

ESNEIDER ROJAS VARGAS

**INFLUÊNCIA DO COBRE NA ANATOMIA FOLIAR E NO CRESCIMENTO DE
Joannesia princeps Vell. (EUPHORBIACEAE) ASSOCIADO A UM INÓCULO
MICORRÍZICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Luzimar Campos da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa -
Campus Viçosa**

T

R741i
2022
Rojas Vargas, Esneider, 1990-
Influência do cobre na anatomia foliar e no crescimento de
Joannesia princeps Vell. (Euphorbiaceae) associado a um
inóculo micorrízico / Esneider Rojas Vargas. – Viçosa, MG,
2022.

1 dissertação eletrônica (80 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luzimar Campos da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.587>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Solos - Efeito do cobre. 2. Plantas - Efeito do cobre.
3. Fitorremediação. 4. Micorriza. 5. Fundão, Barragem de (MG).
I. Silva, Luzimar Campos da, 1971-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de
Pós-Graduação em Botânica. III. Título.

CDD 22. ed. 571.954652

ESNEIDER ROJAS VARGAS

**INFLUÊNCIA DO COBRE NA ANATOMIA FOLIAR E NO CRESCIMENTO DE
Joannesia princeps Vell. (EUPHORBIACEAE) ASSOCIADO A UM INÓCULO
MICORRÍZICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

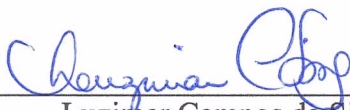
APROVADA: 30 de junho de 2022.

Assentimento:



Esneider Rojas Vargas

Autor



Luzimar Campos da Silva

Orientadora

Dedicatória

Aos meus pais, que sempre tem estado me acompanhando incondicionalmente neste caminho, aos meus amigos e a Viçosa toda, por ter me recebido de braços abertos e permitido conhecer pessoas tão valiosas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Botânica e a CAPES, pela oportunidade e apoio acadêmico e financeiro, que foram fundamentais para desenvolver esta pesquisa, assim como para meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos meus pais, por todo o apoio, carinho e amor incondicional, por terem me acompanhado e apoiado durante este tempo e por terem acreditado em mim. Graças a vocês tenho vivido esta experiência maravilhosa e conseguido aprender muito. Obrigado por serem esses pais animados e felizes, me transmitindo sempre coisas boas! Também ao meu irmão Jeferson, pelo apoio neste processo, companhia e amizade.

À Professora Luzimar Campos, por todos os ensinamentos, orientações e por ser minha guia neste trabalho. Mas também, pela amizade, pelas músicas compartilhadas durante a pandemia, as risadas que nunca faltaram e por todos os momentos bons que compartilhamos dentro e fora da UFV. Você é uma mulher e cientista maravilhosa! Obrigado pelo carinho!

À Professora Catarina Megumi Kasuya pelas grandes contribuições e por ter me auxiliado com todas as dúvidas nos protocolos com inoculação de micorrizas, por ter me brindado o espaço para o desenvolvimento do meu trabalho, e pelas orientações e dicas no desenvolvimento do documento e slides. Agradeço à professora Aristéa e a professora Renata, pelas aulas maravilhosas de anatomia, por terem compartilhado todo esse conhecimento, que me fizeram amar mais as plantas. Também agradeço aos demais professores que aportaram grandemente no meu conhecimento durante meu processo de formação.

Aos Laboratórios de Micorrizas, Biofísica Ambiental, Fisiologia Vegetal, Solos e também, aos técnicos que estiveram me guiando durante o desenvolvimento da pesquisa. E também, às técnicas do laboratório de Anatomia Vegetal Aurora e Rosana por terem me auxiliado quando precisei. Ao Leandro, Daniel e Leonardo pelo tempo, disposição e ensinamentos nas análises de laboratório, fico muito grato de ter recebido a ajuda de vocês! Também quero agradecer à Marliane e ao Paulo, pós-doutorandos do grupo de Micorrizas, por estarem sempre dispostos a resolver qualquer pergunta, em qualquer horário e qualquer dia da semana (hahaha), seus aportes foram fundamentais enquanto fazia a inoculação das minhas plantas antes da virada do ano! Eternamente agradecido!

A todos meus colegas e amigos do laboratório com quem aprendi tantas coisas. Ao Franklin, Camila, Hugo e Michel por terem me ajudado na casa de vegetação o dia da coleta, infinitamente agradecido! Depois daquele dia vi o Cobre com outros olhos Kkkkk. Ao Franklin

pela grande ajuda no micrótomo, pelas risadas e cervejas e momentos bons, sempre tem algo para dizer e é algo que sempre vou admirar. À Camila, muito obrigado por ter me ajudado também com as lâminas, com a bagunça no final quando estava na correria e pela boa companhia no laboratório até as 20h ou 22h, sempre ri demais com tudo o que a gente falava. Ao Hugo, por todos os ensinamentos e grandíssima ajuda no processamento do material, dúvidas com protocolos, até acordando cedo para ir tirar fotos com a gente, por estar sempre com disponibilidade e boa atitude, realmente, muito obrigado por tudo! À Bruna, Adriana e Graciele, também pela disposição, por terem me ajudado com o processamento das amostras e corte no micrótomo, sua ajuda foi muito importante! Quero agradecer também ao Danizete e à Analu por terem me mostrado e contado coisas que não conhecia a respeito de anatomia e do laboratório, e por terem me auxiliado com os protocolos que não tive oportunidade de aprender por conta da pandemia. À Elienai por todos os ensinamentos também, pelas conversações da vida, da gente, pelas risadas, os cafés e os chocolates que compartilhamos! Pela amizade que estava começando! À Josiane da Fitotecnia, pelos doces que levava na cozinha para a gente e pelas risadas no laboratório, e em geral, a toda a galera da Anatomia, que sempre estiveram dispostos a ajudar, a escutar e entender meu sotaque quando cheguei em Viçosa kkk!

