

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SARAH CAROLINE RIBEIRO DE SOUZA



**TOLERÂNCIA AOS METAIS PESADOS CHUMBO E
ZINCO E POTENCIAL FITORREMEIADOR DE
MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Sarah Caroline Ribeiro de Souza
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do título de
mestre em Biologia Vegetal.**

M. Schiavinato

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Co-orientadora: Sara Adrián López Andrade

CAMPINAS, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So89t

Souza, Sarah Caroline Ribeiro de
Tolerância aos metais pesados chumbo e zinco e
potencial fitorremediador de mudas de espécies arbóreas /
Sarah Caroline Ribeiro de Souza. – Campinas, SP: [s.n.],
2010.

Orientadores: Marlene Aparecida Schiavinato, Sara
Ádrian Lopez de Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Plantas – Efeito dos metais pesados. 2.
Leguminosa arbórea. 3. Fitorremediação. I. Schiavinato,
Marlene Aparecida, 1953-. II. Andrade, Sara Ádrian Lopez
de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Tolerance to the heavy metals lead and zinc and phytoremediation potential of seedlings of tree species.

Palavras-chave em inglês: Plants, Effect of heavy metals on; Phytoremediation; Leguminous trees.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marlene Aparecida Schiavinato, Adriana Parada Dias da Silveira, Ladaslav Sodek.

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

M. Schiavinato

Profa. Dra. Adriana Parada Dias da Silveira

Adriana

Profa. Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa

Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Profa. Dra. Mônica Ferreira de Abreu

*A minha família, em especial aos meus pais
Elio e Geralda, por todo apoio e incentivo e
pelo amor incondicional, dedico.*

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente.

A minha família, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

À Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, sem os quais seria impossível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Dra. Marlene Aparecida Schiavinato, pela orientação, apoio, amizade e confiança dedicada à realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Sara Adrián Lopez de Andrade, também pela orientação, pelo apoio, amizade e confiança dedicada à realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, especialmente à Néia e ao Luciano pela ajuda nas análises, no cuidado às plantas e pela amizade.

A todos os colegas e amigos do departamento, em especial, Adaíses, Raphael, Lívia, Lucas Cutri, Lucas Anjos, Luciana Menolli, Adriana e Luciano, pela amizade, ajuda, compreensão e pelos momentos de descontração proporcionados.

Aos professores Ladaslav Sodek, Ana Lagôa, Adriana Parada Dias, pelas valiosas críticas e sugestões durante a realização da pré banca.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| RESUMO | viii |
| SUMMARY | x |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 Considerações gerais | 12 |
| 1.2 Metais Pesados: Chumbo e Zinco | 13 |
| 1.3 Fitorremediação | 16 |
| 1.4 Fungos Micorrízicos arbusculares (FMAs) e MPs | 19 |
| 1.5 Fixação Biológica de Nitrogênio em leguminosas | 21 |
| 1.6 Leguminosas arbóreas e recuperação de áreas degradadas | 24 |
| 2. OBJETIVO..... | 25 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1 Delineamento Experimental | 26 |
| 3.2 Material vegetal | 26 |
| 3.3 Amostragem e preparação do solo..... | 27 |
| 3.4 Condições de crescimento das plantas..... | 27 |
| 3.5 Inoculação de FMA e rizóbio | 28 |
| 3.6 Variáveis analisadas | 29 |
| 3.6.1 Medidas de crescimento | 29 |
| 3.6.2 Determinação de Pb e nutrientes na parte aérea e nas raízes das plantas | 29 |
| 3.6.3 Teores de clorofilas e carotenóides | 30 |
| 3.6.4 Atividade específica da nitrogenase | 30 |
| 3.6.5 Determinações bioquímicas..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 3.6.6 Colonização micorrízica..... | 31 |
| 3.7 Análise Estatística..... | 32 |
| 4. RESULTADOS | 33 |
| 4.1 Experimento I – Zn..... | 33 |
| 4.1.1 Germinação..... | 33 |
| 4.1.2 Resultados das medidas de crescimento..... | 33 |
| 4.1.3 Nutrição Mineral..... | 37 |
| 4.1.4 Pigmentos | 43 |
| 4.1.5 Atividade da Nitrogenase | 45 |
| 4.1.6 Determinações bioquímicas..... | 45 |
| 4.1.7 Colonização Micorrízica..... | 46 |
| 4.2 Experimento II – Pb..... | 47 |
| 4.2.1 Germinação..... | 47 |
| 4.2.2 Resultados das medidas de crescimento..... | 47 |
| 4.2.3 Nutrição Mineral..... | 50 |
| 4.2.4 Pigmentos | 57 |
| 4.2.5 Atividade da nitrogenase | 59 |
| 4.2.6 Determinações bioquímicas..... | 59 |
| 4.2.7 Colonização Micorrízica..... | 61 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 62 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 73 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |

RESUMO

A contaminação do solo por metais pesados (MPs), causada por processos naturais ou atividade humana, é um dos mais graves problemas ambientais devido à persistência e alto poder de toxicidade dos MPs. Em ambientes contaminados por MPs, as plantas podem apresentar uma série de distúrbios fisiológicos e nutricionais. No entanto, algumas espécies de plantas são tolerantes aos MPs e essa tolerância tem sido selecionada durante a evolução, e envolve diversos mecanismos. A associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode reduzir os efeitos negativos do estresse induzido por altas concentrações de metais sobre a planta hospedeira. Considerando a existência de plantas tolerantes, a fitorremediação, especialmente com espécies arbóreas, aparece como uma estratégia eficiente para a reabilitação de áreas contaminadas com MPs, uma vez que essas espécies imobilizam os metais absorvidos por mais tempo em seus tecidos. Assim, este estudo teve como objetivos: avaliar a tolerância, o acúmulo e a distribuição dos MPs, Pb e Zn, em três espécies de leguminosas nas diferentes partes das plantas; avaliar a influência destes metais na colonização micorrízica e na fixação biológica de nitrogênio e avaliar o potencial fitorremediador de cada espécie. Foram realizados dois experimentos, um com Pb e outro com Zn, com delineamento experimental totalmente casualizado e em esquema fatorial 3 x 4. Os tratamentos consistiram em três espécies de leguminosas arbóreas *Mimosa caesalpiniaefolia* (sansão-do-campo), *Erythrina speciosa* (eritrina-candelabro) e *Schizolobium parahyba* (guapuruvu) e quatro concentrações de metais, 0, 250, 500 e 1000 mg.dm⁻³ de Pb e 0, 200, 400 e 600 mg.dm⁻³ de Zn, adicionados ao solo na forma de acetato de chumbo e sulfato de zinco. Após aproximadamente 180 dias de cultivo as mudas foram coletadas. Determinaram-se altura, área foliar total, massa da matéria seca (MS) da parte

aérea e raízes, número de nódulos e MS de nódulos das espécies que nodulam. Na espécie que não nodula, *S. parahyba*, foi feita a medição da raiz pivotante e o volume total de raízes. Foram feitas as determinações dos teores de Pb e Zn, dos nutrientes essenciais e calculado o índice de translocação (IT). Foram determinados o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, a atividade da nitrogenase, aminoácidos livres, nitrato, amônia, peroxidação lipídica (MDA) e a taxa de colonização micorrízica. Os dados foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e teste de Tukey. Verificou-se que altas concentrações de Zn adicionadas ao solo afetam mais significativamente o desenvolvimento de mudas de espécies arbóreas quando comparadas às concentrações de Pb utilizadas. Todas as espécies apresentam maiores concentrações de Zn e Pb nas raízes que agem como uma barreira à translocação dos MPs, considerado um mecanismo de fitoestabilização. O fato de serem espécies de leguminosas arbóreas de crescimento rápido, de fácil propagação, sistema radicular extenso e aliado ao fato de conseguirem absorver e concentrar os metais pesados Pb e Zn em suas raízes, sugere que estas espécies arbóreas analisadas podem ser potenciais plantas fitorremediadoras de solos moderadamente contaminados, sendo que, para o Pb a espécie mais tolerante seria *M. caesalpiniaefolia* e para o Zn, a *E. speciosa*.

SUMMARY

Soil contamination by heavy metals (HM), caused by natural processes or human activity, is one of the most serious environmental problems due to their persistence and high toxicity potential. In HM contaminated environments, plants may present a series of physiological and nutritional disorders. However, some plant species are tolerant to HM and this tolerance has been selected during evolution. The mechanisms involved in plant tolerance to HM excess are diverse and varied. The association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can reduce the negative effects of stress induced by high concentrations of metals to the host plant. Considering the existence of tolerant plants, phytoremediation appears as an efficient strategy for the rehabilitation of areas contaminated with HM, especially using tree species, since these species immobilize absorbed metals for greater time periods in their tissues. Thus, this study aimed to evaluate the tolerance, accumulation and distribution of Pb and Zn in three species of leguminous trees, and further, to evaluate the influence of these metals in mycorrhizal colonization and nitrogen fixation and evaluate the phytoremediator potential of each of the studied species. For this purpose, two experiments were conducted, one with Pb and another with Zn, with a completely randomized experimental design in a factorial 3 x 4 scheme. The treatments consisted of three species of tree legumes *Mimosa caesalpiniaefolia* (sansão-do-campo), *Erythrina speciosa* (eritrina-candelabro) and *Schizolobium parahyba* (guapuruvu) and four concentrations of metal, 0, 250, 500 and 1000 mg.dm⁻³ Pb and 0, 200, 400 and 600 mg.dm⁻³ Zn added to soil in the form of lead acetate and zinc sulfate. Approximately 180 days after sowing, the seedlings were collected. We determined the height and total leaf area, the dry matter (DM) of shoots and roots, nodule number and nodule DM of nodulating species. In species that do not

nodulate, *S. parahyba*, measurements were made of the tap root and root volume. Determinations were made of the levels of Pb and Zn as well as essential nutrients and the rate of translocation (IT) was calculated. The content of photosynthetic pigments was determined as well as photosynthesis, nitrogenase activity, amino acids, nitrate, ammonia and lipid peroxidation (MDA) and the rate of colonization was estimated. The data were subjected to analysis of variance, regression analysis and the Tukey test (5% significance). It was found that the higher concentrations of Zn added to soil affected the development of seedlings of the tree species studied more significantly than those of Pb. All species had higher Zn and Pb concentrations in their root, indicating this organ acts as a barrier for metal translocation to the shoots in these plants, considered a phytostabilization mechanism. The fact that these species are fast growing, easily propagated and have a extensive root system that can absorb and concentrate Pb and Zn, suggests that they have potential for use in phytoremediation of contaminated soils.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A contaminação do solo por metais pesados (MPs), causada por processos naturais ou pela atividade humana, é um dos mais sérios problemas ambientais, devido à persistência e alto poder de toxicidade dos MPs (Reddy & Prasad, 1990), além de provocar efeitos prejudiciais, diminuindo a qualidade dos ecossistemas e impedindo o desenvolvimento da agricultura (Gratão *et al.*, 2005; Gohre & Paszkowski, 2006).

Em ambientes contaminados por MPs, as plantas podem apresentar uma série de distúrbios fisiológicos e nutricionais, tais como diminuição da biomassa, clorose, inibição da fotossíntese, alteração no balanço hídrico e hormonal (Paiva *et al.*, 2002; Andrade, *et al.*, 2004; Sharma & Dubey, 2005; Broadley *et al.*, 2007)

Algumas espécies vegetais, no entanto, são tolerantes aos MPs (Hall, 2002) e essa tolerância tem sido selecionada durante a evolução (Patra *et al.* 2004).

Os mecanismos envolvidos na tolerância das plantas ao excesso de MPs são diversos e variados, incluindo a exsudação de substâncias quelantes; a produção intracelular de substâncias quelantes, tais como ácidos orgânicos e fitoquelatinas; metalotioneínas; alterações na compartimentalização dos metais na célula; retenção do metal na raiz, evitando sua translocação para a parte aérea; biotransformação e mecanismos de reparo celular; imobilização do metal na parede celular; desenvolvimento de enzimas tolerantes ao metal; aumento da tolerância à deficiência mineral e aumento da absorção de certos macronutrientes (Shaw, 1989; Almeida *et al.* 2007). Além disso, a associação com fungos

micorrízicos arbusculares (FMAs) pode ser considerada um mecanismo de tolerância das plantas, já que pode diminuir os efeitos negativos do estresse induzido por altas concentrações de MPs e exercer efeito protetor à planta hospedeira (Hall, 2002; Andrade *et al.*, 2003).

1.2 Metais Pesados: Chumbo e Zinco

Os metais pesados são elementos que ocorrem naturalmente no solo, sendo que alguns são essenciais para o desenvolvimento vegetal, como Fe, Cu, Mo, Mn, Zn e outros metais como Cr, Cd, Pb, As e Hg que não têm ação biológica conhecida nas plantas . Porém, todos os MPs, quando ocorrem em elevadas concentrações, podem causar danos ao meio ambiente e à cadeia alimentar (Malavolta, 1994).

São considerados MPs cerca de 65 elementos metálicos, de densidade maior que 5 g.cm⁻³, que apresentam a capacidade de promover efeitos tóxicos em células microbianas e em outras formas de vida (Gadd, 1992; Tan, 2000).

Íons metálicos potencialmente tóxicos penetram nas células usando os mesmos processos de absorção de íons considerados nutrientes essenciais. A quantidade absorvida pela planta depende da concentração de MPs e da disponibilidade destes no solo, sendo esta última dependente do pH (Patra *et al.*, 2004; Almeida *et al.* 2007). A quantidade desses íons metálicos translocada para a parte aérea depende da espécie vegetal, do metal em questão e das condições ambientais (Paiva *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007).

O zinco (Zn) é o segundo metal mais abundante nos organismos depois do ferro (Fe), sendo o único metal representado nas seis diferentes classes de enzimas: oxidoredutases, transferases, hidrolases, ligases, liases e isomerases (Broadley *et al.*, 2007).

É um elemento essencial ao desenvolvimento normal das plantas, sendo absorvido da solução do solo primariamente como Zn^{2+} , mas também pode estar complexado a compostos orgânicos ligantes, sendo absorvido pela raiz e transportado ao caule via xilema (Broadley *et al.*, 2007). Entretanto, em elevadas concentrações, principalmente em solos ácidos, esse elemento pode se tornar tóxico, levando à redução do crescimento vegetal. Sintomas de toxicidade ao Zn incluem deficiência induzida de Fe, levando à clorose pela diminuição da síntese de clorofila e degradação dos cloroplastos, além de interferir na entrada de fósforo (P), magnésio (Mg) e manganês (Mn) (Carroll & Loneragan, 1968; Chaney, 1993; Broadley *et al.*, 2007).

O chumbo (Pb) é um metal não essencial às plantas e um dos maiores poluentes de ecossistemas, pois se acumula prontamente nos solos e sedimentos. Além dos processos naturais de intemperismo, as principais fontes de Pb no solo são os escapamentos de automóveis, chaminés de indústrias que utilizam Pb, mineração e fundição do minério de Pb, fertilizantes, pesticidas, pigmentos e a deposição atmosférica do Pb presente na gasolina que o possui como aditivo (Sharma & Dubey, 2005a).

O Pb está disponível para as plantas no solo e em fontes aerossóis. Estudos sobre entrada de Pb nas plantas demonstram que as raízes tem habilidade de retirar grandes quantidades desse MP do solo, enquanto que simultaneamente tem o grande poder de restringir seu transporte á parte aérea (Lane & Martin, 1977).

Sintomas não-específicos de toxicidade ao Pb são a rápida inibição do crescimento radicular, o crescimento retardado da planta e a clorose. (Burton *et al.*, 1984). Ao atingir o interior das células, o Pb mesmo em pequenas quantidades, produz efeitos adversos nos processos fisiológicos. A fitotoxicidade por Pb inibe a atividade de algumas enzimas, promove distúrbios na nutrição mineral, no balanço hídrico vegetal, nas mudanças no estado hormonal e pode alterar a permeabilidade das membranas celulares (Sharma & Dubey, 2005a).

Muitos países desenvolvidos, como Holanda, França, Alemanha, Canadá e Estados Unidos, apresentam órgãos especializados em controle e inspeção da poluição de solos, ar e águas subterrâneas (CETESB, 2001). No Brasil o único órgão dessa competência está no Estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB. Os valores orientadores com relação à contaminação estabelecidos pela CETESB são, dessa forma, utilizados como referência para todo o país.

A CETESB estabelece valores de referência, de alerta e de intervenção: que representam a concentração de uma determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo. Têm caráter preventivo, evitando que o solo em estudo torne-se uma área contaminada. No caso de solos, o valor de referência de qualidade, que foi baseado em análises químicas dos diversos tipos de solos do Estado de São Paulo, indica o nível de qualidade para um solo considerado limpo, a ser utilizado em ações de prevenção da poluição do solo e no controle de áreas contaminadas. O valor de alerta, baseado no caso de metais na sua fitotoxicidade, indica uma possível alteração da qualidade natural dos solos, e é utilizado em caráter preventivo. O valor de intervenção indica o limite de contaminação do solo, acima do qual, existe risco potencial à saúde

humana, e quando excedido requer alguma forma de intervenção na área avaliada, de forma a interceptar as vias de exposição (CETESB 2001, 2005).

A CETESB adota os valores orientadores acima estabelecidos, por um período de vigência de quatro anos, aplicando-os tanto na prevenção da poluição de solos e águas subterrâneas, como no controle de áreas contaminadas (CETESB 2001).

Os valores orientadores de contaminação para o Pb e Zn no solo, em mg.kg^{-1} , no Estado de São Paulo são respectivamente: valores de prevenção: 72 e 300; valores de intervenção em área agrícola, residencial e industrial; 180, 300 e 900, e 450, 1000 e 2000 (CETESB, 2005).

Com relação à concentração dos MPs Pb e Zn consideradas tóxicas nos tecidos vegetais, Kabata-Pendias & Pendias (2001) sugerem que concentrações na planta entre 100 e 400, e, entre 30 e 300 mg.kg^{-1} de massa seca de tecido da parte aérea para o Zn e Pb, respectivamente, são tóxicas.

1.3 Fitorremediação

A fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas para remover poluentes do solo ou torná-los inofensivos (Salt *et al.*, 1998). As diferentes categorias de fitorremediação incluem: fitoextração, fitodegradação, fitovolatilização, fitoestimulação e fitoestabilização. A fitoestabilização consiste no uso de plantas para imobilizar contaminantes, reduzindo a sua disponibilidade no solo. Na fitoextração a planta absorve o contaminante, transportando-o para a parte aérea onde é acumulado em altas concentrações. Na fitovolatilização as plantas ou a atividade da microbiota associada às raízes ajudam a

umentar a taxa de volatilização de contaminantes. Na fitodegradação as plantas absorvem e metabolizam o contaminante tornando-o menos tóxico. Já na fitoestimulação, as raízes das plantas, em conjunto ou não com a microbiota associada, e os produtos excretados na rizosfera decompõem o contaminante (Accioly & Siqueira 2000).

