.
- Verma, S., Dubey, R.S.** (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* **164**: 645-655.
- Wahid, A., Ghani, A., Ali, I., Ashraf, M.Y.** (2007) Effects of cadmium on carbon and nitrogen assimilation in shoots of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] seedlings. *Journal of Agronomy & Crop Science* **193**: 357-365.
- Wang, C.R., Wang, X.R., Tian, Y., Xue, Y.G., Xu, X.H., Sui, Y.X., Yu, H.X.** (2008) Oxidative stress and potential biomarkers in tomato seedlings subjected to soil lead contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **71**: 685-691.

- Wang, Y., Li, Q., Shi, J., Lin, Q., Chen, X., Wu, W., Chen, Y.** (2008) Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1167-1177.
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A.** (2008) Effects of heavy metal toxicity on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake in pea grown in metal amended soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **81**: 152-158.
- Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., Tang, M.** (2009) Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from the root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*. **162**: 50-56.
- Weissenhorn, I., Leyval, C.** (1995) Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sad culture. *Plant Soil* **175**: 233-238.
- Wierzbicka, M., Obidzinska, J.** (1998) The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Science* **137**: 155-171.
- Wierzbicka, M.H., Przedpelska, E., Ruzik, R., Ouerdane, L., Polec-Pawlak, K., Jarosz, M., Szpunar, J., Szakiel, A.** (2007) Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. *Protoplasma* **231**: 99-111.
- Wild, H.** (1970) The vegetation of nickel-bearing soils. *Kirkia* 7 (Suppl.): 11-62.
- Wojas, S., Ruszczynska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M., Antosiewicz, D.M.** (2007) Ca^{2+} -dependente plant response to Pb^{2+} is regulated by LCT. *Environmental Pollution* **147**: 584-592.
- Wong, C.C., Wu, S.C., Kuek, C., Khan, A.G., Wong, M.H.** (2007) The role of mycorrhizae associated with vetiver grown in Pb-/Zn-contaminated soils: Greenhouse study. *Restoration Ecology* **15**: 60-67.
- Xia, W., Gao, H., Wang, X., Zhou, C., Liu, Y., Fan, T., Wang, X.** (2009) Application of EDTA decontamination on soils affected by mining activities and impact of treatment on the geochemical partition of metal contaminants. *Journal of Hazardous Materials* **164**: 936-940.
- Zenk, M.H.** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* **179**: 21-30.
- Zornoza, P., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pacual, M., Carpena, R.** (2002) Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 1003-1009.