Agradeço ao Daniel Carvalho, por sua amizade sincera, confiança, compreensão, respeito e por todas essas gargalhadas cada vez que a gente se encontrava (até para debochar dos cachorros da rua). À Shirley também, por sua amizade, seu carinho e confiança, pelas conversações longas na Rita e todos os momentos, acompanhados sempre de uma boa cerveja! Ao Fred, por todos os meses que compartilhamos e por ter me brindado sua amizade e ter tido toda essa paciência quando queria só fazer piadinhas kkk. Ao Josi, por sua grande amizade e seu grande coração, ao João por todas as conversações de música, de história, da vida e da gente. Ao Douglas, grande amigo de confiança, de risadas e fofocas, sempre animando com essa boa energia. Ao Hélio que conheci aqui na Colômbia, e foi meu primeiro contato com a cultura Brasileira, obrigado por ter me mostrado a beleza desse país que levo agora muito aqui comigo. Também agradeço aos meus amigos da Ocupação Miller, Jefferson, Mona, Welson e Naiara, pelas ceias, almoços, rolês, fofocas, risadas, filmes e momentos especiais que sempre vou ter comigo.

Quero agradecer especialmente ao Thales, por ter feito do meu tempo no Brasil, dias inesquecíveis e maravilhosos, por ter me acompanhado todo este tempo e me mostrado quão valioso é. Agradeço infinitamente seu tempo, seu apoio, sua sinceridade, sua ajuda com tudo, sua companhia incondicional, sua compreensão e também seu carinho e amor.

Agradeço também aos meus amigos da Colômbia Jonathan, Mafe, Diego R., Sebastián, Germán, Mario e Patrícia que apesar da distância, sempre estiveram me acompanhando, apoiando e animando quando era necessário. Também quero agradecer à Sandra, que além de ser minha amiga, foi minha professora e orientadora, quem me ensinou muitas coisas de Botânica e me falou da UFV e sua cidade Viçosa, muito antes de toda esta experiência.

Finalmente quero agradecer ao Brasil, por ter me permitido viver sua cultura, sua gente, seu idioma, sua música e conhecer um pouco da sua história e seu sentir.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

ROJAS-VARGAS, Esneider, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Influência do cobre na anatomia foliar e no crescimento de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) associado a um inóculo micorrízico.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva.

A contaminação causada pelo rompimento da barragem de Fundão da Samarco Mineração em Mariana (MG), tornou-se um problema de interesse global, onde precisa-se buscar estratégias para reduzir a entrada de metais potencialmente tóxicos como o cobre (Cu^{2+}) na biota do solo e na cadeia alimentar. A fitorremediação do rejeito, através do uso de plantas nativas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), tem sido considerada uma estratégia interessante para melhorar os planos de revegetação e restauração de ecossistemas afetados pela extração mineral, devido à degradação de solos impactados pelos rejeitos da barragem em Mariana. Este trabalho teve como objetivo comparar as alterações morfoanatômicas das folhas, assim como variáveis de crescimento, conteúdo de nutrientes, teor de clorofilas, trocas gasosas e a correlação da acumulação de Cu^{2+} na parte aérea frente aos parâmetros medidos, para compreender os mecanismos de tolerância associados a *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), na ausência e presença de inóculo de FMA, exposta a diferentes concentrações de CuSO_4 , (0, 2, 4 e 8 mM). Na anatomia foliar das plantas sem inóculo, ocorreu maior espessamento nas paredes celulares do parênquima paliçádico e redução dos espaços intercelulares do parênquima lacunoso. A histoquímica revelou reações positivas para os testes de lugol, cloreto férrico, vermelho de rutênio e calose no mesofilo, evidenciando maior densidade nos tratamentos das plantas sem inóculo expostas à maior concentração de CuSO_4 . Da mesma forma, *J. princeps*, mostrou menor aquisição de Ca, redução no crescimento da raiz e caule, assim como na condutância estomática (392 %), transpiração (318 %), taxa fotossintética (399 %) e eficiência instantânea de carboxilação (606 %). Entretanto, as plantas inoculadas não evidenciaram alterações na anatomia foliar, e em contraste, foi encontrado um aumento na aquisição de Ca, crescimento e trocas gasosas, melhorando as respostas das mudas submetidas às altas concentrações de CuSO_4 . Os resultados do presente estudo permitiram concluir que *J. princeps*, sem inóculo, acumulou Cu^{2+} principalmente na parte aérea, sem alterar o conteúdo de clorofilas e a eficiência no transporte de água, enquanto que, plantas com inóculo, acumularam Cu^{2+} principalmente na raiz, reduzindo o fechamento estomático e melhorando a taxa fotossintética, assim como a eficiência instantânea da carboxilação. Esses dados sugerem que o inóculo micorrízico associado a *J. princeps*, reduziu o impacto negativo causado pelas

altas concentrações de Cu^{2+} , sugerindo que, *J. princeps* pode ser potencialmente testada em projetos de fitorremediação de áreas contaminadas com altos teores de cobre.