Essa técnica tem se tornado uma importante ferramenta para a remediação de solos contaminados, uma vez que proporciona a recuperação do local, a descontaminação, a manutenção da atividade biológica e a estrutura física dos solos, sendo potencialmente mais barata que outras tecnologias. Além disso, existe a possibilidade de recuperar os metais acumulados na planta, por meio da chamada biomineração, na qual podem ser recuperados metais de interesse econômico, ou, ainda, no caso de metais essenciais, podem ser utilizados como fertilizantes para plantas (Baker *et al.*, 1981, 1994). Aliado a isso, a existência de plantas que conseguem acumular grandes quantidades de metais, hiperacumuladoras, otimizaram o uso da fitorremediação. Segundo Raskin *et al.* (1994), plantas hiperacumuladoras são capazes de extrair e acumular mais de 10.000 mg.kg⁻¹ de Zn e Mn, mais de 1.000 de Pb, Ni e Cu, e mais de 100 de Cd, sendo consideradas promissoras para uso na fitorremediação de solos contaminados com metais.

A fitorremediação, utilizando especialmente espécies arbóreas, é uma estratégia para a reabilitação de áreas contaminadas com MPs uma vez que estas espécies imobilizam os metais absorvidos (fitoestabilização) por mais tempo em seus tecidos, reduzindo os impactos ambientais destes elementos (Accioly & Siqueira 2000; Soares *et al.* 2001; Pulford & Watson 2003).

Espécies arbóreas em geral produzem alta biomassa, tem sistema radicular extenso e determinadas espécies tem uma enorme variabilidade genética (Pulford & Watson, 2003).

Esta variedade de genomas e tolerância facultativa, como por exemplo, a redistribuição das raízes para as zonas menos contaminadas do solo, permite a sobrevivência das árvores não selecionadas para tolerância a metais em solos poluídos. Vários estudos têm mostrado que a aclimação de árvores para o ambiente do solo pos-transplântio é de grande importância e pode ser um fator significativo na sobrevivência da árvore em solo contaminado com metais. Entretanto a fertilidade do solo, assim como a presença de fungos micorrízicos, são importantes, pois podem aumentar a resistência das árvores aos metais (Dickinson *et al.*, 1992; Pulford & Watson, 2003).

Soares, *et al.* (2001) reportaram, no entanto, que mudas de diferentes espécies arbóreas apresentaram comportamento distinto em relação aos teores, à distribuição/acúmulo de metais nos diferentes órgãos vegetais e também quanto à tolerância ao excesso de MPs no meio.

São escassos os estudos de fitorremediação utilizando espécies arbóreas. No entanto, a falta de relatos acerca de sintomas de toxicidade em espécies arbóreas indica que os mecanismos de tolerância nelas existentes lhes permitem suportar melhor a contaminação do solo com MPs do que as culturas agrícolas (Pulford & Watson, 2003). Algumas árvores, apesar de não serem especialmente selecionadas para tolerância a metais, geralmente conseguem sobreviver em solo contaminado, ainda que apresentando crescimento normalmente muito reduzido em relação àquelas crescendo em solos não contaminados (Dickinson *et al.*, 1992; Pulford & Watson, 2003). Assim, é importante que mais esforços sejam realizados em estudos de fitorremediação de solos contaminados com MPs, utilizando espécies arbóreas (Caires, 2005, Cupertino, 2006).

1.4 Fungos Micorrízicos arbusculares (FMAs) e MPs

A simbiose entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e plantas é provavelmente a mais generalizada das simbioses terrestres, sendo formada em 70-90% das espécies de plantas terrestres com fungos do filo Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001). O desenvolvimento simbiótico resulta no estabelecimento do fungo no córtex radicular e na formação de estruturas intracelulares altamente ramificadas chamadas arbúsculos, os quais são o principal local de troca de nutrientes entre o fungo e planta (Parniske, 2008). Os FMAs associados às raízes crescem também extra-radicalmente, podendo estender suas hifas vários centímetros da raiz, aumentando o volume de solo explorado pelas plantas. Estas hifas são especializadas na absorção de nutrientes, predominantemente fosfato, e água (Finlay, 2008). Os efeitos benéficos dos FMAs são mais evidentes em condições de limitada disponibilidade de nutrientes. Embora os mecanismos reguladores não sejam totalmente compreendidos, a colonização radicular normalmente diminui quando os nutrientes estão em abundância ou altamente disponíveis para as plantas (Liu *et al.*, 2007).

Recentemente, estudos têm demonstrado que a inoculação de FMAs promove benefícios para o crescimento de plantas em solos contaminados com MPs, como verificado para soja (Andrade *et al.*, 2003), milho (Weissenhorn & Leyval, 1995), outras plantas herbáceas (Carneiro *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004) e mudas de plantas arbóreas (Soares *et al.*, 2006; Arriagada *et al.*, 2007; Lins *et al.*, 2007). Esses estudos evidenciam o efeito protetor desta simbiose para a planta hospedeira, mas os mecanismos envolvidos ainda não são bem conhecidos (Schutzendubel & Polle, 2002). No entanto, a tolerância de plantas associadas a FMAs aos MPs pode variar em larga extensão dependendo do metal, do fungo e da espécie hospedeira envolvidos, da concentração do metal no solo, do padrão

de colonização fúngica e das condições de crescimento das plantas (Weissenhorn & Leyval, 1995).

Arriagada *et al.* (2007) observaram que a presença de alta concentração de Pb no solo reduziu o desenvolvimento intra-radical do FMA e conseqüentemente diminuiu a sua contribuição para o acúmulo de Pb em *Eucalyptus globulus*.

Alguns autores têm proposto que FMAs agem como uma barreira para a transferência de metais do solo para as plantas, reduzindo a transferência do metal para a parte aérea e, conseqüentemente, diminuindo a fitotoxicidade. Isso pode estar relacionado com a capacidade de retenção de MPs nas estruturas fúngicas (Carneiro *et al.*, 2001; Andrade *et al.* 2003; Andrade *et al.*, 2004). Além disso, é provável que as micorrizas possam contribuir para reduzir a fitotoxicidade dos metais em decorrência do aumento da absorção de P pela planta hospedeira (Andrade *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2006).

Diferenças na eficiência de FMAs em relação à absorção e tolerância a MPs por plantas têm sido relatadas por vários autores, evidenciando que a associação entre planta e FMA é importante para que haja um efeito benéfico da micorriza em solos contaminados por metais (Hildebrandt *et al.*, 1999; Joner *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Silva *et al.* 2006; Arriagada *et al.*, 2007).

Hildebrandt *et al.* (1999) observaram que o isolado de FMA *Glomus intraradices* Br1, obtido de solo contaminado com MPs, conferiu tolerância a uma variedade de plantas, em diversos solos pouco férteis e contaminados com MPs. Além disso, o isolado Br1 foi mais efetivo em transferir tolerância a MPs em tomate, milho e *Medicago truncatula* que o isolado originário de solos não contaminados, *G. intraradices* Sy167, freqüentemente

utilizado por esses pesquisadores para diferentes estudos de interação entre FMA-planta (Hildebrandt *et al.*, 2007). Esses resultados reforçam a importância de FMAs nativos, os quais apresentam maior potencial de adaptação às altas concentrações de metais no solo (Del Val *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2006; Hildebrandt *et al.*, 2007).

Trabalhando com a gramínea *Brachiaria decumbens*, Silva *et al.* (2006) observaram que vários isolados de FMA contribuíram para a redução dos teores de Zn e de Cd na parte aérea desta planta.

Dessa forma, como são escassos os estudos relacionados à influência de MPs sobre espécies arbóreas, as quais normalmente são muito dependentes de micorrizas, devem-se empenhar esforços no sentido de conhecer as consequências da inoculação de FMAs e da contaminação por MPs em termos de tolerância, acumulação e influência na colonização micorrízica.

1.5 Fixação Biológica de Nitrogênio em leguminosas

Algumas bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N_2) e convertê-lo em amônio, forma disponível para as plantas, processo conhecido por fixação biológica de nitrogênio (FBN). A maior parte dessas bactérias tem vida livre no solo e algumas se associam simbioticamente com algumas espécies de plantas, principalmente da família Leguminosae. Na associação simbiótica entre leguminosas e estas bactérias coletivamente chamadas de rizóbios, a planta supre às bactérias com fotoassimilados, que são fonte de energia para a atividade da enzima nitrogenase e os rizóbios, por sua vez, suprem as plantas com amônio o qual é posteriormente utilizado por estas para a produção de compostos

nitrogenados. Tal simbiose ocorre nos nódulos formados nas raízes destas plantas. Os rizóbios reduzem o N_2 em amônio com ajuda da enzima nitrogenase. Por ser irreversivelmente inativada pelo oxigênio, a nitrogenase fixa N_2 em condições anaeróbicas, sendo que o processo utiliza uma grande quantidade de energia (Dixon & Wheeler, 1986; Zahran, 1999). A simbiose entre rizóbios e leguminosas é a principal fonte de nitrogênio fixado em sistemas baseados no solo e pode fornecer mais da metade da origem biológica do nitrogênio fixado (Mulongoy *et al.* 1992). A deficiência de nitrogênio mineral, muitas vezes limita o crescimento da planta (Graham & Vance, 2000) e, assim, essas relações simbióticas podem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento vegetal e na recuperação de solos degradados ou com deficiência desse elemento.

Diversas condições ambientais podem ser fatores limitantes ao crescimento e à atividade das plantas que apresentam simbiose com rizóbios. Na simbiose *Rhizobium-leguminosa*, o processo de fixação de N_2 está fortemente relacionado ao estado fisiológico da planta hospedeira. Portanto, sob efeito persistente de fatores limitantes, tais como salinidade, deficiência de nutrientes, MPs, temperaturas extremas, entre muitos outros, o rizóbio não é capaz de expressar sua capacidade total no processo de fixação (Brockwell, *et al.* 1995; Zahran, 1999).

Os MPs podem prejudicar as associações simbióticas e afetar o adequado desenvolvimento das plantas hospedeiras (Porter & Sheridan, 1981; Obbard & Jones, 2001).

Porter & Sheridan (1981) trabalhando com alfafa em solo contaminado com MPs além de observarem redução na atividade da nitrogenase e conseqüentemente na FBN, verificaram também uma alta sensibilidade do sistema de fixação de nitrogênio ao Zn, e

acreditam que esta sensibilidade reside nos rizóbios, uma vez que estes são altamente sensíveis a baixas concentrações de Zn no meio de crescimento. Esses autores também afirmam que a redução ou inibição da atividade da nitrogenase durante um período de anos, pode diminuir a fertilidade e a capacidade de produção dos sistemas naturais e agrícolas afetados, o que não deve ser ignorado, considerando-se a importância da contribuição do nitrogênio fixado pelas leguminosas nesses ambientes.

A infecção micorrízica nas raízes de leguminosas tem sido relatada por estimular tanto a nodulação quanto a fixação de N₂, especialmente em solos com baixa disponibilidade em P (Ganry *et al.*, 1982; Redecker *et al.*, 1997).

Redecker *et al.* (1997) trabalhando com as interações entre feijão (*Phaseolus vulgaris*), cepas de *Rhizobium* spp. e FMAs, observaram um envolvimento específico das espécies de FMAs na aquisição de nitrogênio nessas leguminosas tanto na fixação simbiótica de nitrogênio (FBN), quanto na aquisição do nitrogênio do solo. Verificaram também, que em solos de baixo P disponível, os efeitos da simbiose micorrízica podem levar a melhoria da eficiência da FBN e/ou levar a melhora na absorção de N no solo.

Os processos biológicos como a fixação de N₂ mantêm a dinâmica do solo, sendo importantes para o ecossistema, além disso, são capazes de melhorar a produtividade agrícola, minimizando as perdas do solo, melhorando as condições edáficas adversas, tornando a FBN essencial para a manutenção da estrutura do solo (Zahran, 1999; Barea *et al.*, 2005).

1.6 Leguminosas arbóreas e recuperação de áreas degradadas

A família Leguminosae é a terceira maior família de Angiospermas e compreende aproximadamente 650 gêneros e 18.000 espécies, distribuídas nas subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) e Mimosoideae (Polhill *et al.*, 1981).

A capacidade de fixação de nitrogênio pelo rizóbio associado, aliada ao extenso sistema radicular possibilita o crescimento de leguminosas arbóreas em locais sujeitos à erosão, com baixa fertilidade do solo ou em outras condições adversas. Uma vez estabelecidas, elas podem criar condições favoráveis para o crescimento de outras espécies vegetais levando a um ecossistema equilibrado (Gutteridge & Shelton, 1998).

Estudos demonstram que o estabelecimento de leguminosas arbóreas micorrizadas e noduladas, em áreas remanescentes de mineração, tem obtido sucesso, permitindo o posterior estabelecimento de espécies nativas por regeneração natural (Franco *et al.* 1996).

Práticas de reflorestamento e recuperação de solos com leguminosas arbóreas constituem uma opção para a restauração de solos degradados, uma vez que muitas dessas árvores têm rápido crescimento, múltiplo uso, além de fácil propagação e estabelecimento, favorecido por seu extenso sistema radicular, pela associação micorrízica e pela fixação biológica de nitrogênio.

2. OBJETIVO

- Avaliar a tolerância de três espécies de leguminosas arbóreas a diferentes concentrações de chumbo e zinco no solo, com vista à fitorremediação e verificar o efeito do excesso desses metais no estabelecimento das relações simbióticas com FMAs e bactérias fixadoras de N₂.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Foram realizados dois experimentos no mesmo período:

Experimento I: Influência do Zn no desenvolvimento, na tolerância e no acúmulo de Zn em três espécies arbóreas.

Experimento II: Influência do Pb no desenvolvimento, na tolerância e no acúmulo de Pb em três espécies arbóreas.

Com delineamento experimental completamente casualizado e em esquema fatorial 3 x 4, os tratamentos consistiram de três espécies de leguminosas arbóreas e quatro concentrações de metal. Foram realizadas sete repetições para cada um dos 12 tratamentos de cada um dos experimentos, o que totalizou 168 parcelas experimentais.

3.2 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* - Leg. Mimosoideae (sansão-do-campo), provenientes do Instituto Florestal de São Paulo, *Erythrina speciosa* - Leg. Faboideae (eritrina-candelabro) provenientes de um indivíduo presente na área experimental do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e *Schizolobium parahyba* - Leg. Caesalpinoideae (guapuruvú), provenientes de um indivíduo do arboreto da mesma Universidade.

3.3 Amostragem e preparação do solo

O solo utilizado nos experimentos foi submetido a análise físico-química e, com base nos resultados desta análise, foi realizada correção da fertilidade e do pH com o fim de garantir o crescimento das plantas. O Pb e o Zn foram adicionados na forma de soluções aquosas de acetato de chumbo $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ e sulfato de zinco $[\text{Zn}(\text{SO}_4)]$, nas concentrações de 0, 250, 500 e 1000 mg dm^{-3} de Pb e 0, 200, 400 e 600 mg dm^{-3} de Zn.. Após isso, o solo foi incubado por 20 dias para permitir a reação dos metais com os componentes do solo. Depois desse período de incubação, amostras compostas do solo de cada tratamento foram enviadas para análise físico-química no Laboratório de Análise de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC (Tabela 1).

Tabela 1: Análise físico-química do solo contaminado e não-contaminado com Zn no experimento I e com Pb no experimento II.

| Amostra | M.O. | pH | P | K | Ca | Mg | H+Al | S.B. | C.T.C. | V% | Cu | Fe | Mn | Zn | Pb |
|---------------------|--------------------|-----|---------------------|-----|----|-----------------------|------|------|--------|----|-----|----|---------------------|-------|-------|
| mg dm^{-3} | g dm^{-3} | | mg dm^{-3} | | | mmol dm^{-3} | | | | % | | | mg dm^{-3} | | |
| 0 | 18 | 5,0 | 17 | 3,6 | 24 | 6 | 34 | 33,6 | 68 | 50 | 4,1 | 8 | 7,5 | 0,9 | 4,5 |
| 250 Pb | 18 | 4,8 | 22 | 3,3 | 22 | 5 | 34 | 30,3 | 65 | 47 | 4,8 | 10 | 6,8 | 0,8 | 117,5 |
| 500 Pb | 18 | 4,9 | 21 | 3,4 | 24 | 6 | 31 | 33,4 | 64 | 52 | 4,6 | 9 | 6,3 | 0,8 | 228,0 |
| 1000 Pb | 18 | 4,9 | 24 | 3,5 | 25 | 6 | 28 | 34,5 | 62 | 55 | 4,8 | 9 | 5,6 | 0,6 | 489,0 |
| 200 Zn | 20 | 4,8 | 20 | 3,2 | 32 | 6 | 38 | 41,2 | 79 | 52 | 5,0 | 9 | 5,8 | 101 | 7,7 |
| 400 Zn | 19 | 4,7 | 18 | 3,1 | 23 | 5 | 38 | 31,1 | 69 | 45 | 5,0 | 9 | 5,3 | 174,4 | 2,6 |
| 600 Zn | 19 | 4,8 | 18 | 3,1 | 24 | 6 | 38 | 33,1 | 71 | 47 | 5,2 | 9 | 5,3 | 236,9 | 1,6 |

3.4 Condições de crescimento das plantas

O experimento foi realizado sob condições de casa de vegetação, no Departamento de Biologia Vegetal da UNICAMP, Campinas – SP, com coordenadas geográficas 22° 49' 45" S, 47° 06' 33" W e altitude média 670 metros.

A semeadura foi realizada diretamente em vasos com capacidade de 2 L, contendo o solo contaminado. As sementes de *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba* foram previamente esterelizadas em hipoclorito 25% durante 10 minutos. As sementes de *E. speciosa* foram escarificadas em ácido sulfúrico concentrado durante 10 minutos, sendo este procedimento já considerado esterilizante. As sementes de *S. parahyba* também foram escarificadas, de forma mecânica com o uso de uma lixa. A germinação foi acompanhada diariamente e considerada quando observada a emergência do hipocótilo. Após a emergência de todas as sementes, realizou-se um desbaste mantendo apenas uma planta por vaso. As sementes de *Schizolobium parahyba* foram germinadas em bandejas com o substrato vermiculita e após aproximadamente sete dias da germinação e expansão do primeiro par de folhas, as plântulas foram transplantadas para os vasos com solo.

3.5 Inoculação de FMA e rizóbio

O solo utilizado nos experimentos não foi esterilizado. Dessa forma mantiveram-se os possíveis propágulos infectivos de fungos micorrízicos nativos presentes naturalmente no solo utilizado, bem como a comunidade de rizóbios. Para garantir a presença de propágulos micorrízicos foi inoculado o FMA *Glomus macrocarpum* cedido pela Seção de Microbiologia do Solo, do Centro de Solos e Recursos Ambientais do IAC. O inóculo consistiu de aproximadamente 1400 esporos, hifas e raízes colonizadas de *Brachiaria* sp. A inoculação foi realizada por ocasião da semeadura e para *S. parahyba* durante o transplante das plantas para os vasos.

As sementes de *M. caesalpiniaefolia* e *E. speciosa* foram colocadas em erlenmeyer contendo uma suspensão de rizóbios específicos, em meio líquido para rizóbios YMB (yeast mannitol broth) (Vicent, 1970) para a primeira espécie utilizou-se rizóbio específico para a espécie e na segunda específico para o gênero (*Erythrina*). Depois de aproximadamente um mês foi feita reaplicação do inóculo de rizóbios no solo. Esses rizóbios foram obtidos da coleção do Departamento de Biologia Vegetal, da UNICAMP.