Palavras-chave: Rejeito do Fundão. Endomicorrizas. Anatomia foliar. Parâmetros fotossintéticos. Íons metálicos. Fitorremediação.

ABSTRACT

ROJAS-VARGAS, Esneider, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Influence of copper on leaf anatomy and growth of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) associated with a mycorrhizal inoculum.** Adviser: Luzimar Campos da Silva.

The contamination caused by the rupture of Samarco Mineração's Fundão dam in Mariana (MG) has become a problem of global interest, where strategies must be sought to reduce the entry of potentially toxic metals such as copper (Cu^{2+}) into the biota of the soil and in the food chain. Phytoremediation of the tailings, through the use of native plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), has been considered an interesting strategy to improve the revegetation and restoration plans of ecosystems affected by mineral extraction, due to the degradation of soils impacted by the tailings of the dam in Mariana. This study aimed to compare the morphoanatomical changes of the leaves, as well as growth variables, nutrient content, chlorophyll content, gas exchange and the correlation of Cu^{2+} accumulation in the shoot against the measured parameters, in order to understand the associated tolerance mechanisms to *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), in the absence and presence of AMF inoculum, exposed to different concentrations of CuSO_4 , (0, 2, 4 and 8 mM). In the leaf anatomy of plants without inoculum, there was greater thickening in the cell walls of the palisade parenchyma and reduction of the intercellular spaces of the spongy parenchyma. The histochemistry revealed positive reactions for the tests of lugol, ferric chloride, ruthenium red and callose in the mesophyll, evidencing greater density in the treatments of plants without inoculum exposed to the highest concentration of CuSO_4 . Likewise, *J. princeps* showed lower Ca acquisition, reduced root and stem growth, as well as reduced stomatal conductance (392 %), transpiration (318 %), photosynthetic rate (399 %) and instantaneous carboxylation efficiency (606 %). However, the inoculated plants did not show changes in leaf anatomy, and in contrast, an increase in Ca acquisition, growth and gas exchange was found, improving the responses of seedlings submitted to high concentrations of CuSO_4 . The results of the present study allowed us to conclude that *J. princeps*, without inoculum, accumulated Cu^{2+} mainly in the shoot, without altering the chlorophyll content and water transport efficiency, while plants with inoculum accumulated Cu^{2+} mainly in the root, reducing stomatal closure and improving the photosynthetic rate, as well as the instantaneous efficiency of carboxylation. These data suggest that the mycorrhizal inoculum associated with *J. princeps* reduced the negative impact caused by the high concentrations of Cu^{2+} , suggesting that *J. princeps* can be potentially tested in phytoremediation projects in areas contaminated with high copper contents.

Keywords: Fundão tailings. Endomycorrhiza. Leaf anatomy. Photosynthetic parameters. Metal ions. Phytoremediation.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| REFERÊNCIAS | 17 |
| CAPITULO I..... | 22 |
| Resumo | 22 |
| Introdução..... | 23 |
| Materiais e métodos..... | 24 |
| Material vegetal e condições de cultivo..... | 24 |
| Quantificação de elementos na matéria seca e substrato | 25 |
| Fator de translocação e bioconcentração | 25 |
| Avaliação de crescimento | 25 |
| Teor de pigmentos fotossintéticos e determinação de trocas gasosas..... | 26 |
| Delineamento experimental e análise estatística..... | 26 |
| Resultados..... | 27 |
| Quantificação de elementos na matéria seca e substrato | 27 |
| Fator de translocação e bioconcentração | 28 |
| Avaliação de crescimento | 28 |
| Teor de pigmentos fotossintéticos e determinação trocas gasosas | 29 |
| Discussão | 29 |
| Conclusão | 34 |
| Referencias | 35 |
| Figuras e tabelas | 44 |
| CAPITULO II..... | 53 |
| Resumo | 53 |
| Introdução..... | 54 |
| Material e métodos | 55 |
| Condições de cultivo e delineamento experimental..... | 55 |
| Caracterização visual e estrutural em microscópio de luz..... | 56 |
| Análise histoquímica..... | 57 |
| Resultados..... | 57 |
| Porcentagem de colonização de FMA | 57 |
| Caracterização visual e estrutural em microscópio de luz..... | 57 |
| Análise histoquímica..... | 58 |
| Discussão..... | 59 |

| | |
|-------------------------|----|
| Conclusão | 62 |
| Referências | 62 |
| Figuras e Tabelas | 72 |
| Conclusões Gerais | 80 |

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de mineração gera grande quantidade de poluentes que afetam as características físico-químicas do solo, efluentes e qualidade do ar em todo o mundo (Wu et al., 2017; Xie e Van Zy, 2020). Os rejeitos de mineração são os resíduos sólidos resultantes dessa atividade, caracterizados, normalmente, por apresentar uma estrutura de substrato pobre, baixa concentração de matéria orgânica, além de conteúdos variáveis de metais e metaloides (As, Cd, Cu, Fe, Pb, S, Sb, Zn, Cr, Mn), o que representa um risco ambiental na ausência de uma gestão adequada (Conesa et al., 2007; Rashed, 2010).