Este procedimento não foi realizado na espécie *S. parahyba*, pois esta não associa-se simbioticamente com rizóbios e portanto não forma nódulos radiculares.

3.6 Variáveis analisadas

3.6.1 Medidas de crescimento

Após aproximadamente 180 dias de cultivo, quando as plantas apresentavam biomassa suficiente para as análises, foi realizada a coleta. Foram determinadas a altura e a área foliar total, a massa da matéria seca (MS) da parte aérea e das raízes, o número de nódulos, e a MS de nódulos nas espécies capazes de nodular. Na espécie que não nodula, *S. parahyba*, foi feita a medição da raiz pivotante e do volume da raiz, pelo método da proveta (Lima & Athanázio, 2008).

3.6.2 Determinação de Pb e nutrientes na parte aérea e nas raízes das plantas

Após a pesagem da parte aérea e das raízes, estas foram moídas e submetidas à digestão nítrico-perclórica. Nos extratos foram determinados os teores de Pb e Zn por espectrofotometria de emissão em plasma (ICP-OES), bem como os nutrientes essenciais Fe, Mg, Mn, P, S, K, Ca e Cu (Abreu *et al.*, 2000). Com os resultados das concentrações

destes elementos na raiz (R) e parte aérea (PA), foi calculado o índice de translocação (IT), que corresponde à porcentagem total absorvida que foi transportada da raiz para a parte aérea, segundo a fórmula: $IT = 100 \times \frac{\text{concentração na PA}}{\text{concentração na PA} + \text{concentração na R}}$ (Abichequer & Bohnen, 1998).

3.6.3 Teores de clorofilas e carotenóides

Os teores de pigmentos fotossintéticos foram determinados segundo Hiscox & Israelstam (1979). Para o cálculo das concentrações de clorofila *a*, *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenóides foram utilizadas as fórmulas propostas por Lichtenthaler (1987).

3.6.4 Atividade específica da nitrogenase

Para avaliar a eficiência dos nódulos radiculares quanto à fixação de N₂, foi realizada a determinação *in vivo* da atividade específica da enzima nitrogenase (N₂ase) utilizando-se a técnica de redução de acetileno em etileno, por cromatografia gasosa (Hardy *et al.*, 1968). O sistema radicular foi removido, lavado e imediatamente acondicionado em frascos de vidro de aproximadamente 250 mL de volume, os quais foram vedados com tampas de borracha. Em seguida introduziram-se 25 mL de acetileno nos frascos com uma seringa. Alíquotas de 0,5 mL de gás foram retiradas dos frascos com seringa e injetadas no cromatógrafo a gás para dosagem do etileno formado. A partir de testes prévios, estabeleceu-se o tempo total de 45 minutos para avaliar a atividade específica da nitrogenase na conversão de acetileno em etileno, com medidas nos tempos 0, 15, 30 e 45 minutos. A atividade da enzima nitrogenase foi determinada pela quantidade de etileno produzida, utilizando-se um padrão de etileno como referência, e expressa em micro mols de etileno produzidos por hora, por grama de massa da matéria fresca (MF) de nódulos ($\mu\text{mol. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MF}$).

3.6.5 Determinações bioquímicas

Aproximadamente 3 g de tecido foliar foram coletados, e imediatamente congelados em N₂ líquido, liofilizados, macerados e guardados em dessecador a vácuo até o momento das análises bioquímicas. Para as análises de aminoácidos livres, nitrato e amônia, foram preparados extratos em MCW (metanol:clorofórmio:água; 12:5:3; v/v/v). A determinação de aminoácidos livres totais foi feita segundo o método de Cooching & Yemm (1955), por reação colorimétrica com ninhidrina. O NH₄⁺ livre foi determinado de acordo com a reação fenol-hipoclorito (Mitchell, 1972), modificada por Felker (1977) e o teor de nitrato segundo Cataldo *et al.* (1975), numa reação entre ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado e uma base, o hidróxido de sódio (NaOH) 2 N.

A peroxidação lipídica no tecido foliar foi determinada por meio da concentração de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, como descrito por Calmak & Horst (1991), utilizando material liofilizado e moído. A técnica envolve extração com o ácido tricloroacético (0,1 e 20%) e reação com ácido tiobarbitúrico (0,5%).

3.6.6 Colonização micorrízica

A porcentagem de raízes colonizadas por FMAs foi estimada microscopicamente pelo método da lâmina no qual 10 segmentos de aproximadamente um centímetro são dispostos em lâmina microscópica e cada segmento é subdividido visualmente em 10 partes nas quais se marca positivo (+) para a presença de estruturas fúngicas (vesículas arbusculares, esporos, hifas externas ou internas) e negativo (-) para a ausência destas

estruturas. A porcentagem de colonização (%) é dada pela seguinte fórmula: $\frac{\sum (+)}{\sum (+) + \sum (-)} \times 100 = \frac{+}{+ + -} \times 100 = \% \text{ colonização}$ (Giovanetti & Mosse, 1980).

A estimativa da porcentagem de colonização micorrízica é realizada após prévia despigmentação da raiz com KOH a 10% e coloração com azul de tripano, sendo as raízes armazenadas em frascos contendo glicerol acidificado até o momento da contagem das estruturas fúngicas (Phillips & Hayman, 1970).

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância, análise de regressão e teste de Tukey para comparação de médias, pelo programa SISVAR[®]. Os dados expressos em porcentagem e os dados de contagem foram transformados para $\arcsen(x/100)^{1/2}$ e $\log(x+1)$, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento I – Zn

4.1.1 Germinação

A adição de Zn ao solo influenciou de forma negativa a germinação de sementes de *M. caesalpiniaefolia*. O tratamento controle, sem adição do metal, desde o 8º dia de germinação até o desbaste, apresentou maior porcentagem de germinação em relação ao tratamento com 400 mg dm⁻³ de Zn no solo (Figura 1). A germinação das sementes de *E. speciosa* não diferiu significativamente entre os tratamentos (dados não apresentados).

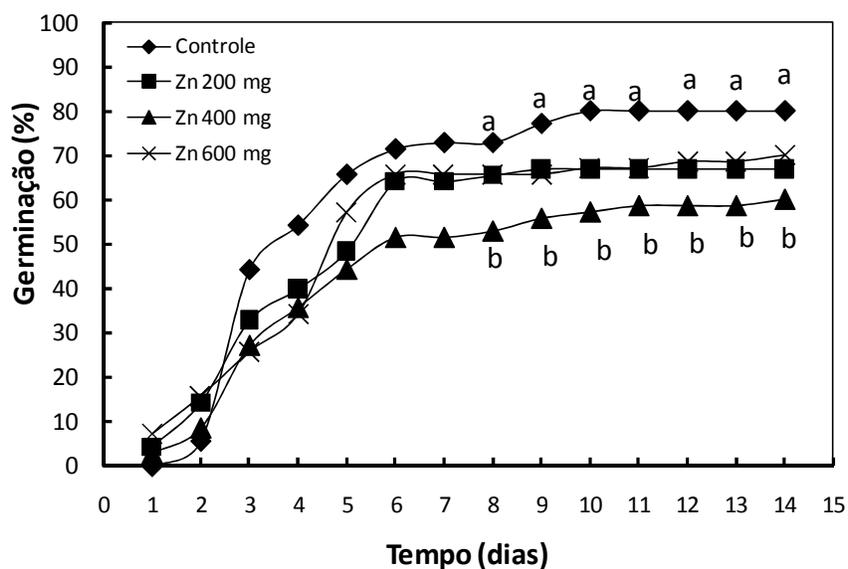


Figura 1: Porcentagem de germinação em *Mimosa caesalpiniaefolia*, sob diferentes concentrações de Zn no solo. Análise de variância (n=7), significância (p<0,05). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5%.

4.1.2 Resultados das medidas de crescimento

Com relação aos parâmetros utilizados para avaliar o crescimento das plantas, observou-se que de forma geral o aumento das concentrações de Zn no solo influenciou

negativamente o crescimento das plantas, sendo que as medidas de crescimento foram influenciadas de forma diferente nas espécies estudadas.

O crescimento em altura foi influenciado pela adição de Zn nas três espécies avaliadas, sendo que em *M. caesalpiniaefolia* houve uma redução de 81% em relação ao tratamento controle (Figuras 2 e 3).

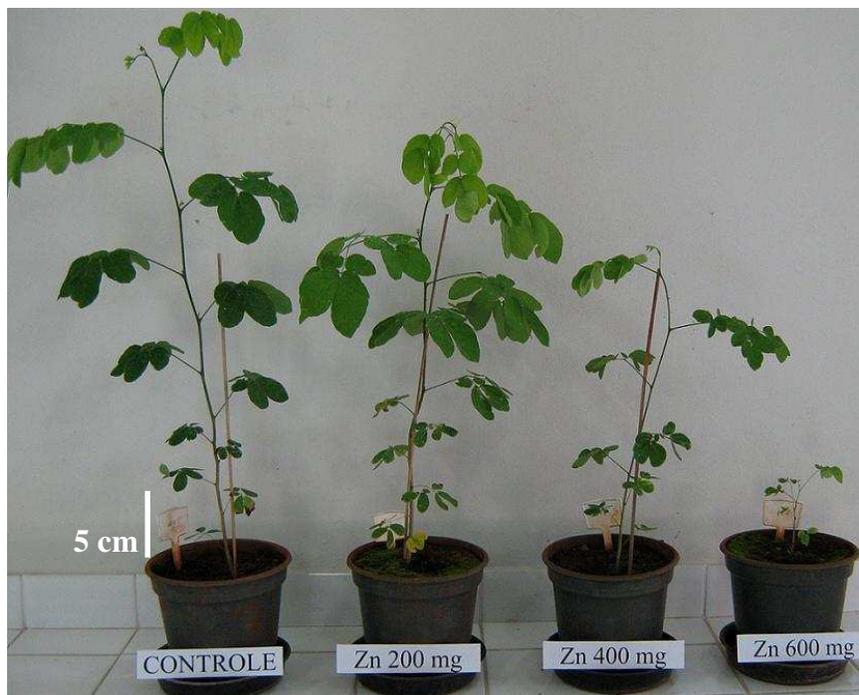


Figura 2: Mudas de *Mimosa caesalpiniaefolia*, cultivadas em concentrações crescentes de Zn adicionadas ao solo.

A área foliar foi afetada nas três espécies reduzindo-se linearmente com a adição de concentrações crescentes de Zn, de forma mais acentuada em *M. caesalpiniaefolia* e *E. speciosa* (Figura 3).

A produção de MS da parte aérea e da raiz também foi afetada nas três espécies, assim como a área foliar e a altura (Figura 3).

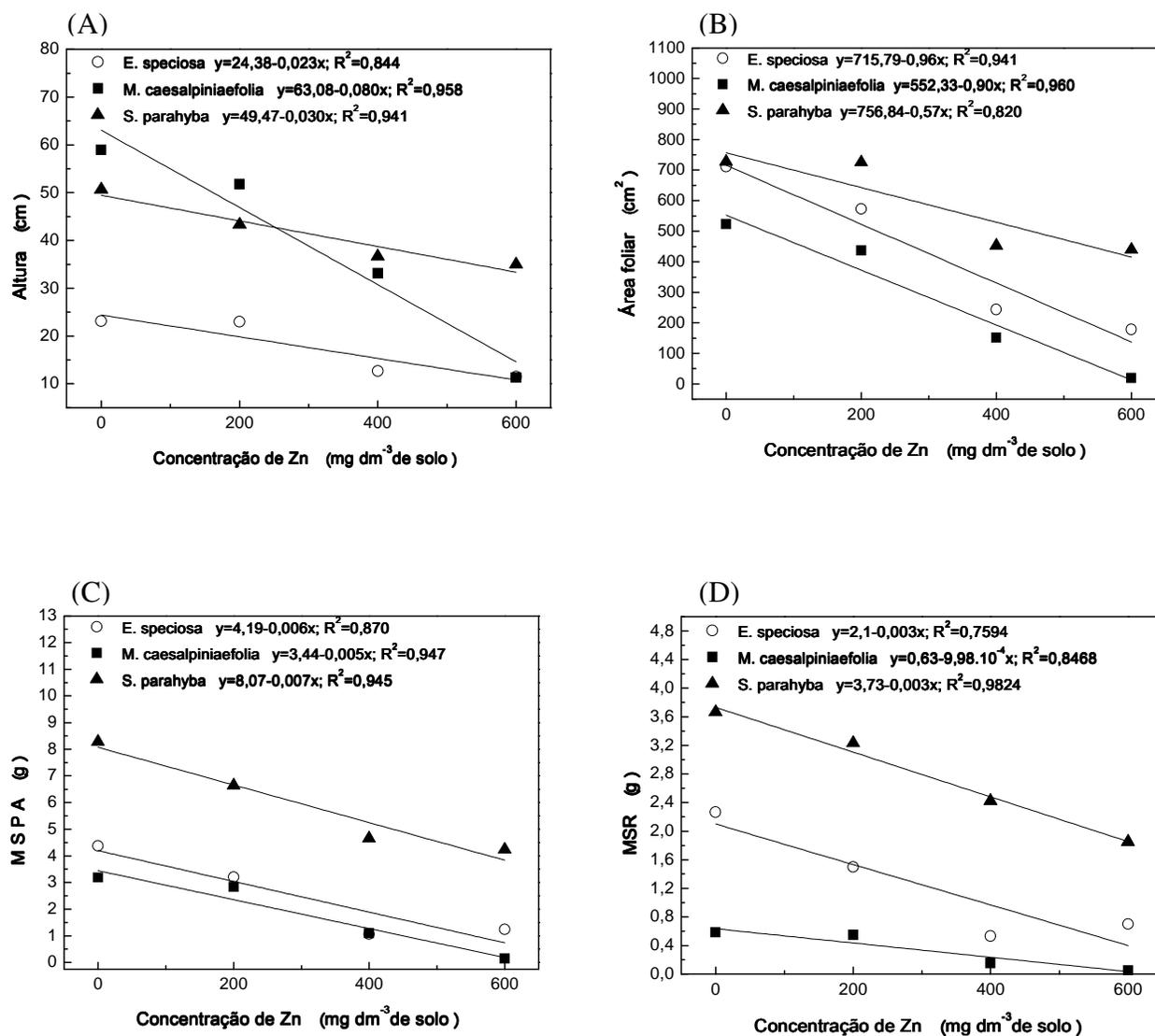


Figura 3: Altura média (A), área foliar (B), massa da matéria seca de parte aérea (MSPA) (C), massa da matéria seca de raiz (MSR) (D), das espécies *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05) e R²= coeficiente de determinação.

A MS da raiz foi afetada em *E. speciosa* e *S. parahyba* (Figura 3). Quanto à MS de nódulos, o aumento da concentração de metal influenciou de forma negativa apenas a espécie *E. speciosa*, em que observa-se redução de até 83% na MS e, pela análise de

regressão, uma tendência à estabilização da MS dos mesmos. Não houve influência das concentrações de Zn sobre a quantidade de nódulos em *M. caesalpiniaefolia*, mas em *E. speciosa* observou-se que em baixa concentração de Zn o número de nódulos foi influenciado, havendo um aumento da quantidade de nódulos na concentração de 200 mg dm⁻³ em relação ao controle, mas depois deste aumento a quantidade de nódulos se reduz consideravelmente (Figura 4).

Na espécie que não nodula (*S. parahyba*), na qual foram feitas medições de comprimento e volume da raiz, observou-se que ambos os parâmetros foram influenciados pelo incremento de Zn no solo, com redução de 30% no volume e também no comprimento da raiz, em relação ao tratamento sem adição de Zn (dados não apresentados).

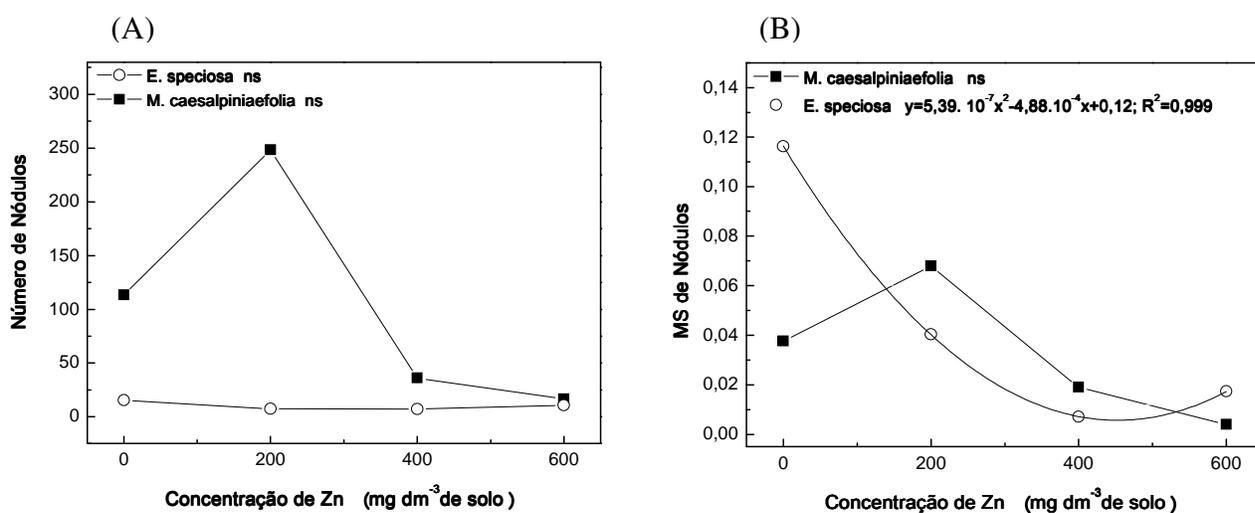


Figura 4: Número de nódulos (A) e massa da matéria seca de nódulos (B) das espécies *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05) e R²= coeficiente de determinação.

4.1.3 Nutrição Mineral

Concentração de Zn e outros elementos na parte aérea

Com o aumento da concentração de Zn no solo houve aumento da concentração deste metal na parte aérea (caule e folhas) das espécies estudadas (Figuras 5). Além disso, o Zn levou a uma redução na concentração de Fe e Cu nas folhas de *M. caesalpiniaefolia* (Tabela 2). Observou-se que nas folhas de *M. caesalpiniaefolia* a concentração de Fe foi reduzida nos tratamentos de 200 e 400 mg.dm⁻³ mas aumentou consideravelmente na maior concentração (600 mg dm⁻³). Em *E. speciosa* o incremento do Zn no solo aumentou as concentrações de P e S nas folhas e reduziu as de Mn, mas verifica-se uma tendência à estabilização, havendo um leve aumento da concentração de Mn na maior concentração de Zn (regressão com ajuste de tipo quadrático) (Tabela 2). O Zn não influenciou significativamente a concentração dos outros minerais nas folhas de *S. parahyba*. Com relação ao caule houve redução na concentração de Fe em *M. caesalpiniaefolia* e não houve influência nas concentrações dos minerais em *E. speciosa* (Tabela 3). Em *S. parahyba* a concentração dos minerais não foi determinada no caule, devido a problemas com as amostras.

Tabela 2: Concentração de nutrientes minerais nas folhas das espécies arbóreas *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância (p<0,05); x= regressão linear; x²= regressão quadrática.

| Folhas | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | |
| mg dm ⁻³ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 230,4 | 3,9 | 167,4 | 2,2 | 2,8 | 24,2 | 24,6 | 12,1 |
| 200 | 233,9 | 3,7 | 69,8 | 1,9 | 2,2 | 21,9 | 27,3 | 10,2 |
| 400 | 310,9 | 3,9 | 64,4 | 2,5 | 3,1 | 20,2 | 29,9 | 13,3 |
| 600 | 216,2 | 4,0 | 66,2 | 2,7 | 4,3 | 19,1 | 28,9 | 12,1 |
| Regressão | ns | ns | x ² | x | x | ns | ns | ns |
| p | | | <0,01 | <0,05 | <0,05 | | | |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 109,7 | 3,2 | 75,3 | 1,8 | 2,2 | 16,2 | 18,6 | 7,5 |
| 200 | 99,1 | 3,1 | 83,0 | 1,8 | 2,3 | 15,2 | 17,2 | 7,4 |
| 400 | 98,7 | 3,8 | 116,1 | 2,0 | 3,3 | 15,3 | 22,7 | 9,8 |
| 600 | 280,8 | 3,4 | 109,7 | 1,1 | 2,2 | 12,5 | 15,7 | 4,8 |
| Regressão | x ² | ns | ns | ns | ns | ns | ns | x ² |
| p | <0,05 | | | | | | | <0,05 |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 93,6 | 2,3 | 52,9 | 0,8 | 2,6 | 8,0 | 20,2 | 2,6 |
| 200 | 112,7 | 2,4 | 57,9 | 1,2 | 3,1 | 9,8 | 21,0 | 3,8 |
| 400 | 117,6 | 2,2 | 46,1 | 1,2 | 3,2 | 9,8 | 19,9 | 4,3 |
| 600 | 106,7 | 2,6 | 54,6 | 1,2 | 3,2 | 10,5 | 23,6 | 3,8 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

Tabela 3: Concentração de nutrientes minerais no caule das espécies arbóreas *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância (p<0,05); x= regressão linear; x²= regressão quadrática.

| Caule | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | |
| mg dm ⁻³ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 137,3 | 2,5 | 113,0 | 1,9 | 2,8 | 27,6 | 13,6 | 15,7 |
| 200 | 69,4 | 2,3 | 68,5 | 1,5 | 2,3 | 26,4 | 13,9 | 9,2 |
| 400 | 73,0 | 2,4 | 69,9 | 1,9 | 3,6 | 25,2 | 11,5 | 11,4 |
| 600 | 86,4 | 2,5 | 67,5 | 2,9 | 4,2 | 23,3 | 13,0 | 12,2 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 158,0 | 0,7 | 18,6 | 0,9 | 0,9 | 10,8 | 8,8 | 6,3 |
| 200 | 65,9 | 0,9 | 24,1 | 1,4 | 1,6 | 9,9 | 8,1 | 5,9 |
| 400 | 58,5 | 1,3 | 19,4 | 1,4 | 1,7 | 15,3 | 7,9 | 7,2 |
| 600 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Regressão | x | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| p | <0,05 | | | | | | | |

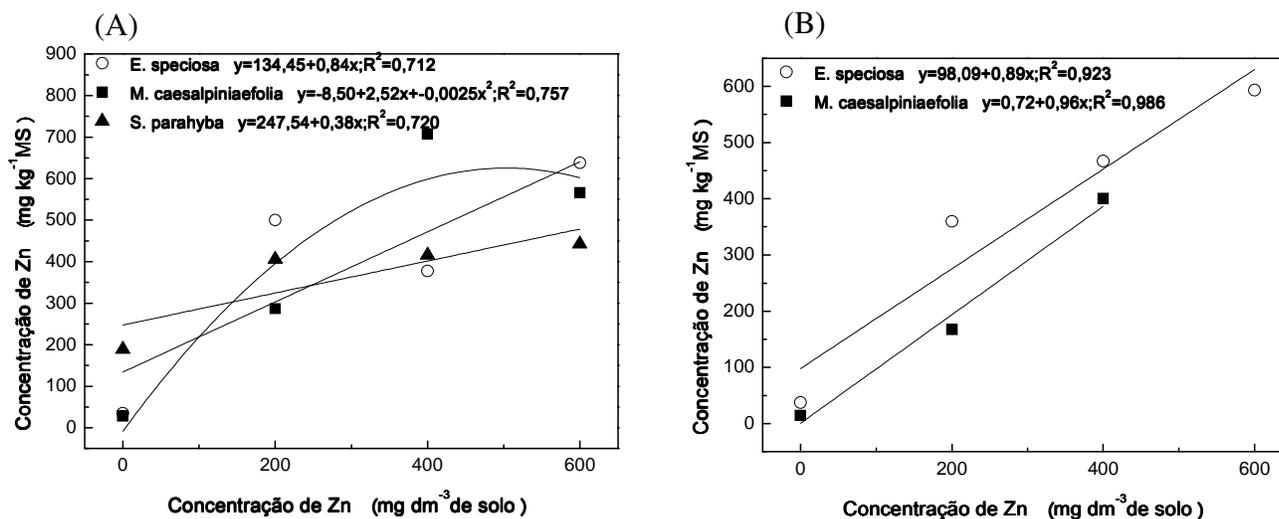


Figura 5: Concentração de Zn nas folhas (A) e no caule (B) das espécies *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05) e R²= coeficiente de determinação.

Concentração de Zn e outros elementos na raiz

Observou-se um aumento na concentração de Zn nas raízes das três espécies com o aumento das concentrações de Zn no solo (Figura 6). A concentração desse metal influenciou a concentração de outros minerais de forma diferenciada entre as espécies. Em *E. speciosa* houve aumento nas concentrações de Fe, P, Ca e Cu com o incremento do Zn no solo e redução na concentração de Mn nas concentrações de 200 e 400 mg dm⁻³ em relação ao controle e aumento na concentração de 600 mg dm⁻³, tendendo dessa forma à estabilização (Tabela 4). Em *S. parahyba* observou-se redução das concentrações de Fe e Ca e aumento da concentração de K. A nutrição mineral da espécie *M. caesalpiniaefolia* foi a mais influenciada, sendo que o aumento das concentrações de Zn no solo levaram à redução das concentrações de Fe, Mn, K e Ca, e, em contrapartida, elevou os níveis de Mg, P e S na raiz (Tabela 4).

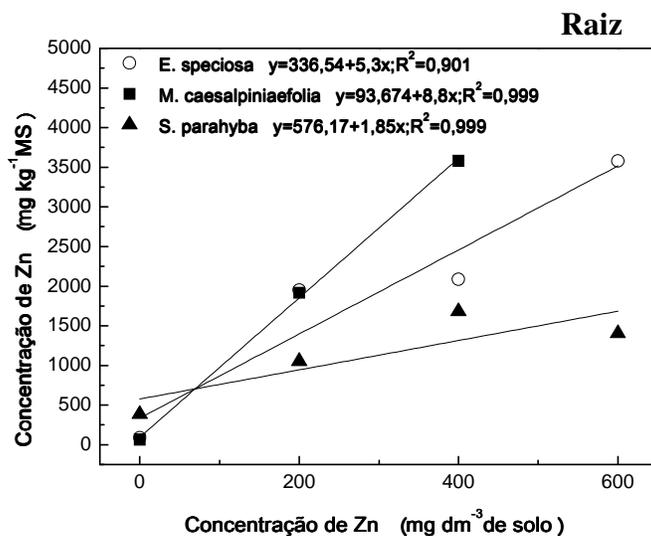


Figura 6: Concentração de Zn nas raízes das espécies *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05) e R²= coeficiente de determinação.

Tabela 4: Concentração de nutrientes minerais nas raízes das espécies arbóreas *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância ($p < 0,05$); x= regressão linear; x^2 = regressão quadrática.

| Raiz | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | |
| mg dm ⁻³ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 3884,7 | 3,5 | 100,8 | 1,5 | 4,6 | 22,7 | 7,1 | 39,2 |
| 200 | 3180,2 | 2,6 | 52,7 | 1,5 | 3,7 | 23,4 | 6,8 | 33,4 |
| 400 | 3243,1 | 2,5 | 58,6 | 2,1 | 4,7 | 21,9 | 8,2 | 45,6 |
| 600 | 11728,6 | 2,7 | 95,3 | 2,1 | 5,3 | 19,9 | 8,7 | 77,3 |
| Regressão | x | ns | x^2 | x | ns | ns | x | x^2 |
| p | <0,001 | | 0,05 | <0,05 | | | <0,05 | <0,05 |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 9224,7 | 1,8 | 145,6 | 1,0 | 2,7 | 7,9 | 9,1 | 36,6 |
| 200 | 7449,9 | 1,8 | 104,1 | 1,3 | 3,5 | 6,5 | 9,6 | 44,5 |
| 400 | 5824,6 | 2,8 | 65,4 | 1,4 | 3,8 | 6,4 | 8,4 | 43,4 |
| 600 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Regressão | x | x^2 | x | x^2 | x | x | x^2 | ns |
| p | <0,05 | <0,001 | <0,01 | 0,01 | <0,001 | <0,01 | <0,01 | |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu |
| 0 | 5430,4 | 4,8 | 106,2 | 0,9 | 3,9 | 18,4 | 7,5 | 31,3 |
| 200 | 3912,7 | 2,7 | 67,1 | 1,1 | 3,5 | 13,2 | 7,5 | 38,1 |
| 400 | 3777,0 | 2,9 | 60,9 | 0,8 | 3,6 | 10,8 | 5,1 | 33,3 |
| 600 | 2522,0 | 2,8 | 67,9 | 1,2 | 3,9 | 13,9 | 5,5 | 28,7 |
| Regressão | x | ns | ns | ns | ns | x | x | ns |
| p | <0,05 | | | | | <0,05 | <0,01 | |

Distribuição de Zn na planta e índices de translocação dos nutrientes

A distribuição de Zn nos diferentes órgãos das plantas apresentada na figura 7, mostra que esse MP ficou retido preferencialmente nas raízes e conforme aumenta a concentração deste elemento no solo maior a proporção retida nas raízes (Figura 7).

Observa-se que plantas crescendo no solo controle (sem adição de Zn) apresentaram

maior translocação deste elemento para a parte aérea quando comparadas às plantas crescendo em solos com altas concentrações de Zn. Em *E. speciosa*, da concentração total de Zn absorvida, em torno de 35% foi transportado para a parte aérea.

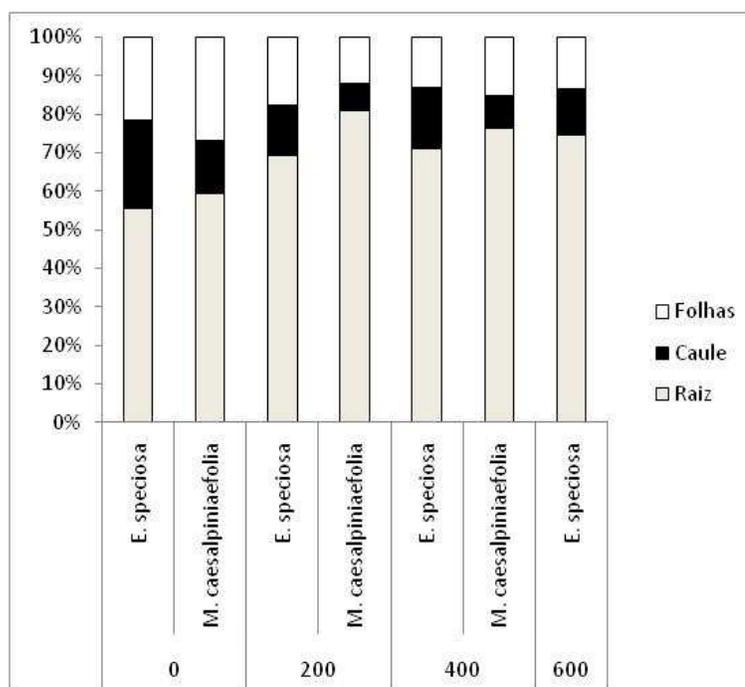


Figura 7: Distribuição do Zn absorvido nas diferentes partes da planta, nas espécies *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia*.

Com o aumento das concentrações de Zn no solo houve uma redução no índice de translocação (IT) desse metal para a parte aérea em *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia* (Tabela 5). Os ITs de alguns minerais também foram influenciados pelo aumento da concentração de Zn no solo. Em *E. speciosa*, houve redução do IT de Mn e Cu. Em *M. caesalpiniaefolia*, houve um aumento no IT do Mn e do Ca, mas uma redução do IT de P (Tabela 5). Na espécie *S. parahyba*, as concentrações de minerais não puderam ser determinadas nos caules e somente os ITs da raiz para as folhas são mostrados.

Tabela 5: Índice de translocação dos minerais nas espécies arbóreas *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância (p<0,05); x= regressão linear; x²= regressão quadrática.

| Índice de Translocação (%) | | | | | | | | | |
|--|------|------|-------|------|------|------|----------------|-------|-------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | | |
| Concentração Zn (mg dm ⁻³) | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 8,8 | 65,2 | 72,4 | 72,5 | 55,0 | 69,6 | 83,9 | 42,4 | 46,1 |
| 200 | 8,8 | 69,3 | 72,4 | 69,6 | 54,9 | 67,1 | 85,8 | 36,5 | 30,4 |
| 400 | 10,6 | 71,7 | 69,5 | 67,8 | 58,8 | 67,5 | 83,5 | 35,6 | 26,1 |
| 600 | 2,5 | 70,7 | 58,4 | 71,9 | 61,4 | 67,9 | 82,4 | 23,8 | 26,0 |
| Regressão | ns | ns | x | ns | ns | ns | ns | x | x |
| p | | | 0,05 | | | | | <0,05 | <0,05 |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 2,8 | 67,2 | 41,4 | 72,9 | 53,6 | 77,0 | 75,2 | 27,0 | 41,9 |
| 200 | 2,3 | 69,3 | 50,7 | 71,5 | 52,0 | 79,4 | 72,6 | 24,9 | 22,8 |
| 400 | 2,1 | 66,4 | 84,1 | 57,2 | 52,4 | 58,0 | 87,8 | 24,4 | 21,7 |
| 600 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Regressão | ns | ns | x | x | ns | ns | x ² | ns | x |
| p | | | <0,01 | 0,01 | | | <0,05 | | 0,01 |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 1,8 | 35,8 | 33,5 | 49,7 | 40,4 | 30,7 | 72,9 | 8,6 | 49,7 |
| 200 | 3,2 | 46,8 | 46,6 | 54,9 | 47,6 | 42,9 | 73,6 | 11,7 | 39,9 |
| 400 | 4,6 | 44,8 | 44,4 | 60,1 | 47,3 | 47,4 | 79,5 | 11,6 | 20,9 |
| 600 | 4,1 | 50,8 | 47,8 | 50,0 | 45,6 | 43,1 | 80,8 | 11,9 | 24,8 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

4.1.4 Pigmentos

Observou-se que nas espécies estudadas os teores de todos os pigmentos fotossintéticos analisados foram influenciados de forma negativa com o incremento do Zn no solo. Em *S. parahyba* e *M. caesalpiniaefolia* houve redução de mais de 80% nos teores de clorofila *a* no tratamento com maior concentração de Zn em relação ao tratamento sem

adição do metal (Figura 8). O mesmo foi observado para os carotenóides totais em *S. parahyba*.

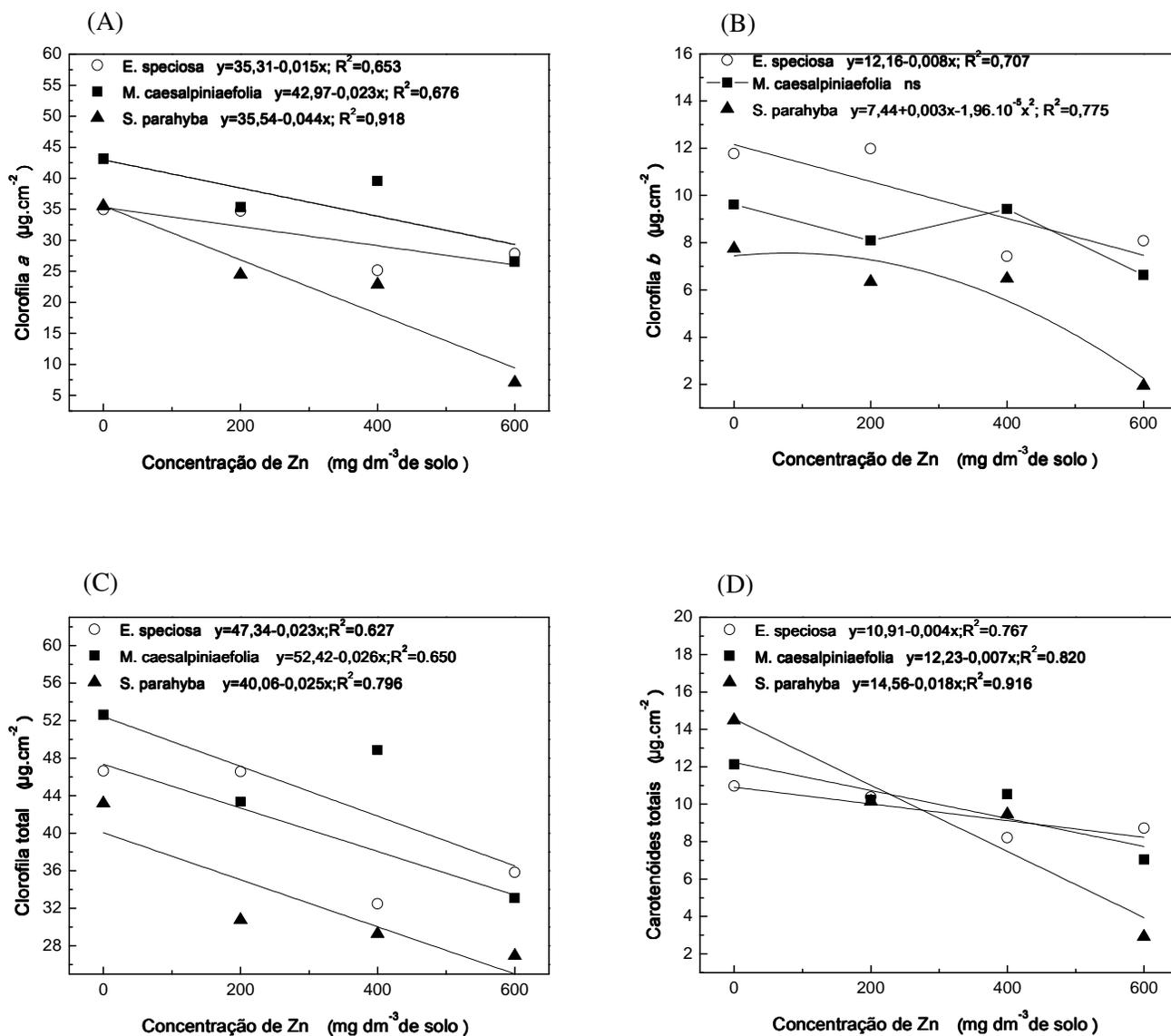


Figura 8: Teores de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides totais (D) em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de massa fresca de *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=5), significância ($p<0,05$) e R^2 = coeficiente de determinação.