No mundo, são gerados cerca de 10 bilhões de toneladas de lama tóxica por ano, proveniente de mineração (Adiansyah et al., 2015), o que tem levado ao aumento do aprimoramento das técnicas associadas à construção de barragens mais resistentes. No entanto, em novembro de 2015, foi relatada uma das maiores catástrofes ambientais no Brasil, a ruptura da barragem de Fundão da Samarco Mineração em Mariana (MG). Estimou-se que 60 milhões de metros cúbicos de rejeitos tóxicos impactaram aproximadamente 668 Km de cursos de água da bacia do rio Doce até o Oceano Atlântico (Segura et al., 2016; Carmo et al., 2017), o que tem demandado um enorme esforço para a recuperação dessas áreas afetadas.

Plantas das impactadas pelos rejeitos de Fundão, em Paracatu de baixo, se caracterizam por apresentar altas concentrações de Cu^{2+} (Coelho et al., 2020). O cobre (Cu^{2+}) é um metal de transição, que atua como micronutriente essencial e tem um papel importante na assimilação de CO_2 em organismos fotossintéticos e como constituinte de plastocianinas e na citocromo c oxidase, para a produção de ATP na cadeia transportadora de elétrons (Marques et al., 2018; Zeng et al., 2019). Entretanto, o incremento de Cu^{2+} pode ser prejudicial para as plantas, aumentando o estresse oxidativo devido a sua toxidez, que pode estar influenciada pelas variações físico-químicas do solo e a interação com óxidos de Fe e Mn (Dias et al., 1999; Alloway, 2012; Nirola et al., 2015; Teixeira et al., 2012; Pan et al., 2017).

A exposição das altas concentrações de Cu^{2+} e outros metais, é considerada uma ameaça ao desenvolvimento e estabelecimento de diferentes populações biológicas e à saúde humana (Radziemska et al., 2017). Dessa maneira, procurar uma abordagem sustentável para reduzir o impacto de metais como o cobre, tem levado a buscar métodos como a fitoestabilização. Esta técnica, utiliza plantas tolerantes ao estresse abiótico e microrganismos como fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que através a absorção pelas raízes, se imobilizam íons metálicos nas hifas e tecidos radiculares das plantas, evitando a passagem

desses elementos para a parte aérea (Mendez et al., 2007; Manoj et al., 2020), reduzindo a probabilidade da entrada para a cadeia alimentar.

A influência dos FMA nas plantas nativas que crescem em rejeitos tem sido investigada. González-Guerrero et al., (2008) constataram, a partir de análises de espectroscopia de energia dispersiva por raios x e microscopia eletrônica de varredura, que o acúmulo de metais nos FMA ocorre na parede celular, citoplasma e vacúolos do micélio extra-radical, conferindo proteção às raízes de seus simbiontes. Resultados semelhantes foram relatados por Nayuki et al., (2014) a partir de microscopia confocal, mostrando que o acúmulo de metais ocorreu nas paredes celulares do micélio extra-radical e raízes de plantas, verificando a atividade dos polifosfatos no vacúolo, envolvidos na quelatação e precipitação de íons metálicos (Wu et al., 2016), evidenciando que estudos anatômicos podem ser indicativos das respostas das plantas inoculadas com FMA frente aos altos teores de íons metálicos.

A homeostase celular de plantas e fungos micorrízicos, bem como os locais de acumulação de metais tóxicos, não foram totalmente elucidados, uma vez que podem ser modificados de acordo com a variação na concentração, nas condições físico-químicas do substrato, espécie de planta e de fungo. Audet e Charest (2007) mencionaram que, sob baixas concentrações de metais, os FMA aumentam o acúmulo de metais nas raízes das plantas, enquanto que, na presença de altas concentrações, a acumulação ocorre, principalmente, na parede celular e vacúolos de hifas, diminuindo a toxicidade nas plantas (Souza et al., 2012; Wu et al., 2016).

A distribuição no acúmulo de metais, pode favorecer parâmetros de crescimento, trocas gasosas e síntese de pigmentos nas plantas inoculadas com FMA (Adeyemi et al. 2021; Al-garni 2006; Andrade et al. 2010; Bhalla e Garg 2021; Clark e Zeto 2008; Dary et al. 2010). Entretanto, foi relatado que os FMA também podem estimular a bioacumulação de metais em caules e folhas (Göhre e Paszkowski, 2006; Khan, 2005). Evidenciando que, a interação entre íons metálicos e plantas associadas a fungos endomicorrízicos, é altamente variável. Portanto, é importante entender as estratégias das plantas inoculadas com FMA, para lidar com a exposição de metais, encontrados na lama dos rejeitos de Fundão.

Diferentes espécies que ocorrem em áreas de solos degradados, têm apresentado tolerância a metais, acumulando concentrações variáveis nos tecidos radiculares. *Joannesia princeps* Vell., é uma espécie nativa que ocorre na Mata Atlântica, relatada em áreas sob influência da mineração (Silva, 2013; Balestrin, 2018) e que é recomendada em reflorestamento, devido à grande quantidade de serapilheira produzida, que serve como fonte de matéria orgânica nos solos degradados e áreas agrofloretais nos estados de Minas Gerais e

Bahia (Gamma-Rodrigues e Barros, 2002; Jaramillo-Botero et al., 2007; Santos, 2016). *J. princeps* apresenta um crescimento rápido e alta produção de biomassa, que pode ser chave em processos de fitorremediação de solos com altos teores de metais, decorrentes da atividade de mineração. Nesta espécie, tem sido encontrada uma ampla gama de respostas frente à exposição de poluentes como chuva ácida, material particulado e glifosato, sendo bastante responsiva e evidenciando sua importância no biomonitoramento de áreas impactadas por poluentes atmosféricos (Araujo, 2021, Andrade et al. 2020; Silva-R, 2020; Silva et al. 2005).

No entanto, não existem estudos focados nas respostas morfofisiológicas frente à exposição de altas concentrações de metais, o que pode ser levado em consideração neste trabalho, visto que apresenta uma alta probabilidade de ser usada em planos de revegetação, junto com a inoculação de FMA nativos das áreas impactadas de Fundão. Desse modo, avaliar as respostas morfoanatômicas e fotossintéticas desta espécie, submetida a altas concentrações de CuSO_4 , é uma oportunidade para aprofundar nas estratégias das plantas nativas se desenvolvendo nas áreas impactadas pelo desastre de Mariana.

Portanto, os objetivos deste estudo foram (1) caracterizar as alterações morfoanatômicas de *J. princeps* frente à exposição de diferentes concentrações CuSO_4 em ausência e presença FMA, (2) determinar os efeitos causados na homeostase de minerais, crescimento, síntese de clorofila e parâmetros fotossintéticos pela exposição de CuSO_4 em plantas sem e com inóculo micorrízico, (3) determinar se o inóculo de FMA reduz a translocação de cobre para a parte aérea e (4) correlacionar as variáveis avaliadas para estabelecer os mecanismos de tolerância associados ao acúmulo de Cu^{2+} em *J. princeps*. Essa abordagem permitirá testar as hipóteses de que a inoculação de FMA diminui as alterações na anatomia foliar, assim como os efeitos negativos no crescimento de *J. princeps*, causados pelo aumento de diferentes concentrações de CuSO_4 . Testará, também, se a acumulação de Cu^{2+} nos tecidos radiculares é aumentada pelo inóculo de FMA, evidenciando seu possível uso em planos de revegetação em áreas de solos degradados pelo rompimento da barragem em Mariana.

- O capítulo I: “Inóculo micorrízico extraído de áreas adjacentes ao desastre de Mariana modificam a captação de cobre e os parâmetros de crescimento de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae)” é um artigo formatado de acordo com as normas do periódico *International Journal of Phytoremediation* (ISSN: 1549-7879). A submissão do mesmo, será feita após modificações sugeridas pela banca avaliadora e posterior tradução ao idioma inglês.

- O capítulo II: “Influência de fungos micorrízicos arbusculares nas respostas morfoanatômicas e histoquímicas das folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) sob toxicidade de cobre” é um artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Chemosphere* (ISSN: 0045-6535). A submissão do mesmo, será feita após modificações sugeridas pela banca avaliadora e posterior tradução ao idioma inglês.

REFERÊNCIAS

- Adiansyah, J.S., Rosano, M., Vink, S., Keir, G., 2015. A framework for a sustainable approach to mine tailings management: disposal strategies. *Journal of cleaner production* 108, 1050-1062.
- Alloway, B. J. (Ed.). (2012). *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability* (Vol. 22). Springer Science & Business Media.
- Audet, P., & Charest, C. (2007). Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution*, 147(3), 609-614.
- Barbosa, B., & Fernando, A. L. (2018). Aided Phytostabilization of mine waste. In *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation* (pp. 147-157). Elsevier.
- Bolan, N. S., Park, J. H., Robinson, B., Naidu, R., & Huh, K. Y. (2011). Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. In *Advances in agronomy* (Vol. 112, pp. 145-204). Academic Press.
- Borie, F., Rubio, R., & Morales, A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation. In *segundo simposio internacional suelos, ecología y medioambiente universidad de la frontera* (Vol. 15).
- Bozzola, J. J.; Russel, L. D. *Electron microscopy*. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 1992, 542 p.
- Carmo, F.F., L.H.Y. Kamino, R. Tobias-Junior, I.C. Campos, F.F. Carmo, G. Silvino, et al. 2017. Fundação tailings dam failures: The environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspect. Ecol. Conserv.* 15:145–151. doi:10.1016/j.pecon.2017.06.002.
- Carvalho, P.E.R. *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, v.1).
- Carvalho, L. M., Caçador, I., & Martins-Louçao, M. A. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. *Plant and Soil*, 285(1-2), 161-169.
- Carrenho, R., Alves, L. D. J., & da Silva Santos, I. (2018). Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Interactions With Heavy Metals and Rehabilitation of Abandoned Mine Lands. In *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation* (pp. 261-279). Elsevier.
- Coelho, D. G., Marinato, C. S., de Matos, L. P., de Andrade, H. M., da Silva, V. M., Neves, P. H. S., & de Oliveira, J. A. (2020). Evaluation of Metals in Soil and Tissues of Economic-Interest Plants Grown in Sites Affected by the Fundação Dam Failure in Mariana, Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*.
- Colzi, I., Arnetoli, M., Gallo, A., Doumet, S., Del Bubba, M., Pignattelli, S., & Gonnelli, C. (2012). Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 91-98.
- Conesa H M, Faz Á, Arnaldos R. 2007. Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain). *Chemosphere*, 66(1): 38–44.