4.1.5 Atividade da Nitrogenase

A adição de Zn não influenciou significativamente a atividade da enzima nos nódulos de nenhuma das duas espécies avaliadas, (Tabela 7). Comparando-se as espécies (Tukey a 5%), observou-se que a atividade da enzima, de maneira geral, foi maior nos nódulos de *E. speciosa*.

Tabela 7: Atividade da enzima nitrogenase em $\mu\text{moles etileno.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ MF de nódulos de *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia* cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=4), (p<0,05). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5%, comparando as espécies.

| Espécie/Concentração | <i>Erythrina speciosa</i> | <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> |
|---|---|--|
| mg dm⁻³ de Zn no solo | $\mu\text{moles etileno.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. MF nódulo | |
| 0 | 6.726 a | 3.966 b |
| 200 | 6.716 a | 4.463 b |
| 400 | 12.924 a | 1.745 b |
| 600 | 6.623 a | 1.533 b |

4.1.6 Determinações bioquímicas

O aumento das concentrações de Zn no solo afetou os resultados das análises bioquímicas avaliadas de maneira diferenciada entre as espécies. Em folhas de *E. speciosa* houve aumento no teor de aminoácidos solúveis totais e nitrato. Em *M. caesalpiniaefolia*, também houve aumento no teor foliar de aminoácidos totais. Em *S. parahyba*, a adição de Zn aumentou a peroxidação lipídica das membranas nas folhas (Figura 9).

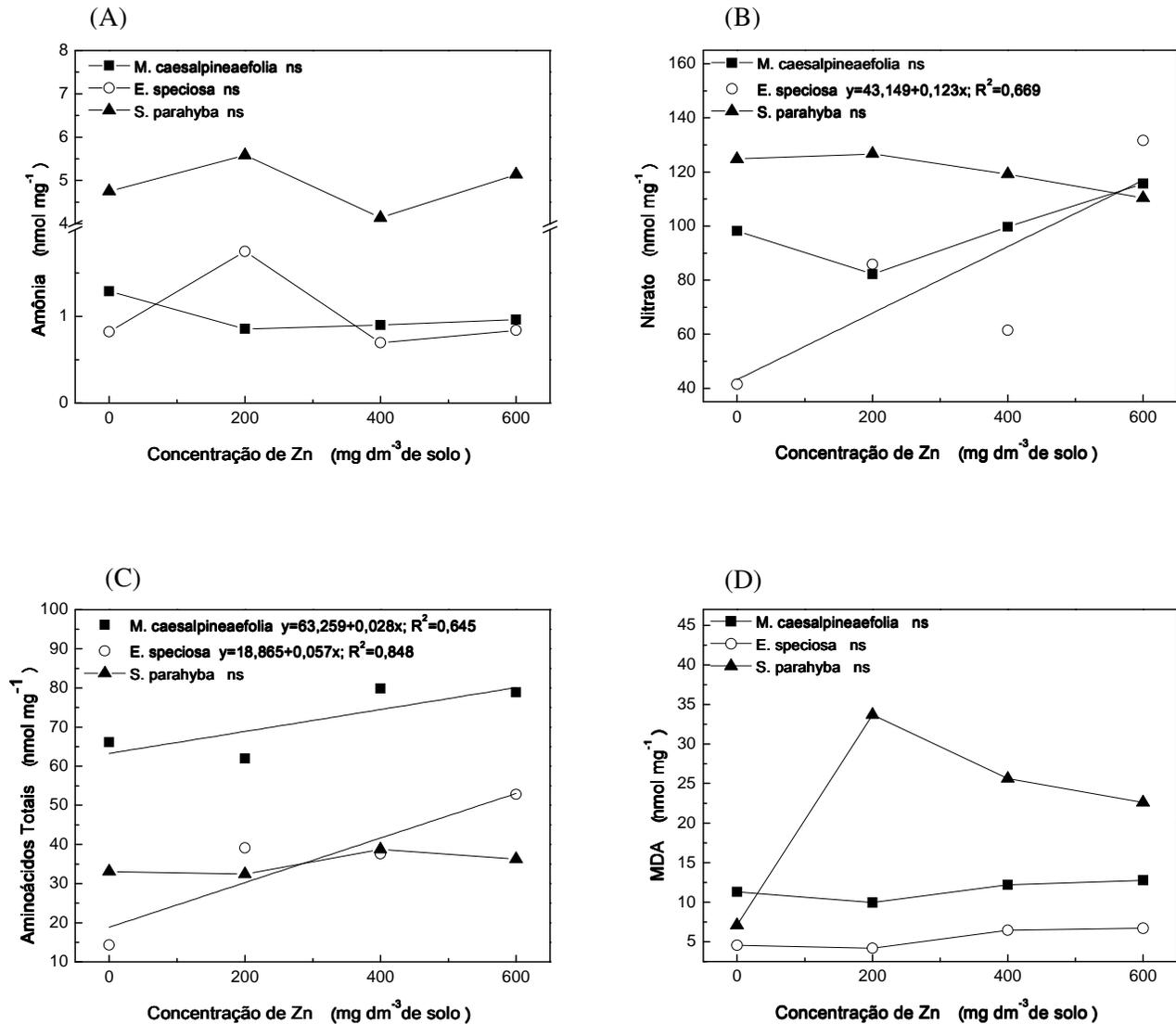


Figura 9: Teores de amônia (A), nitrato (B), aminoácidos totais (C) e MDA (D) em nmol.mg⁻¹ de massa seca de folhas de *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Zn. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05) e ns= não significativo.

4.1.7 Colonização Micorrízica

De uma maneira geral, verificou-se que a colonização micorrízica diferiu entre as espécies, sendo que a menor porcentagem de raiz colonizada por FMAs ocorreu na espécie

E. speciosa. Nas diferentes concentrações de Zn, *S. parahyba* apresentou maiores taxas de colonização micorrízica nos tratamentos de maior concentração do metal (400 e 600 mg.dm⁻³ de solo). Em *M. caesalpiniaefolia* a taxa de colonização aumenta no tratamento de 200 mg dm⁻³ de solo, no entanto, reduz a porcentagem de colonização no tratamento de 400 mg.dm⁻³, mas volta a aumentar no tratamento de 600 mg dm⁻³ de Zn no solo. O Zn não influenciou significativamente a colonização em *E. speciosa* com, em média, 55% de colonização (Tabela 7).

Tabela 8: Porcentagem de colonização micorrízica nas espécies *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solo com doses crescentes de Zn adicionadas.

| Porcentagem de colonização micorrízica (%) | | | |
|--|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Concentração (mg dm ⁻³) | <i>Erythrina speciosa</i> | <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | <i>Schizolobium parahyba</i> |
| 0 | 62 | 39 | 48 |
| 200 | 44 | 88 | 66 |
| 400 | 57 | 57 | 79 |
| 600 | 56 | 71 | 68 |
| Regressão | ns | x ² | x ² |
| p | | 0,001 | <0,01 |

4.2 Experimento II – Pb

4.2.1 Germinação

A adição de Pb no solo, não influenciou significativamente a germinação das espécies analisadas (dados não apresentados).

4.2.2 Resultados das medidas de crescimento

A produção de MS da parte aérea nas espécies *E. speciosa* e *S. parahyba* diminuiu linearmente com a adição de Pb ao solo (Figura 5). No entanto, o crescimento em altura foi

influenciado somente nas plantas de *S. parahyba*, nas quais a maior concentração de Pb adicionada ao solo promoveu uma redução de 28% na altura, em relação às plantas do tratamento controle (Figura 10). Quanto à área foliar, apenas a espécie *E. speciosa* foi afetada, de forma que na maior concentração houve uma redução de 33% em relação ao tratamento sem adição de metal (Figura 10). A MS de raiz não foi influenciada significativamente pelo Pb em nenhuma das espécies estudadas.

Considerando-se as espécies capazes de nodular, *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia*, observou-se que o número de nódulos não foi influenciado, entretanto, a MS de nódulos em *E. speciosa* diminuiu até o tratamento com 400 mg.dm^{-3} com o aumento da concentração de Pb no solo (Figura 11).

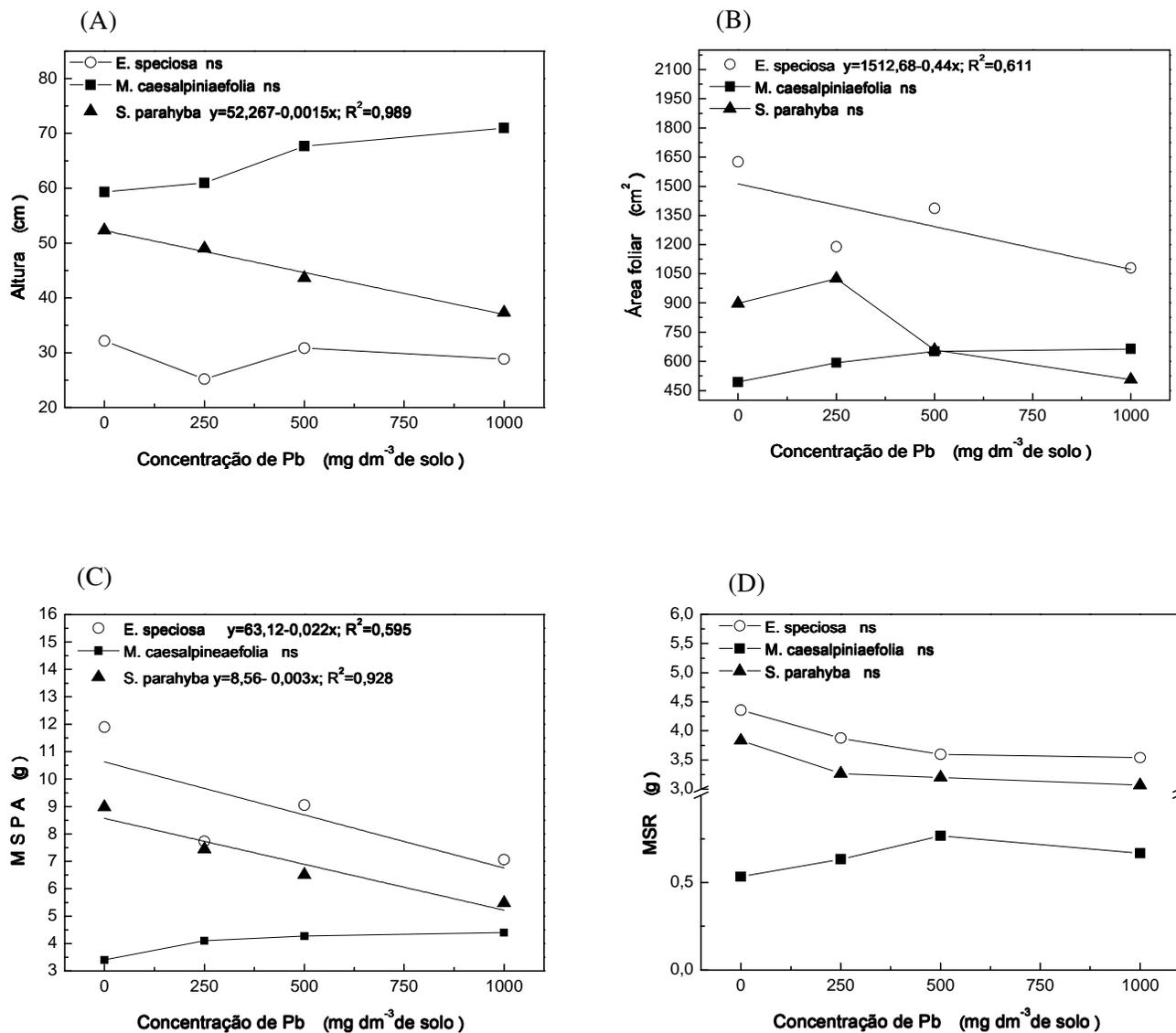


Figura 10: Altura (A), área foliar (B), massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) (C) e massa da matéria seca da raiz (MSR) (D) em *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, em diferentes concentrações de Pb. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05), ns= não significativo e R²= coeficiente de determinação.

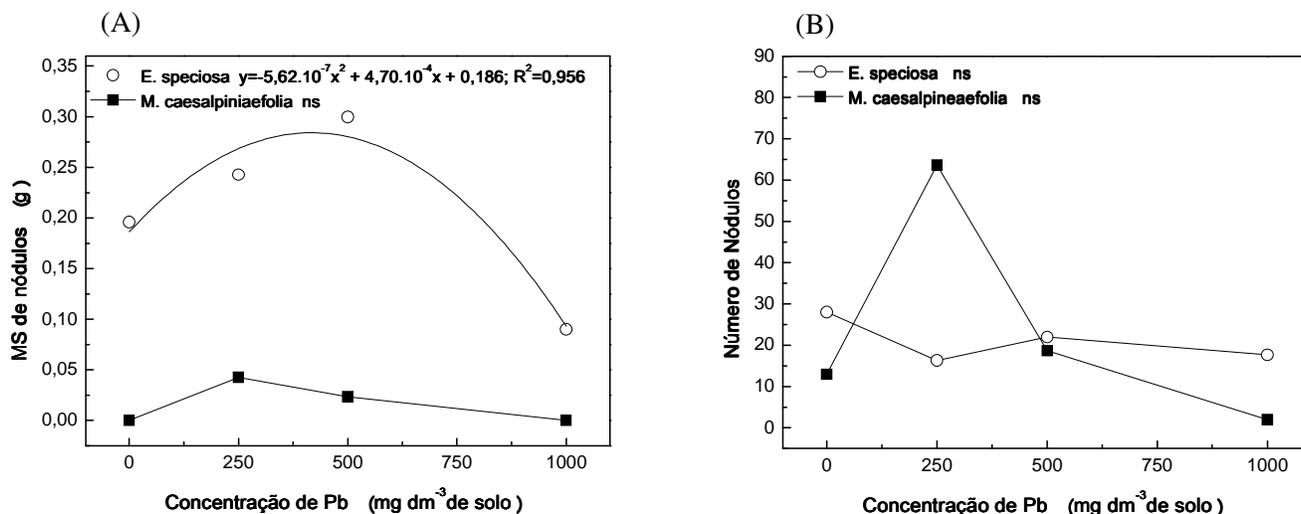


Figura 11: Massa da matéria seca de nódulos (A) e número de nódulos (B) de *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia* em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05), ns= não significativo e R²= coeficiente de determinação.

4.2.3 Nutrição Mineral

Concentração de Pb e outros elementos na parte aérea

O aumento da concentração de Pb no solo aumentou linearmente a concentração deste metal na parte aérea (folhas e caule) de *E. speciosa* e *S. parahyba*, mas somente no caule de *M. caesalpiniaefolia* (Figura 12).

O Pb afetou a concentração de Mg que diminuiu e de Mn que aumentou na dose de 250 mg.dm⁻³, mas foi diminuindo nas duas maiores concentrações com valores próximos ao tratamento controle, nas folhas de *E. speciosa* e a concentração de Zn nas folhas de *S. parahyba*. Com relação ao caule, o Pb contribuiu para a redução da concentração de Fe e Mn e para o aumento da concentração de S em *E. speciosa*. Também afetou a concentração

de Fe, que diminuiu fortemente em *M. caesalpiniaefolia*, mas não influenciou a concentração dos minerais no caule de *S. parahyba*.

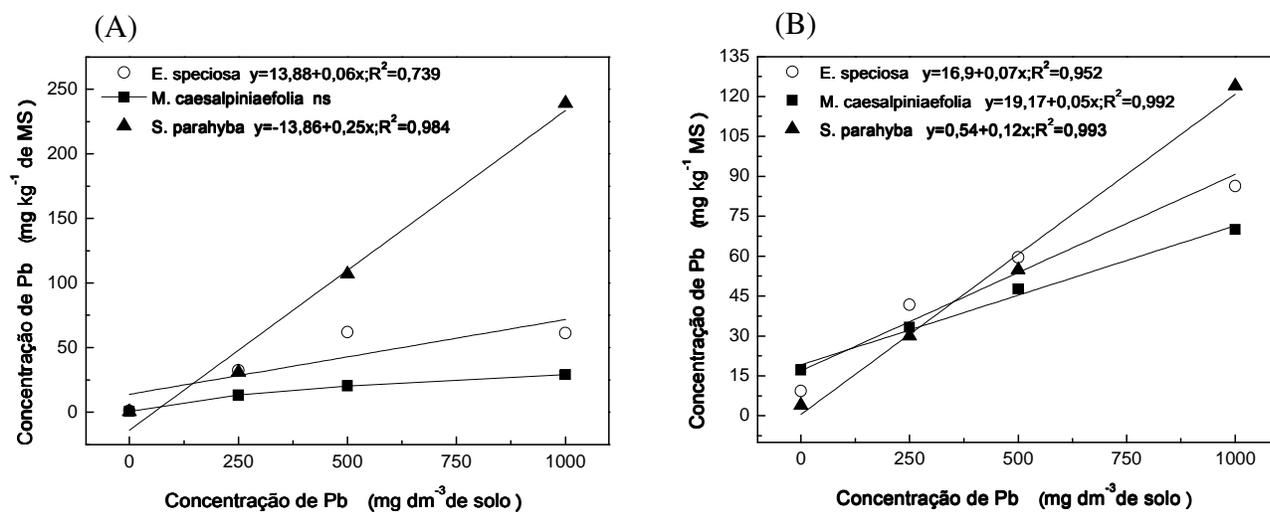


Figura 12: Concentração de Pb nas folhas (A) e no caule (B) das espécies *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Pb. Análise de regressão (n=3), (p<0,05) e R²= coeficiente de determinação.

Tabela 10: Concentração de nutrientes minerais no caule das espécies arbóreas *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Pb. Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância (p<0,05); x= regressão linear; x²= regressão quadrática.

| Folhas | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | | |
| mg dm ⁻³ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 193,2 | 4,2 | 120,9 | 1,7 | 2,2 | 20,5 | 25,5 | 12,6 | 29,3 |
| 250 | 203,5 | 3,9 | 178,5 | 1,5 | 2,1 | 17,4 | 27,8 | 12,4 | 27,4 |
| 500 | 168,6 | 3,4 | 135,3 | 1,7 | 2,2 | 21,4 | 24,2 | 13,0 | 24,7 |
| 1000 | 190,6 | 3,5 | 126,7 | 1,8 | 2,5 | 21,3 | 26,2 | 14,4 | 33,4 |
| Regressão | ns | x | x ² | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| p | | <0,05 | <0,05 | | | | | | |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 125,9 | 3,5 | 93,4 | 2,3 | 2,2 | 16,7 | 22,8 | 10,6 | 33,0 |
| 250 | 119,1 | 3,4 | 83,7 | 1,9 | 2,1 | 16,9 | 25,2 | 8,9 | 27,3 |
| 500 | 129,0 | 3,8 | 86,8 | 2,1 | 2,1 | 17,2 | 22,2 | 8,3 | 25,3 |
| 1000 | 136,7 | 3,7 | 93,2 | 2,3 | 2,2 | 17,8 | 24,2 | 7,9 | 27,5 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| p | | | | | | | | | |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 102,2 | 2,7 | 51,8 | 1,1 | 2,5 | 8,2 | 27,0 | 4,0 | 31,0 |
| 250 | 101,4 | 2,1 | 56,3 | 1,3 | 3,3 | 12,0 | 26,0 | 4,7 | 19,9 |
| 500 | 94,4 | 2,3 | 65,6 | 1,1 | 2,8 | 9,2 | 30,6 | 3,3 | 16,9 |
| 1000 | 96,8 | 2,6 | 69,0 | 1,2 | 3,2 | 7,9 | 32,3 | 3,6 | 17,1 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | x ² |
| p | | | | | | | | | <0,01 |

Tabela 10: Concentração de nutrientes minerais no caule das espécies arbóreas *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Pb. Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância (p<0,05); x= regressão linear e x²= regressão quadrática.

| Caule | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | | |
| mg dm ⁻³ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 155,0 | 2,5 | 117,2 | 1,6 | 1,7 | 21,6 | 11,5 | 16,3 | 11,4 |
| 250 | 67,4 | 2,5 | 142,8 | 1,2 | 2,5 | 19,2 | 10,6 | 14,8 | 9,0 |
| 500 | 27,6 | 2,3 | 124,7 | 1,3 | 2,2 | 20,3 | 10,8 | 15,7 | 12,4 |
| 1000 | 45,4 | 2,4 | 92,5 | 1,6 | 2,7 | 23,1 | 11,6 | 12,4 | 13,6 |
| Regressão | x | ns | x ² | ns | x | ns | ns | ns | ns |
| p | 0,05 | | <0,05 | | <0,05 | | | | |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 217,1 | 1,0 | 22,9 | 1,8 | 0,8 | 15,0 | 9,1 | 10,5 | 17,0 |
| 250 | 79,8 | 0,8 | 23,4 | 1,4 | 1,0 | 14,3 | 10,1 | 10,5 | 15,9 |
| 500 | 45,0 | 1,0 | 19,4 | 1,2 | 0,8 | 13,9 | 8,2 | 6,8 | 11,1 |
| 1000 | 50,7 | 1,0 | 23,3 | 1,5 | 0,9 | 14,9 | 9,4 | 9,0 | 13,4 |
| Regressão | x ² | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| p | <0,05 | | | | | | | | |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 182,8 | 0,8 | 9,1 | 0,7 | 1,3 | 10,3 | 6,7 | 4,0 | 15,1 |
| 250 | 112,8 | 0,9 | 9,6 | 0,9 | 1,7 | 13,1 | 7,6 | 4,1 | 15,7 |
| 500 | 136,8 | 0,7 | 9,2 | 0,7 | 1,5 | 10,9 | 7,3 | 3,0 | 13,9 |
| 1000 | 175,9 | 0,6 | 8,9 | 1,0 | 1,4 | 8,8 | 6,4 | 2,8 | 10,9 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

Concentração de Pb e outros elementos na raiz

Como observado para o Zn, o aumento das concentrações de Pb no solo levou ao aumento da concentração desse metal, principalmente nas raízes das espécies estudadas (Figura 13). O incremento de Pb no solo reduziu a concentração de Mn e P em *M. caesalpiniaefolia*, reduziu a concentração de Mg, e aumentou as concentrações de Mn, S, K e Cu em *S. parahyba*, e reduziu a concentração de Cu em *E. speciosa* (Tabela 11).

Tabela 11: Concentração de nutrientes minerais na raiz das espécies arbóreas *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba* cultivadas em solos com doses crescentes de Pb. Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância (p<0,05); x= regressão linear; x²= regressão quadrática.

| Raiz | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | | |
| mg dm ⁻³ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 5659,7 | 2,4 | 102,6 | 1,4 | 3,4 | 17,6 | 7,3 | 56,9 | 36,6 |
| 250 | 4392,0 | 2,0 | 85,5 | 1,2 | 3,7 | 18,0 | 5,4 | 35,6 | 34,7 |
| 500 | 6067,8 | 2,2 | 139,4 | 1,1 | 3,6 | 15,7 | 6,5 | 46,4 | 36,2 |
| 1000 | 4972,3 | 2,0 | 80,2 | 1,4 | 2,7 | 18,0 | 6,8 | 37,1 | 28,0 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | x | ns |
| p | | | | | | | | | 0,05 |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 2827,2 | 3,3 | 226,3 | 2,1 | 2,0 | 16,7 | 6,3 | 25,9 | 20,3 |
| 250 | 3782,1 | 1,8 | 85,5 | 1,3 | 2,9 | 15,4 | 6,0 | 17,0 | 22,0 |
| 500 | 5167,4 | 2,9 | 108,6 | 1,4 | 2,4 | 14,4 | 6,3 | 29,4 | 23,4 |
| 1000 | 4332,9 | 3,2 | 78,6 | 1,7 | 2,4 | 14,4 | 6,7 | 31,4 | 19,8 |
| Regressão | ns | ns | x ² | x ² | ns | ns | ns | ns | ns |
| p | | | <0,01 | <0,01 | | | | | |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn |
| 0 | 5332,7 | 4,1 | 120,2 | 1,0 | 3,6 | 19,3 | 6,1 | 30,3 | 26,6 |
| 250 | 3821,0 | 2,5 | 130,4 | 1,1 | 3,9 | 18,9 | 6,1 | 24,8 | 24,9 |
| 500 | 4572,1 | 6,2 | 176,8 | 0,9 | 5,3 | 27,6 | 6,8 | 26,2 | 23,7 |
| 1000 | 5835,7 | 2,8 | 124,2 | 1,0 | 4,3 | 24,9 | 6,3 | 44,4 | 22,3 |
| Regressão | ns | x ² | x ² | ns | x ² | x | ns | x | ns |
| p | 0,05 | | <0,05 | | | 0,05 | <0,01 | <0,05 | |

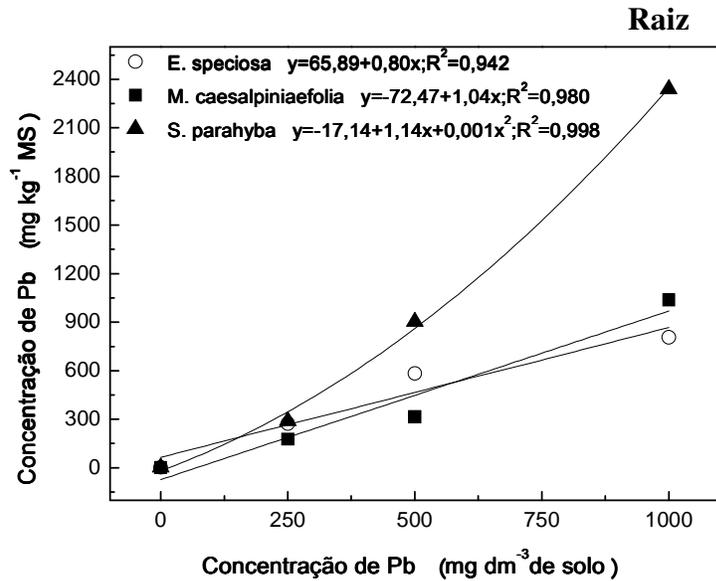


Figura 13: Concentração de Pb nas raízes das espécies *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Pb. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05) e R²= coeficiente de determinação.

Distribuição de Pb na planta e índices de translocação

A distribuição de Pb na planta diferiu em plantas crescendo no solo controle sem adição de Pb, e em solos com adição de doses elevadas deste metal (Figura 14). Nas plantas do solo controle, e com baixas concentrações de Pb, houve alta translocação do metal absorvido para órgãos da parte aérea, especialmente no caule, enquanto que nas plantas crescendo em solo com altos níveis de Pb, o acúmulo ocorreu preferencialmente nas raízes, em torno de 85-90% do Pb total absorvido pelas plantas.

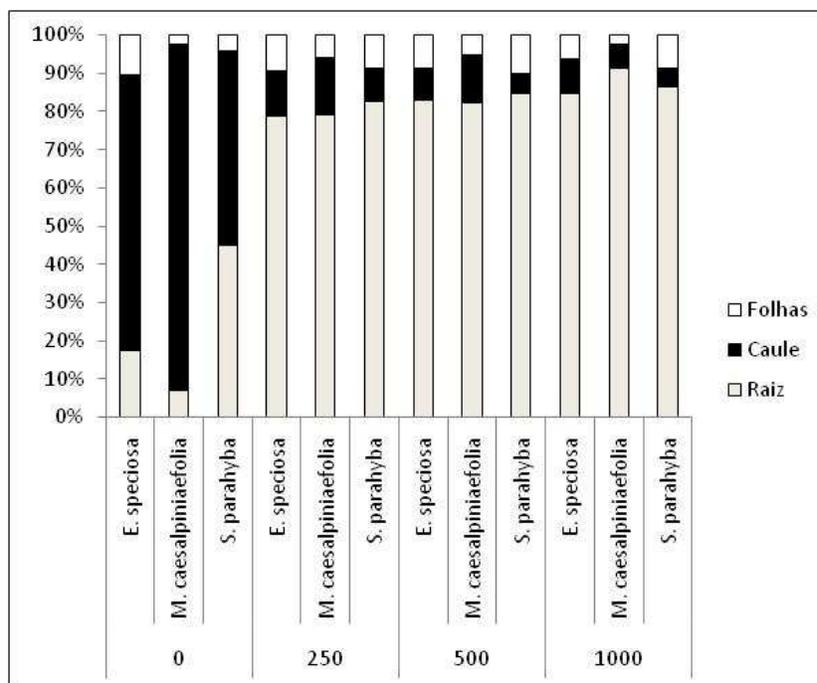


Figura 14: Distribuição do Pb total absorvido nas diferentes partes da planta, nas espécies arbóreas *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*.

Com o aumento das concentrações de Pb no solo, houve uma redução no índice de translocação (IT) desse metal para a parte aérea de todas as espécies estudadas. Além disso, a adição de Pb ao solo, influenciou os ITs de alguns minerais.. Em *E. speciosa*, houve aumento do IT de S e Zn e em *S. parahyba* houve redução dos ITs de K e Cu. Em *M. caesalpiniaefolia* houve aumento no IT do Mn e redução nos ITs de Fe, Cu e Zn (Tabela 13).

Tabela 13: Índice de translocação dos minerais nas espécies arbóreas *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba* cultivadas em solos com doses crescentes de Pb. . Análise de regressão (n=3). ns= não significativo; p= significância (p<0,05); x= regressão linear; x²= regressão quadrática.

| Índice de Translocação (%) | | | | | | | | | | |
|--|----------------|------|--------|------|-------|-------|------|--------|----------------|----------------|
| <i>Erythrina speciosa</i> | | | | | | | | | | |
| Concentração Pb (mg dm ⁻³) | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn | Pb |
| 0 | 5,8 | 73,6 | 70,2 | 70,1 | 54,4 | 70,5 | 83,4 | 33,8 | 53,0 | 73,9 |
| 250 | 6,2 | 76,4 | 78,4 | 69,1 | 55,2 | 67,0 | 87,8 | 43,4 | 51,4 | 22,0 |
| 500 | 3,5 | 72,2 | 64,4 | 72,5 | 55,7 | 72,7 | 83,9 | 39,1 | 52,2 | 17,6 |
| 1000 | 4,6 | 74,2 | 73,6 | 69,1 | 66,0 | 70,6 | 84,7 | 42,1 | 62,2 | 15,8 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | x | ns | ns | ns | x | x ² |
| p | | | | | <0,05 | | | | <0,05 | 0,01 |
| <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn | Pb |
| 0 | 10,9 | 58,5 | 34,3 | 66,7 | 60,3 | 65,8 | 83,5 | 44,9 | 71,2 | 58,4 |
| 250 | 5,0 | 69,7 | 55,5 | 72,4 | 51,7 | 66,5 | 85,5 | 53,5 | 65,8 | 21,0 |
| 500 | 3,3 | 62,6 | 50,1 | 70,5 | 53,9 | 68,4 | 82,9 | 34,0 | 61,1 | 14,0 |
| 1000 | 4,2 | 59,5 | 59,4 | 69,6 | 55,9 | 69,2 | 83,4 | 35,3 | 67,9 | 8,9 |
| Regressão | x ² | ns | x | ns | ns | ns | ns | x | x ² | x |
| p | <0,01 | | <0,001 | | | | | <0,001 | <0,05 | <0,05 |
| <i>Schizolobium parahyba</i> | | | | | | | | | | |
| Concentração | Fe | Mg | Mn | P | S | K | Ca | Cu | Zn | Pb |
| 0 | 5,0 | 48,7 | 33,5 | 65,5 | 51,6 | 49,0 | 84,6 | 21,5 | 63,6 | 52,6 |
| 250 | 5,6 | 54,9 | 33,6 | 66,1 | 55,8 | 57,1 | 84,4 | 27,2 | 59,0 | 17,2 |
| 500 | 5,3 | 35,3 | 30,2 | 66,5 | 44,5 | 42,0 | 84,5 | 19,3 | 56,6 | 15,3 |
| 1000 | 5,0 | 53,9 | 39,6 | 68,5 | 51,7 | 40,4 | 86,0 | 12,6 | 55,7 | 13,4 |
| Regressão | ns | ns | ns | ns | ns | x | ns | x | ns | x |
| p | | | | | | <0,01 | | <0,001 | | <0,05 |

4.2.4 Pigmentos

Assim como ocorrido com a adição de Zn, a adição de Pb ao solo também influenciou os teores dos pigmentos fotossintéticos. Observou-se que os teores da clorofila *a*, foram influenciados negativamente pela adição de Pb em *E. speciosa* e *S. parahyba* (Figura 15). Os teores de clorofila *b* também reduziram em *M. caesalpiniaefolia* e *E.*

speciosa. Dessa forma, o conteúdo total de clorofila diminuiu nas três espécies estudadas e o teor de carotenóides totais diminuiu em *S. parahyba*, mas aumentou em *E. speciosa*.

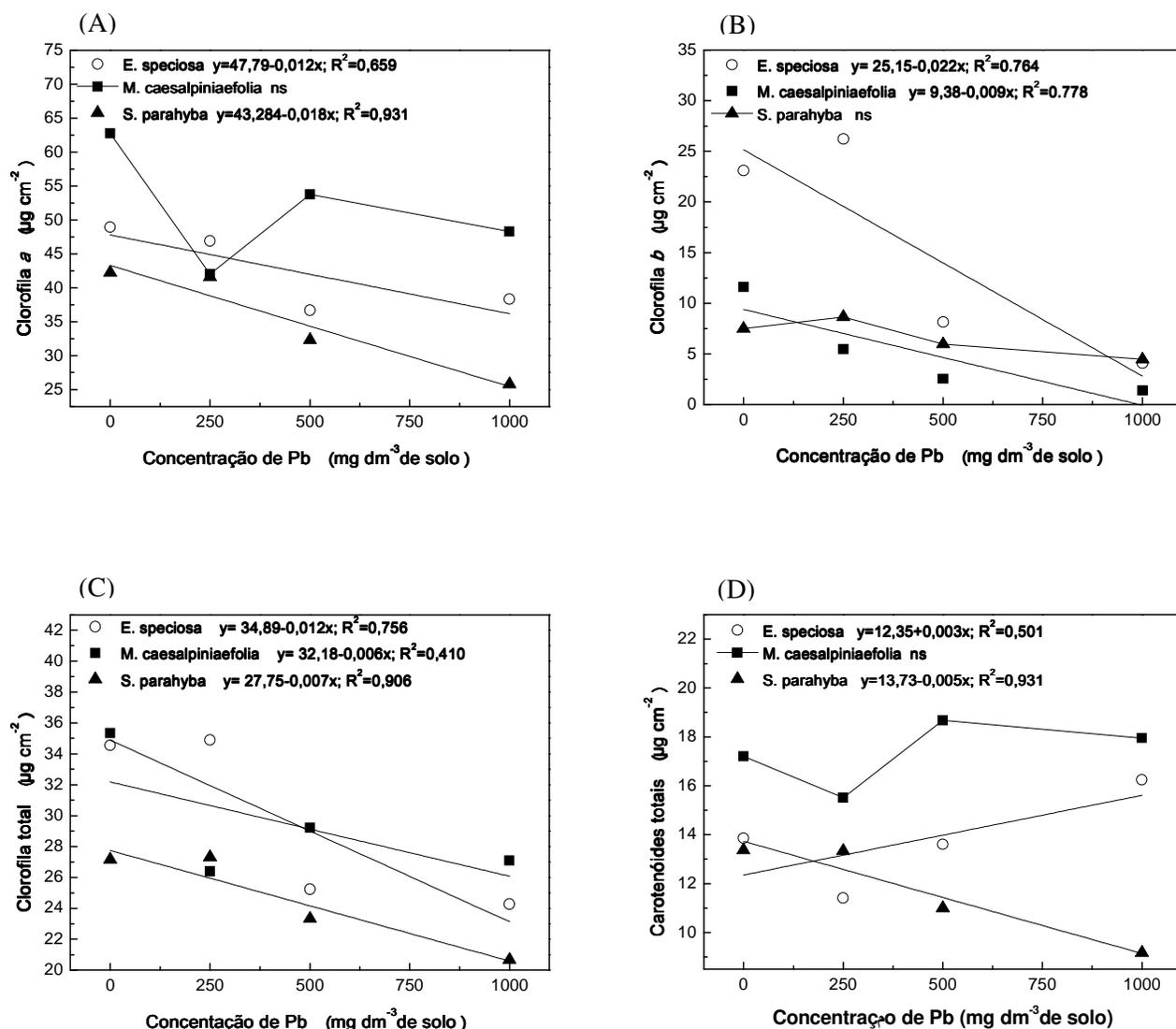


Figura 15: Teores de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) carotenóides totais (D) em $\mu\text{g.cm}^{-2}$ de massa fresca de *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, em resposta ao incremento da concentração de Pb no solo. Análise de regressão ($n=3$), significância ($p<0,05$), ns= não significativo e R^2 = coeficiente de determinação.

4.2.5 Atividade da nitrogenase

A adição de Pb reduziu linearmente e fortemente a atividade da enzima nitrogenase em *E. speciosa* (Tabela 15). Não foi possível realizar esta análise na espécie *M. caesalpiniaefolia*, uma vez que não se obteve um número consistente de indivíduos com nódulos para as análises.

Tabela 15: Atividade da enzima nitrogenase em $\mu\text{moles etileno.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. MF de nódulos em plantas de *E. speciosa* em diferentes concentrações de Pb. Análise de regressão (n=4) e significância ($p < 0,05$).

| Concentração mg dm ⁻³ de Pb no solo | <i>Erythrina speciosa</i> $\mu\text{moles etileno.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. MF nódulo |
|---|---|
| 0 | 4,705 |
| 250 | 0,003 |
| 500 | 0,006 |
| 1000 | 1,587 |

4.2.6 Determinações bioquímicas

Observou-se que o Pb influenciou os parâmetros bioquímicos avaliados de maneira diferenciada nas espécies arbóreas estudadas. Em *E. speciosa* o aumento das concentrações de Pb influenciou o teor de amônia, havendo um aumento nas concentrações 250 e 500 mg dm⁻³ e uma diminuição na concentração de 1000 mg dm⁻³. Em *M. caesalpineaeefolia* o Pb leva à redução no teor de nitrato nas concentrações de 250 e 500 mg dm⁻³ e aumento na concentração de 1000 mg dm⁻³. Já, em *S. parahyba* houve um aumento no teor de aminoácidos totais, e assim como em *M. caesalpineaeefolia* houve redução do teor de nitrato nas concentrações 250 e 500 mg dm⁻³. Além disso, na espécie *S. parahyba* o incremento do

Pb no solo aumentou o teor de MDA (peroxidação lipídica) nas folhas, comparado ao tratamento controle (Figura 16).