- de Souza, P. B., de Souza, A. L., da Silva Costa, W., Del Peloso, R. V., & de Lana, J. M. (2016). Floristic and diversity of tree species and shrub under a stand of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. *Cerne*, 18(3), 413-421.
- Dias, L. E., Campello, E. F., Ribeiro Jr, E. S., & Mello, J. W. (1999, July). Initial growth of leguminous trees and shrubs in a cut gold mined area in Minas Gerais State, Brazil. In National meeting for the american society for surface mining and reclamation (Vol. 16, pp. 316-321).
- Galal, T. M., Gharib, F. A., Ghazi, S. M., & Mansour, K. H. (2017). Phytostabilization of heavy metals by the emergent macrophyte *Vossia cuspidata* (Roxb.) Griff.: a phytoremediation approach. *International journal of phytoremediation*, 19(11), 992-999.
- Giovanetti, M.E., Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. 84: 482-500.
- Gomes, M. P., Andrade, M. L., Nascentes, C. C., & Scotti, M. R. (2014). Arsenic root sequestration by a tropical woody legume as affected by arbuscular mycorrhizal fungi and organic matter: Implications for land reclamation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(4), 1919.
- Gonzalez-Guerrero, M., Melville, L. H., Ferrol, N., Lott, J. N., Azcon-Aguilar, C., & Peterson, R. L. (2008). Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(2), 103-110.
- Guerra, M. B. B., Teaney, B. T., Mount, B. J., Asunskis, D. J., Jordan, B. T., Barker, R. J., & Schaefer, C. E. G. (2017). Post-catastrophe Analysis of the Fundão tailings dam failure in the Doce River system, Southeast Brazil: Potentially toxic elements in affected soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(7), 252.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366), 1-11.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 27, 27–137.
- Khan, A. G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 18(4), 355-364.
- Khan, A. R., Ullah, I., Waqas, M., Park, G. S., Khan, A. L., Hong, S. J. & Lee, I. J. (2017). Host plant growth promotion and cadmium detoxification in *Solanum nigrum*, mediated by endophytic fungi. *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 180-188.
- Kochian, L. V., Pineros, M. A., & Hoekenga, O. A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. In *Root physiology: from gene to function* (pp. 175-195). Springer, Dordrecht.
- Krzyszowska, M., Rabęda, I., Basińska, A., Lewandowski, M., Mellerowicz, E. J., Napieralska, A., & Woźny, A. (2016). Pectinous cell wall thickenings formation—a common defense strategy of plants to cope with Pb. *Environmental Pollution*, 214, 354-361.
- Leung, H. M., Wu, F. Y., Cheung, K. C., Ye, Z. H., & Wong, M. H. (2010). Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate rock on heavy metal uptake and accumulation by an arsenic hyperaccumulator. *Journal of hazardous materials*, 181(1-3), 497-507.

- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998.
- Luz, C.L.S.; Mitchell, J.D.; Mitchell, J.D.; Mitchell, J.D.; Mitchell, J.D.; Mitchell, J.D.; Pirani, J.R.; Pell, S.K.; Pell, S.K.; Pell, S.K.; Pell, S.K.; Pell, S.K. *Anacardiaceae in Flora do Brasil 2020*. em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. acesso em:08 jun. 2020.
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., & Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 126, 111-121.
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of environmental management*, 254, 109779.
- Marques, D.M., Júnior, V.V., da-Silva, A.B., Mantovani, J.R., Magalhães, P.C., deSouza, T.C., 2018. Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesal pinioideae). *Water Air Soil Pollut.* 229, 138.
- Medina, A., & Azcón, R. (2010). Effectiveness of the application of arbuscular mycorrhiza fungi and organic amendments to improve soil quality and plant performance under stress conditions. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 354-372.
- Mendez M O, Glenn E P, Maier R M. (2007). Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *Journal of Environmental Quality*. 36(1): 245–253.
- Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments—an emerging remediation technology. *Environmental health perspectives*, 116(3), 278-283.
- Nayuki, K., Chen, B., Ohtomo, R., & Kuga, Y. (2014). Cellular imaging of cadmium in resin sections of arbuscular mycorrhizas using synchrotron micro X-ray fluorescence. *Microbes and environments*, ME13093.
- Nirola, R., Megharaj, M., Palanisami, T., Aryal, R., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2015). Evaluation of metal uptake factors of native trees colonizing an abandoned copper mine—a quest for phytostabilization. *Journal of Sustainable Mining*, 14(3), 115-123.
- O'Brien, T. P.; McCully, M. E. (1981). *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcaphi Pty Ltd, Melbourne. 46p.
- Pan C, Liu H, Catalano JG, Qian A, Wang Z, Giammar DE. 2017. Rates of Cr(VI) generation from $\text{Cr}_x\text{Fe}_{1-x}(\text{OH})_3$ solids upon reaction with manganese oxide. *Environ Sci Technol* 51:12416-12423.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., & Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in plant science*, 12(6), 267-277.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S. (1970) Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Prado, I.G.O., Silva, M.C.S., Prado, D.G.O., Kemmelmeier, K., Pedrosa, B.G., Silva, C.C., Kasuya, M.C.M., 2019. Revegetation process increases the diversity of total and arbuscular

- mycorrhizal fungi in areas affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 141, 84–95.
- Prasetyo, B., Krisnayanti, B. D., Utomo, W. H., & Anderson, C. W. N. (2010). Rehabilitation of artisanal mining gold land in West Lombok, Indonesia: 2. Arbuscular mycorrhiza status of tailings and surrounding soils. *Journal of Agricultural Science*, 2(2), 202.
- Radziemska, M., Vaverková, M. D., & Baryła, A. (2017). Phytostabilization— management strategy for stabilizing trace elements in contaminated soils. *International journal of environmental research and public health*, 14(9), 958.
- Rashed, M. N. (2010). Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *Journal of hazardous materials*, 178(1-3), 739-746.
- Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, (2016). Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813– 825. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.005.
- Shackira, A. M., & Puthur, J. T. (2019). Phytostabilization of Heavy Metals: Understanding of Principles and Practices. In *Plant-Metal Interactions* (pp. 263- 282). Springer, Cham.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid- derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of experimental botany*, 57(4), 711-726.
- Souza, L. A., de Andrade, S. A. L., de Souza, S. C. R., & Schiavinato, M. A. (2012). Arbuscular mycorrhiza confers Pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(2), 523-531.
- Teixeira, A. P., Tristão, J. C., Araujo, M. H., Oliveira, L. C. A., Moura, F. C. C., Ardisson, J. D., Amorim, C. C., & Lago, R. M. (2012). Iron: a versatile element to produce materials for environmental applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(9), 1579-1593. Epub October 02, 2012. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012005000039>.
- Valentín-Vargas, A., Root, R. A., Neilson, J. W., Chorover, J., & Maier, R. M. (2014). Environmental factors influencing the structural dynamics of soil microbial communities during assisted phytostabilization of acid-generating mine tailings: a mesocosm experiment. *Science of the total environment*, 500, 314-324.
- Wu, S. L., Chen, B. D., Sun, Y. Q., Ren, B. H., Zhang, X., & Wang, Y. S. (2014). Chromium resistance of dandelion (*Taraxacum platyepidum* Diels.) and bermudagrass (*Cynodon dactylon* [Linn.] Pers.) is enhanced by arbuscular mycorrhiza in Cr (VI)-contaminated soils. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(9), 2105-2113.
- Wu, S., Zhang, X., Sun, Y., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., ... & Zheng, L. (2016). Chromium immobilization by extra-and intraradical fungal structures of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Journal of hazardous materials*, 316, 34-42.
- Xie, L., & van Zy, D. (2020). Distinguishing reclamation, revegetation and phytoremediation, and the importance of geochemical processes in the reclamation of sulfidic mine tailings: A review. *Chemosphere*, 126446.
- Yang, S., Liang, S., Yi, L., Xu, B., Cao, J., Guo, Y., & Zhou, Y. (2014). Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing on manganese mine tailings. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 8(3), 394-404.

Zeng, Q., Ling, Q., Wu, J., Yang, Z., Liu, R., Qi, Y., 2019. Excess copper-induced changes in antioxidative enzyme activity, mineral nutrient uptake and translocation in sugarcane seedlings. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103 (6), 834e840.

CAPITULO I

Inóculo micorrízico extraído de áreas adjacentes ao desastre de Mariana modificam a captação de cobre e os parâmetros de crescimento de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae)

Esneider Rojas Vargas, Luzimar Campos da Silva*

Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

**Autor para correspondência: luzimar@ufv.br*

Resumo

Joannesia princeps Vell. (Euphorbiaceae) ocorre em áreas próximas a solos contaminados por metais em Mariana, que apresentam um aumento progressivo na diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Objetivou-se determinar as respostas no crescimento desta espécie, na presença de um consórcio micorrízico em casa de vegetação, com concentrações de 0, 2, 4 e 8 de CuSO_4 . As plantas que cresceram sob 8 mM de CuSO_4 sem inóculo, evidenciaram acúmulo de Cu^{2+} 5 vezes mais alta que na concentração de 0 mM. Por outro lado, houve um incremento significativo de Cu^{2+} na raiz das plantas inoculadas na mesma concentração. Não foram observadas variações na massa seca ou conteúdo de clorofilas em resposta à entrada de Cu^{2+} . No entanto, plantas inoculadas apresentaram o aumento no crescimento da raiz (49%), da fotossíntese (70%) e da eficiência instantânea de carboxilação (74%) em comparação às plantas sem inóculo. Nas plantas sem inóculo, o aumento de Cu^{2+} na parte aérea, altos fatores de translocação, sem mostrar variações significativas na síntese de clorofilas ou eficiência no uso de água, evidencia o potencial de *J. princeps* em programas de fitoextração. Por outro lado, o inóculo favoreceu o acúmulo de Cu^{2+} na concentração de 8 mM, sugerindo sua aplicação em processos de fitoestabilização de Cu^{2+} em áreas de solos poluídas por esse metal. Concluímos que *J. princeps* tem potencial de ser implementada em processos de fitoextração e fitoestabilização de cobre em presença de FMA, portanto, recomenda-se aprofundar nas respostas metabólicas associadas à exposição por esse metal.

Palavras-chave: Metais tóxicos, fitorremediação, FMA, fotossíntese, rejeitos de mineração, plantas nativas.