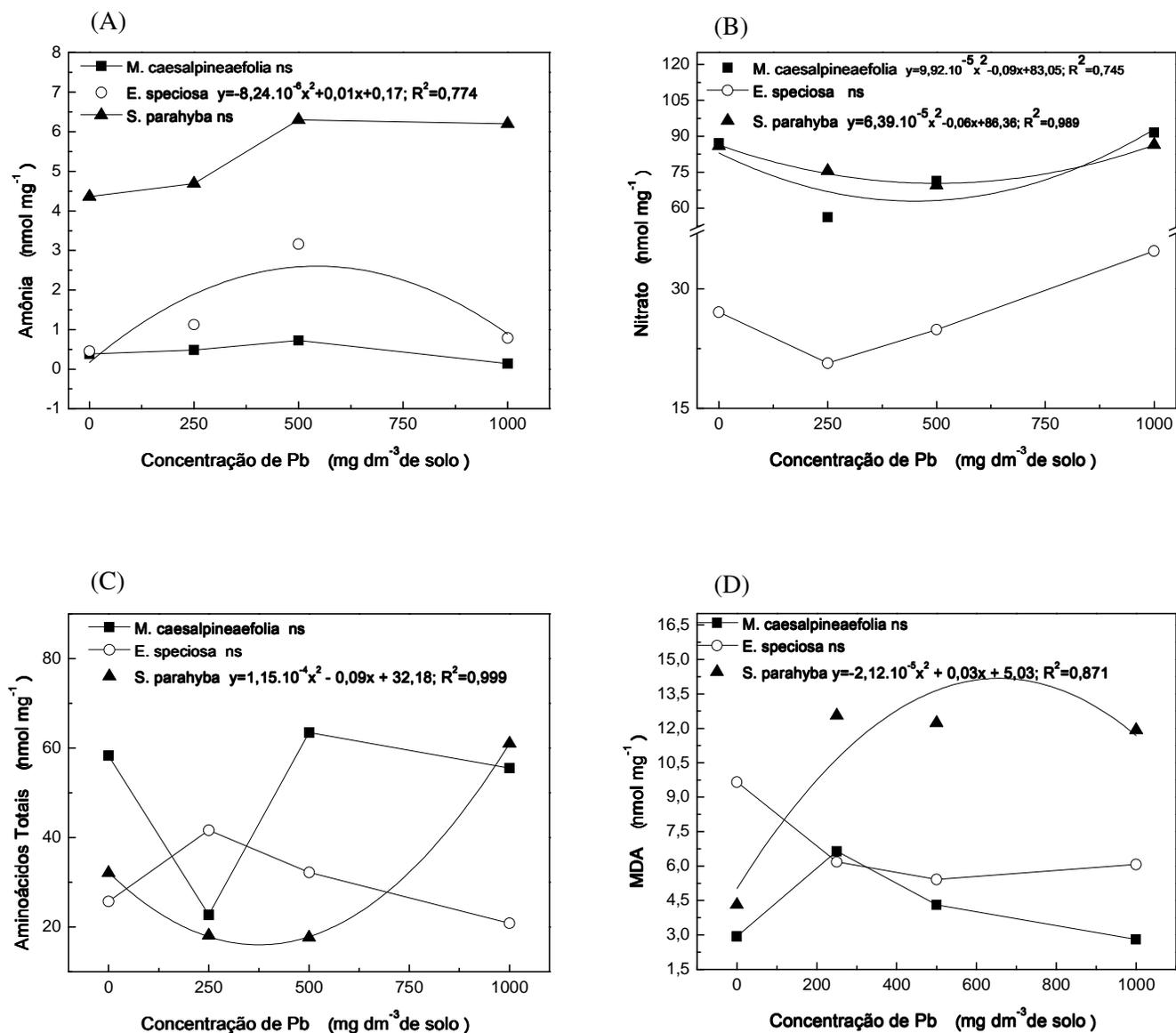


Figura 16: Teores de amônia (A), nitrato (B), aminoácidos totais (C) e MDA (D) em nmol.mg⁻¹ de massa seca de folhas de *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, em diferentes concentrações de Pb. Análise de regressão (n=3), significância (p<0,05), ns= não significativo e R²= coeficiente de determinação.

4.2.7 Colonização Micorrízica

Como observado para o Zn, a porcentagem de colonização diferiu entre as espécies. Sendo que os valores médios de colonização micorrízica foram de 67% em *E. speciosa*, 42% em *M. caesalpiniaefolia* e de 50% em *S. parahyba*. Entretanto, nas diferentes concentrações de Pb, somente em *M. caesalpiniaefolia* observou-se diferença entre os tratamentos, havendo um aumento da colonização entre as concentrações 250 e 500 mg dm⁻³, mas redução na concentração de 1000 mg dm⁻³ (Tabela 16).

Tabela 16: Porcentagem de colonização micorrízica nas espécies *E. speciosa*, *M. caesalpiniaefolia* e *S. parahyba*, cultivadas em solos com doses crescentes de Pb. Análise de regressão (n=3), p= significância (p<0,05), ns= não significativo e x²= regressão quadrática.

| Porcentagem de colonização micorrízica (%) | | | |
|--|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Concentração (mg dm ⁻³) | <i>Erythrina speciosa</i> | <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> | <i>Schizolobium parahyba</i> |
| 0 | 64 | 39 | 48 |
| 250 | 67 | 55 | 50 |
| 500 | 71 | 43 | 47 |
| 1000 | 68 | 30 | 56 |
| Regressão | ns | x ² | ns |
| p | | 0,05 | |

5. DISCUSSÃO

A contaminação de solos com MPs tem se tornado um assunto bastante discutido, devido ao seu elevado poder de toxicidade e pelo fato de se acumularem na cadeia alimentar (Sharma & Dubey, 2005a; Almeida, *et al.*, 2007). Dessa forma, o avanço nos estudos que visam melhorar as tecnologias de remediação existentes tem crescido. A utilização de plantas como ferramentas para descontaminar o ambiente tem sido comum, uma vez que a fitorremediação é uma tecnologia limpa, barata e eficiente em longo prazo (Gratão *et al.*, 2005).

A germinação de sementes é um estágio crítico para a utilização de plantas com potencial para a fitorremediação de solos contaminados por MPs, uma vez que esta fase do desenvolvimento pode ser extremamente vulnerável às condições ambientais. No presente estudo, verificou-se redução da germinação de sementes de *M. caesalpiniaefolia* devido ao incremento de Zn no solo, isto pode estar relacionado ao fato de o excesso de Zn interferir no transporte de outros nutrientes para o embrião, gerando disfunções na nutrição mineral, no balanço hídrico entre outros, causados também pelo estresse oxidativo, promovido pelo excesso de radicais livres gerados devido à fitotoxicidade causada pelas elevadas concentrações deste metal (Broadley *et al.*, 2007).

O fato do Pb não ter alterado a germinação das sementes de *M. caesalpiniaefolia*, as quais não foram previamente escarificadas, pode ser atribuído à presença da testa nas sementes, visto que esta impede o influxo de Pb que poderia afetar o desenvolvimento do embrião (Lane & Martin, 1977). Segundo Lane & Martin (1977), em rabanete (*Raphanus sativus*), o Pb quando absorvido é acumulado na porção distal do cotilédone e normalmente

não é transportado às regiões meristemáticas da radícula e do hipocótilo. Isto pode ter ocorrido nas sementes de *E. speciosa*, que foram escarificadas, visto que o crescimento inicial da raiz também não foi afetado pelo aumento das concentrações de Pb no solo.

Diversos estudos demonstram os efeitos nocivos de MPs no solo às plantas (Robb, 1981; Soares *et al.* 2001; Singh & Agrawal, 2007). Distúrbios no crescimento, como diminuição na produção de biomassa e redução da área foliar, têm sido comumente observados (Romeiro *et al.*, 2007; Singh & Agrawal, 2007). Neste trabalho também houve efeito nocivo dose MPs sobre o crescimento das mudas das espécies estudadas. Verificou-se ainda, que o Zn, afetou o crescimento das plantas de forma mais evidente que o Pb, principalmente, para a espécie *M. caesalpiniaefolia*, visto que vários indivíduos no tratamento com maior concentração de Zn no solo (600 mg dm^{-3}) não conseguiram sobreviver. As plantas remanescentes deste tratamento apresentaram sintomas de fitotoxicidade por Zn como clorose, principalmente nas folhas mais jovens, promovida pela deficiência induzida de Fe, relacionada a reduções na síntese de clorofila e degradação dos cloroplastos. Esses resultados corroboram os encontrados por Marques *et al.* (2000), trabalhando com esta mesma espécie e metal, inferindo que esta espécie é sensível a concentrações elevadas de Zn no solo.

O Pb afetou de forma diferente o crescimento das espécies estudadas, e, no geral, de forma menos pronunciada que o Zn. Isto pode ser explicado pelo fato de o Zn ser um metal essencial às plantas, facilmente absorvido e que tem uma mobilidade entre média e alta dentro da planta, sendo facilmente translocado para a parte aérea (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Em contrapartida o Pb é um metal não essencial ao desenvolvimento das plantas que, apesar de ser prontamente absorvido pelas mesmas, fica principalmente retido

nas raízes, sendo o seu transporte para a parte aérea bastante limitado (Brennan & Shelley, 1999; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). A espécie *S. parahyba* foi a mais afetada pelo excesso de Pb no solo e *M. caesalpiniaefolia* a menos afetada.

Ambos os metais estudados provocaram uma redução do conteúdo foliar de clorofilas *a* e *b*, bem como o conteúdo de carotenóides totais, pigmento acessório na fotossíntese que apresenta efeito fotoprotetor, reduzindo os efeitos nocivos do excesso de luz no aparelho fotossintético e evitando assim a danificação das membranas fotossintéticas (Uenojo *et al.*, 2007). Com o incremento de Zn no solo houve drásticas reduções nos teores de clorofila nas folhas das três espécies estudadas, o que, provavelmente, se deve ao fato de o Zn influenciar o influxo de Fe afetando a produção de clorofila. Segundo Kabata-Pendias & Pendias (2001), altas concentrações de Zn no solo diminuem a concentração de Fe nas plantas induzindo à sua deficiência. Ambos são metais de transição e os possíveis mecanismos desse antagonismo são a competição entre Zn^{2+} e Fe^{2+} nos processos de absorção, e a interferência nos processos de quelação, durante a absorção e translocação de Fe das raízes para a parte aérea. Além disso, o Fe diminui a absorção do Zn e a toxicidade do Zn que foi absorvido. Isto foi observado em *M. caesalpiniaefolia* visto que o incremento de Zn ao solo reduziu a concentração de Fe nas folhas (Tabela 2), o que pode explicar a clorose observada nas folhas dessa espécie. Rai *et al.* (2004), observaram que o excesso de Cr, que assim como o Zn é um metal de transição e um micronutriente para as plantas, reduziu o conteúdo foliar de clorofilas *a* e *b*, clorofila total e carotenóides totais em manjeriço (*Ocimum tenuiflorum*).

A associação entre plantas e microrganismos do solo é um fator importante para o desenvolvimento vegetal, principalmente no que diz respeito aos benefícios relacionados à

FBN e a associação com FMAs (Giller *et al.*, 2009; Barea *et al.*, 2005). Os MPs podem prejudicar essas associações simbióticas e afetar o adequado desenvolvimento das plantas hospedeira (Sudová & Vosátka 2007). Em alguns casos, a microbiota associada como os FMAs pode contribuir para a tolerância das plantas aos MPs (Barea *et al.*, 1987; Andrade *et al.*, 2004; Hildebrandt, *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009). Entretanto, quando a concentração de MPs é muito elevada esse efeito protetor da simbiose diminui, sendo que o estabelecimento da associação pode ser prejudicado (Sudová & Vosátka 2007; Jankonga & Visoottiviseth 2008).

Com relação à nodulação e FBN, foi verificado que enquanto a massa dos nódulos foi reduzida com o aumento das concentrações de MPs, como também observado por Almeida *et al.*, (2008), a atividade específica da nitrogenase não foi influenciada significativamente pelo aumento da concentração de Zn no solo.

A colonização das raízes por FMAs aumentou nos tratamentos com maior adição de Zn em *M. caesalpiniaefolia* e este aumento pode ter favorecido a FBN nessa espécie, uma vez que a atividade específica da nitrogenase não foi influenciada pelo aumento do Zn no solo. Além disso, Redecker, *et al.*(1997), trabalhando com alfafa, observaram que os rizóbios são altamente sensíveis ao Zn. Dessa forma, a inexistência de alteração na atividade da nitrogenase nos tratamentos com Zn e, ao mesmo tempo, o aumento da colonização micorrízica com o aumento das adições do metal, podem estar relacionados a um efeito benéfico da interação entre FMAs e rizóbios.

Diversos estudos comprovam o efeito benéfico dos FMAs na fixação biológica de nitrogênio, contribuindo para o suprimento de nutrientes, principalmente o P (Barea *et al.*, 1987; Azcón, *et al.*,1991; Redecker, *et al.*,1997).

Verifica-se que a concentração de P na raiz de *M. caesalpiniaefolia* aumentou com as adições de Zn ao solo o pode confirmar o observado por Redecker, *et al.*(1997), com relação ao P.

Entretanto, não se pode confirmar, a partir dos resultados obtidos, o efeito benéfico direto dos FMAs, uma vez que o mesmo somente foi observado sobre a atividade da nitrogenase (FBN) na espécie *M. caesalpiniaefolia* e também porque não foi observada maior tolerância ao Pb e ao Zn nas outras espécies, que também tiveram aumento da colonização micorrízica. Além disso, todos os tratamentos receberam inóculo micorrízico, não havendo tratamento controle com ausência de FMAs que comprove o efeito ou não destes fungos simbióticos na tolerância das plantas aos MPs.

Verifica-se que as mudas das três espécies estudadas conseguiram extrair os metais Pb e Zn do solo e concentrar nos órgãos analisados: raiz, caule e folhas. E verifica-se que a distribuição de Zn nas plantas seguiu o padrão raiz>folhas≥ caule. Apesar das concentrações de metais consideradas tóxicas nos tecidos vegetais serem bastante desconhecidas no caso de plantas arbóreas das regiões tropicais, podem ser encontrados na literatura alguns valores orientadores sobre os concentrações consideradas fitotóxicas (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). No caso dos MPs estudados, estes autores sugerem que concentrações na planta entre 100 e 400, e, entre 30 e 300 mg.kg⁻¹ de matéria seca de tecido da parte aérea para o Zn e Pb, respectivamente, são tóxicas. A maior parte do Zn e Pb absorvidos pelas plantas, ficaram retidos nas raízes, sendo que as espécies retiveram concentrações superiores a 1000 mg.kg⁻¹ de Zn mesmo nas baixas concentrações desse metal no solo e superiores à 300 mg.kg⁻¹ de Pb nas raízes dos tratamentos de maior concentração de Pb no solo. Esse fato mostra o papel da raiz como uma barreira ao transporte de metais para a

parte aérea, contribuindo na tolerância destas plantas aos metais estudados, uma vez que apesar dos efeitos nocivos causados pelo excesso dos metais Zn e Pb, a maior parte das mudas conseguiu se desenvolver. Além disso, as concentrações destes metais nas raízes atingiram níveis elevados e superiores aos considerados tóxicos para parte aérea (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Pulford & Watson (2003) descrevem o fato de as espécies arbóreas normalmente reterem a maior parte dos MPs absorvidos do solo em suas raízes, evitando ou reduzindo o transporte para a parte aérea, o que também é considerado um mecanismo de tolerância, e um mecanismo de fitorremediação, a fitoestabilização.

Com relação à concentração desses metais nas folhas, observa-se que para o solo contaminado com Zn, as três espécies apresentaram níveis considerados tóxicos, e com o aumento da concentração de Zn no solo, houve aumento da concentração do metal nas folhas chegando até 700 mg.kg^{-1} , no tratamento de 400 mg.dm^{-3} de Zn no solo na espécie *M. caesapiniaefolia*. No entanto, nas mudas da espécie *S. parahyba* as concentrações foliares de Zn não variaram com a adição doses crescentes de Zn no solo, estando em aproximadamente 400 mg.kg^{-1} . Essa espécie apresentou elevados níveis de Zn nas raízes, em relação às demais, que agiu como uma barreira à entrada do metal.

Caires (2005), trabalhando com mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*) e cedro-rosa (*Cedrela fissilis*) crescendo em solo contaminado com Cu e Zn, verificou que o Zn ficou retido em sua maior parte nas raízes, entretanto as duas espécies estudadas conseguiram transportar grandes quantidades dos metais para a parte aérea. Cupertino (2006), estudando os efeitos dos metais Al, Ni, Cd e Zn em solução nutritiva com seringueira (*Hevea brasiliensis*), também verificou que a maior parte do Zn ficou retido na raiz, e neste caso, a planta se mostrou bastante sensível às concentrações aplicadas (0, 250,

380, 510 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), apresentado sintomas de fitotoxicidade tais como clorose, murchamento e necrose dos tecidos.

No experimento com Pb, também verificou-se aumento das concentrações deste metal nas folhas conforme o aumento das concentrações de Pb no solo. Entretanto, observou-se que somente *E. speciosa* e *S. parahyba* apresentaram concentrações consideradas tóxicas nas folhas. Em *M. caesapiniaefolia* os valores encontrados ficaram abaixo de 30 mg.kg^{-1} , considerados não tóxicos às plantas. No entanto, essa espécie foi bastante sensível às elevadas adições de Zn ao solo, sendo fitotóxica, portanto, a concentração de 30 mg.kg^{-1} para essa espécie.

As concentrações de Pb e Zn encontradas no caule estão na faixa de toxicidade, acima de 30 e 100 mg.kg^{-1} para o Pb e Zn respectivamente, nas espécies avaliadas. O que também demonstra o efeito barreira efetuado pela raiz, não permitindo o translocamento do Pb para a parte aérea.

É sabido que o Pb e o Zn podem promover distúrbios fisiológicos e nutricionais nas plantas (Briat & Lebrun, 1999; Seregin & Ivanov, 2001). Apesar de, em todas as espécies estudadas, a maior parte do Zn absorvido ter ficado retido nas raízes, como descrito por Kabata-Pendias & Pendias (2001), a fitotoxicidade do Zn e Pb foi observada principalmente na parte aérea das plantas, uma vez que os níveis foliares também foram fitotóxicos.

O índice de translocação (IT) de um determinado elemento indica o transporte desse elemento do lugar onde ele é absorvido à parte aérea ou às folhas, ou seja, o quanto do total absorvido pela planta que é transferido para a parte aérea da planta (Abichequer e Bohnen, 1998). Verifica-se que quanto maior a concentração dos metais Zn e Pb no solo, menor o

índice de translocação, ou seja quanto maior a concentração no solo menor foi o transporte proporcional para a parte aérea.

Tanto a adição de Zn quanto a adição de Pb ao solo influenciaram o acúmulo de determinados minerais nos diferentes órgãos das plantas e também interferiram no índice de translocação dos mesmos, como observado em outros estudos (White *et al.*, 1979; Kabata-Pendias & Pendias 2001). Possivelmente as diferenças observadas nas concentrações dos minerais, nas diferentes partes das plantas, estão envolvidas nos distúrbios de crescimento verificados.

Paiva *et al.* (2002), trabalhando com mudas de cedro (*Cedrela fissilis*) e ipê-rôxo (*Tabebuia impetiginosa*), sob altas concentrações de Pb em solução hidropônica, observaram aumento no IT de Zn para a primeira espécie, assim como aqui observado para as mudas da espécie *E. speciosa*. Entretanto, esses autores observaram redução no IT de S nas mudas de cedro, o que também observou-se em *E. speciosa*. Paiva *et al.* (2002), também verificaram redução do IT de Cu, Zn e Fe em mudas de ipê-roxo, como encontrado em *M. caesalpiniaefolia*, e redução de K em mudas de cedro, como ocorreu em *S. parahyba*. Esses autores verificaram também aumento no IT de Mn em cedro, como observado em *M. caesalpiniaefolia*.

Vários trabalhos relatam o aumento no teor de aminoácidos livres em diferentes tecidos vegetais em resposta ao estresse causado por MPs (Sharma & Dietz, 2006; Oliva *et al.*, 2009). Em alguns casos esse aumento é visto como um mecanismo de defesa da planta, principalmente quando os aminoácidos envolvidos são a prolina (Sharma & Dietz, 2006; Tripathi & Gaur 2004), a histidina (Callahan *et al.*, 2006) e a asparagina (Lea *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009), já que estes aminoácidos podem agir como quelantes de alguns

metais, como Cu e Zn, e como moléculas com propriedades antioxidantes (Sharma & Dietz, 2006). No geral, esses aminoácidos livres podem atuar também como osmólitos mantendo o equilíbrio osmótico dentro da célula (Matysik *et al.*, 2002; Lea *et al.*, 2007). A adição de Zn ao solo aumentou a concentração de aminoácidos totais livres nas folhas de *E. speciosa* e *M. caesalpiniaefolia*, o que também foi observado em *S. parahyba* com o aumento da concentração de Pb no solo. O malondialdeído (MDA) é um dos produtos resultantes da peroxidação lipídica das membranas celulares e usado freqüentemente como indicador de estresse oxidativo (Rai *et al.* 2004; Sharma & Dietz 2006). Tanto o Pb quanto o Zn são indutores potenciais de estresse oxidativo nas células vegetais, provavelmente pela geração de radicais livres (Alia *et al.*, 1994; Sharma & Dietz 2006). Na espécie *S. parahyba*, o aumento desses metais no solo causou peroxidação lipídica. Entretanto, as espécies *M. caesalpiniaefolia* e *E. speciosa* apresentaram um sistema antioxidante eficiente no controle de radicais livres, não se observando indicação de peroxidação lipídica.

O excesso de Pb e Zn no solo, também alterou os níveis de nitrato nas folhas de *M. caesalpiniaefolia* e *E. speciosa*. Além disso, observou-se aumento na concentração de amônia no interior das células foliares de *E. speciosa*. O aumento de nitrato pode estar relacionado tanto às perturbações no metabolismo de nitrogênio como à interferência de metais sobre enzimas como a redutase do nitrato (Mazzafra, 1998). A amônia é um produto do metabolismo que pode se tornar tóxico quando acumulado em altas concentrações (Sharma & Dubey, 2005b) e, ao mesmo tempo, é fonte imediata de nitrogênio nas células vegetais (Britto & Kronzucker, 2002). O metabolismo do nitrogênio na espécie *E. speciosa* também pode ter sido afetado pelo aumento do Pb no solo, uma vez que houve redução tanto a atividade da nitrogenase e na massa de nódulos. Estes resultados

evidenciam o efeito tóxico destes metais em alguns dos processos fisiológicos das espécies estudadas.

Neste trabalho utilizaram-se mudas de espécies arbóreas que diferem das árvores maduras de várias maneiras, como na alocação de carbono, na fração de tecidos fotossinteticamente inativos (Turner, 1994). Além disso, as mudas são mais sensíveis às condições adversas, o que pode levar a falsa indicação da capacidade de acumulação de plantas maduras. No entanto, a resposta de mudas expostas a solos contaminados com MPs continua sendo a forma mais comum de avaliação da capacidade de diferentes espécies de tolerar e sobreviver ao estresse (Pulford & Watson, 2003). Além disso, Punshon & Dickinson (1997) mostraram que a tolerância aos metais pesados por diferentes clones do gênero *Salix* (salgueiro) pode ser aumentada com a aclimação gradual das árvores mantidas sob o estresse induzido pelo metal, no solo contaminado. Por isso, é importante observar que neste trabalho, os efeitos do excesso de MPs no solo foram observados na fase de formação de mudas. O mesmo experimento realizado a partir de mudas já formadas, possivelmente revelaria resultados diferentes no que se refere ao potencial fitorremediador destas espécies de leguminosa arbóreas.

A partir das variáveis analisadas, observou-se que de forma geral, os metais adicionados afetaram o crescimento de todas as espécies estudadas. Além disso, os MPs acumularam-se principalmente nas raízes. No entanto, estes elementos foram translocados para a parte aérea, acumulando-se em concentrações consideradas fitotóxicas. O excesso de metais no solo influenciou a concentração e índices de translocação de vários elementos essenciais. Isto pode ter contribuído para o desequilíbrio nutricional causando distúrbios metabólicos que refletiram negativamente no crescimento.

O fato de as espécies arbóreas analisadas serem espécies de leguminosas de crescimento rápido, fácil propagação e sistema radicular extenso, aliado ao fato de conseguirem absorver e concentrar os metais pesados Pb e Zn em quantidades consideradas tóxicas em suas raízes, sugere que podem ser potenciais plantas fitoestabilizadoras de solos moderadamente contaminados.

6. CONCLUSÃO

As espécies arbóreas analisadas podem ser potenciais plantas fitoestabilizadoras de solos contaminados com os MPs Pb e Zn, sendo que, para o Pb a espécie mais tolerante é *M. caesalpiniaefolia* e para o Zn a *E. speciosa*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abichequer, A. D. & Bohnen, H. 1998. Eficiência de absorção, translocação e utilização de P por variedades de trigo. *Rev. Bras. Ci. Solo.* 22:21-26.
- Abreu, M. F., Abreu, C. A., Bataglia, O. C., Marques, J.C. 2000. Protocolo analítico para caracterização química de substrato para plantas. Instituto Agronômico, Centro de pesquisa e desenvolvimento em solos e recursos ambientais. (Não publicado).
- Accioly, A. M. A., Siqueira, J. O. 2000. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Tópicos em Ciência do Solo. (Novaes, R. F., Alvarez, V. H. V., Schaefer, C. E. G. R., Eds.). Soc. Bras. Ci.Solo, Viçosa. pp.299-352.
- 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. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(2):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(3):569-576.
- 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. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 27:945-954.
- Andrade, S.A.L., Abreu, C.A., De Abreu, M.F., Silveira, A.P.D. 2004. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Appl. Soil Ecol.* 26:123–131.

- Andrade, S. A., & Silveira, A. P. 2008. Mycorrhiza influence on maize development under Cd stress and P supply. *Braz. J. Plant Physiol.* 20(1): 39-50.
- Andrade, S. A., Silveira, P. L., Azevedo, R. A., Silveira, A. P., Schiavinato, M. A., Mazzafera, P., et al. 2009. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environ. Exp. Bot.* (Artigo aceito).
- Arriagada, 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 Soil Poll.* 166:31-47.
- Azcón, R., Rubio, R., Barea, J. M. 1991. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N²-fixation N¹⁵, and nutrition of *Medicago Sativa*. *New Phytol.* 117(3):399-404.
- Barea, J. M., Azcon-Aguilar, C., Azcon, R. 1987. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Improve Both Symbiotic N₂ Fixation and N Uptake from Soil as Assessed with a ¹⁵N Technique Under Field Conditions. *New Phytol.* 106(4):717-725.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón R., Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rizosphere. *J Exp Bot.* 56(417):1761–1778.
- Briat, J., & Lebrun, M. 1999. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biol and Pathol.* 322, 43-54.
- Britto, D. T., Kronzucker, J. 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.* 159:567–584.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A. 2007. Zinc in plants. *New Phytol.* 173:677-702.

- Brockwell, J., P. J., Bottomley, J. E., Thies. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174:143–180.
- Burton, K.W., Morgan, E., Roig A. 1984. The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in South Wales forests. II green house experiments. *Plant Soil*. 78:271-282.
- Caires, S. M. 2005. Comportamento de espécies florestais nativas na fitorremediação de solo contaminado com zinco e cobre. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, Tese Mestrado, 74p.
- Callahan, D., Baker, A., Kolev. S., Wedd, A. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11:2-12.
- 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*). *Physiol. Plant*, 83:463-468.
- Carneiro, M. A. C., Siqueira, J. O., Moreira, F. M. 2001. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. *Pesq. agropec. bras.* 36(12):1443-1452.
- Carroll, M.D. & Loneragan, J.F. 1968. Response of plant species to concentrations of zinc in solution. I. Growth and zinc content of plants. *Austral.J.Agric. Res.* 19:859–868.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., Youngs, V.I. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci Plant An.* 6:71-80.

- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 25 de Abril de 2009.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005- E. 2005. Aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 25 de Abril de 2009.
- Chaney, R.L. 1993. Zinc phytotoxicity. In: Zinc in Soil and Plants. (Robson, A.D, ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 135–150.
- Cocking, E.C. & Yemm, E.W. 1954. Estimation of aminoacids by ninhidrin. *Biochem. J.* 58:12-13.
- Cupertino, I. C. F. S. 2006. Respostas morfofisiológicas e nutricionais de plantas jovens de seringueira *Hevea brasiliensis* [(Willd. Ex. Adr. De Juss.) Muell.-Arg.] cultivadas na presença de alumínio, cádmio, níquel e zinco. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, Tese Doutorado, 80p.
- Del Val, C., Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microb.* 718–723.
- Dickinson, N.M., Turner, A.P., Watmough, S.A., Lepp N.W. 1992. Acclimation of trees to pollution stress: cellular metal tolerance traits. *Ann. Bot.* 70:569–72.

- Dixon, R. O. D., & C. T. Wheeler. 1986. Nitrogen fixation in plants. Blackie, Glasgow, United Kingdom.
- Felker, P. 1977. Microdetermination of nitrogen in seed protein extrates. Vol. 49, Analytical Chemistry, Washington 1080p.
- Finlay, R. D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. J. Exp. Bot. 59:1115–1126.
- Gadd, G. M. 1992. Metals and microorganisms; A problem of definition. FEMS Microbiology letters. 100:197-204.
- Ganry, F., Diem, H. G., Dommergues, Y. R. 1982. Effect of inoculation with *Glomus mosseae* on nitrogen fixation by field grown soybeans. Plant Soil 68:321–329.
- Giller, K. E., Witter, E., Mcgrath, S. P. 2009. Heavy metals and soil microbes. Soil Biol Biochem. 41:2031-2037.
- Giovanetti, M.E.& Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84:482-500.
- Graham, P.H. & Vance C.P. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. Field Crop Res. 65:93-106
- Gratão, P. L., Prasad, M. N. V., Cardoso, P. F., Lea, P. J., Azevedo, R. A. 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. Braz. J. Plant. Physiol. 17(1):53-64.
- Gohre, V. & Paszkowski, U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta. 223:1115-1122.

- Gutteridge R.C. & Shelton H.M. 1998. The role of forage tree legumes in cropping and grazing systems. In: Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture (Gutteridge R.C. & Shelton H.M. Eds.). Tropical Grassland Society of Australia Inc., Austrália.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53(366):1-11.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K., Burns, R.C. 1968 .The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.
- Hildebrandt, U., Kaldorf, M., Bothe, H., 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Physiol.* 154:709-711.
- Hildebrandt, U., Regvar, M., Bothe, H., 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry.* 68:139-146.
- Hiscox, J. D. & Israelstam, G. F. 1979. A method for the extration of chorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57:1332-1334.
- Jankong, P. & Visoottiviseth, P. 2008. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic contaminated soil. *Chemosphere,* 72: 1092-1097.
- Joner, E. J., Roos, P., Jansa, J., Frossard, E., Leyval, C., Jakobsen, I. 2004. No significant contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to transfer of radiocesium from soil to plants. *Appl. Environ. Microb.* 6512–6517.
- Kabata-Pendias, A., & Pendias, H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. 3rd Edition, CRC Press, New York.
- Lane, S. D. & Martin, E. S. 1977. A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. *New Phytol.* 79:281-286.

- Lea, P., Sodek, L., Parry, M., Shewry, P., Halford, N. 2007. Asparagine in plants. *Ann.App. Biol.* 150:1-26.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P.; Kaplan, N. O., eds.), Vol. 148, Academic Press. Inc. New York. pp.350-382.
- Lima, C. B. & Athanázio, J. C. 2008. Caracterização comercial de raízes de cenoura de seis ciclos de seleção da variedade 'Londrina'. *Semina: Ciências Agrárias.* 29(3):507-514.
- Lins, C. E. L., Maia, L. C., Cavalcante, U. M. T., Sampaio, E. V. S. B. 2007. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena Leucocephala* (Lam.) De Wit. em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. *R. Árvore.* 31(2):355-363.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., Harrison, M.J. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* 50:529–544.
- Malavolta, E. 1994. *Fertilizantes e Seu Impacto Ambiental: Micronutrientes e Metais Pesados – Mitos, Mistificação e Fatos.* Petroquímica, São Paulo, 153p.
- Marques, T. C. L. L. S. M., Moreira, F. M. M. Siqueira, J. O. 2000. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. *Pesq. Agrop. Bras.* 35(1): 121:132.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 82:525–532.

- Mazzafera, P. 1998. Growth and biochemical alterations in coffee due to selenite toxicity. *Plant Soil*. 189-196.
- Mitchell, H.L. 1972. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *J. Assoc. Off. Analyt. Chem.* 55:1-3.
- Mulongoy, K., Gueye, M., Spencer, D. S. C. 1992. *Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture*. United Kingdom.
- Obbard, J. P. & Jones, K. C. 2001. Measurement of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plants grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge. *Environmental Pollution*, 111(2):311-320.
- Oliva, S. R., Mingorance, M. D., Valdés, B., Leidi, E. O. 2009. Uptake, localisation and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*. *Plant Soil*. DOI: 10.1007/s11104-009-0121-z.
- Paiva, H. N., Carvalho, J. G. De., Siqueira, J. O. 2002. Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. *R. Árvore*. 26(4):467-473.
- Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microb.* 6:763-775.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 52:199-223.

- Phillips, J. M. & Hayman, D. S. 1970 Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Myc. Soc. 55:158-161.
- Polhill, R. M., Raven, P. H., Stirton, C. H. 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. In Advances in Legume Systematics (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.). Vol. 1, Crow Copyright, Kew. pp. 1-26.
- Porter, J. R & Sheridan, R. P. 1981. Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa by arsenate, heavy metals, fluoride, and simulated acid rain. Plant Physiol. 68: 143-148.
- Pulford, I., & Watson, C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. Environ. Inter., 29(4):529-540.
- Punshon, T. & Dickinson, N. M. 1997. Acclimation of *Salix* to metal stress. New Phytol. 37:303-14.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S. N., Mehrotra, S. 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. Plant Sci. 167:1159-1169.
- Raskin, I., Smith, R. D., Salt, D. E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. Curr. Opin. Biotech. 8:221-226.
- Reddy G. N. & Prasad M. N. V. 1990. Heavy metal binding proteins/peptides: Occurrence, structure, synthesis and functions. A review. Environ. Exp. Bot. 30: 251-264.
- Redecker, D., Vonbereswordtwallrabe, P., Beck, D. P., Werner, D. 1997. Influence of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on stable isotopes of nitrogen in *Phaseolus vulgaris*. Biol. Fertil. Soils 24:344-346.

- Robb, J. 1981. Early cytological effects of zinc toxicity in white bean leaves. *Ann. Bot.* 47:829-834.
- Romeiro, S., Lagôa, A. M. M. A., Furlani, P. R., Abreu, C. A., Pereira, B. F. F. 2007. Absorção de chumbo e potencial fitorremediador de *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia*.66(2):327-334.
- Salt, D. E., Smith, R. D., Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Molec. Biol.* 49:643-668.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413-1421.
- Schutzendubel, A. & Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53(372):1351-1365.
- Sharma, P. & Dubey, R.S. 2005a. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(1): 35-52.
- Sharma, P. & Dubey, R. S. 2005b. Modulation of nitrate reductase activity in Rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J. Plant Physiol.* 162: 854-864.
- Sharma, S. S. & Dietz, K. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57(4):711-26.
- Shaw, A. J. 1989. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press, New York, 355p.

- Singh, R. P. & Agrawal, M. 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere*, 67: 2229-2240.
- Silva, S., Siqueira, J. O. Soares, C. R. F. S. 2006. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. *Pesq. Agropec. Bras.* 41(12):1749-1757.
- Soares, C. R. F. S., Siqueira, J. O., Carvalho, J. G., Guilherme, L. R. G. 2006. Micorriza arbuscular e nutrição fosfática na toxidez de zinco para a trema [*Trema micrantha* (L.) Blum.]. *Rev. Bras. Ci. Solo*. 30:665-675.
- Soares, C. R. F. S., Accioly, A. M. A., Marques, T. C. L. L. S. M., Siqueira, J. O., Moreira, F. M. S. 2001. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13(3): 302-315.
- Sudová, R. & Vosátka, M. 2007. Differences in the effects of three arbuscular mycorrhizal fungal strains on P and Pb accumulation by maize plants. *Plant Soil*, 29(1-2):77-83.
- Tan, K.H. *Environmental Soil Science*. 2000. 2nd edition, New York, Marcel Dekker Inc. 452p.
- Tripathi, B. N. & Gaur, J. P. 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta*. 219:397-404.
- Turner. A.P. The responses of plants to heavy metals. 1994. In: *Toxic Metals in Soil-Plant Systems* (Ross, S.M., ed.), Chichester, Wiley, pp.153-87.

- Uenojo, M., Junior, M. R. M., Pastore, M. G. 2007. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*. 30(3): 616-622.
- Vincent, J. M. A. 1970 *Manual for the practical study of root-nodule bacteria*. London: International Biological Programme. 164 p.
- White, M. C., Chaney, R. L., & Decker, A. M. 1979. Differential cultivar tolerance in soybean to phytotoxic levels of soil Zn. II. range of Zn additions and the uptake and translocation of Zn, Mn, Fe and P. *Agron. J.* 71:126-131.
- Weissenhorn, I. & Leyval, C. 1995. Root colonization of maize by a Cd-sensitive and Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant Soil*. 175:233-238.
- Zahran, H. H. 1999. *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *microbiol. Mol. Biol. R.* 1092-2172.
- Zhang, X. H., Zhu, Y-G, Chen, B. D., Lin, A. J., Smith, S. E., Smith, F. A. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to resistance of upland rice to combined metal contamination of soil. *J. Plant. Nutr.* 28:2065–2077.