Introdução

Tem sido relatado recentemente o aumento do conteúdo Cu^{2+} e outros metais nas áreas impactadas pelo rejeito de Fundão, como resultado de processos redox entre óxidos de Fe e Mn. Isso tem alterado o estado de oxidação dos metais na matriz do solo, promovendo sua biodisponibilidade na vegetação de Mariana, MG (Coelho et al. 2020; Quaresma et al. 2021; Queiroz et al. 2021). Entretanto, fungos micorrízicos arbusculares (FMA), tem sido considerados agentes que minimizam a toxicidade por metais, visto que favorecem a compartimentalização de íons metálicos nas hifas e raízes da planta hospedeira (Jordão et al. 2021; Puthur 2020; Santana et al. 2018; Gonzalez-Chavez et al. 2002). Assim, os FMA reduzem o fluxo de íons para a parte aérea e, em consequência, modificam o fator de translocação e bioconcentração na raiz da planta hospedeira, sendo fundamentais nos processos de fitorremediação (Adeyemi et al. 2021; Al-garni 2006; Bhalla and Garg 2021). Os FMA melhoram a homeostase de S e P nas plantas, reduzindo o estresse oxidativo nas células, visto que que esses elementos estão relacionados com a síntese de ligantes como ácidos orgânicos, fitoquelatinas e metalotioneínas, que tornam os metais menos reativos no citoplasma das células (Puthur et al., 2020; Rascio e Navari-Izzo, 2011; Souza et al., 2011).

O Cu^{2+} é um metal de transição e micronutriente essencial, importante na catálise de diferentes reações químicas associadas à fotossíntese (Festa & Thiele, 2011; Amin et al. 2019). No entanto, seu excesso nas plantas pode deslocar outros íons metálicos de proteínas estruturais e catalíticas, gerando radicais livres e propiciando o estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1984; Macomber e Imlay 2009). Altos teores de Cu^{2+} alteram o metabolismo e a síntese de clorofilas, propiciando o fechamento estomático, a diminuição na captação de CO_2 e em consequência, reduz o crescimento da planta (Dalcorso et al. 2014; Küpper e Andresen 2016). No entanto, a influência de FMA em plantas submetidas a altas concentrações de Cu^{2+} , favorecem sua estabilização no solo e acumulação nas raízes (Santana et al. 2018; Toler et al. 2005). Essa resposta, tem sido atribuída às modificações na parede da célula vegetal, propiciada por FMA, incrementando a imobilização de Cu^{2+} nessa região e evitando sua entrada na membrana celular (Zhang et al. 2009). Por outro lado, Andrade et al. (2010), registraram um aumento na síntese de prolina em *Coffea arabica*, como mecanismo antioxidativo, propiciado por um inóculo misturado com *Glomus carum*, *Gigaspora margarita* e *Acaulospora* sp. Dessa maneira, a alteração no metabolismo vegetal causado pelo excesso de Cu^{2+} pode ser reduzido através da inoculação de FMA, fornecendo maior tolerância às plantas que se desenvolvem em áreas de mineração.

Joannesia princeps Vell. (Euphorbiaceae), ocorre em áreas sob influência da mineração (Silva, 2013; Balestrin, 2018), próximas aos rejeitos, provenientes do rompimento da barragem da Samarco, em Mariana – MG, que em novembro de 2015, estimou-se que 60 milhões de metros cúbicos de lama tóxica, impactaram os solos e cursos de água da bacia do rio Doce (Segura et al., 2016; Carmo et al., 2017). *J. princeps* é amplamente utilizada em reflorestamento (Santos, 2016), porque apresenta rápido crescimento e produção de biomassa, tornando-a uma espécie com potencial para ser implementada em processos de fitorremediação de áreas degradadas (Andrade et al. 2020; Dary et al. 2010; Yang et al. 2014).

Assim, é importante conhecer as respostas desta espécie ao incremento de metais potencialmente tóxicos, que não tem sido estudado até agora, assim como a inoculação de FMA para conhecer seu efeito sob as variáveis de crescimento. A hipótese deste trabalho é que a influência de FMA extraídos de áreas de mata nativa em Paracatu de Baixo, Mariana – MG, pode reduzir os efeitos negativos no crescimento, causados pelo aumento de diferentes concentrações de CuSO_4 em casa de vegetação, regulando a entrada de Cu^{2+} e aumentando sua acumulação na raiz e no substrato. Os objetivos do presente trabalho foram: avaliar as alterações na aquisição de nutrientes, crescimento, síntese de pigmentos e trocas gasosas, causadas pela exposição de diferentes concentrações de CuSO_4 ; determinar se o inóculo de FMA otimiza a acumulação de Cu^{2+} nas raízes; e estabelecer a correlação da acumulação de Cu^{2+} com as variáveis de crescimento para elucidar os mecanismos de tolerância associados a *J. princeps*.

Materiais e métodos

Material vegetal e condições de cultivo

Este estudo foi realizado em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa (UFV) - MG, Brasil (20 ° 45'20``S, 42 ° 52 '40"O), com sementes coletadas em áreas de solo próximas a árvores matrizes de *J. princeps* do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa (MG, Brasil). O inoculante micorrízico, extraído de uma área de mata nativa em Mariana (MG, Brasil) (20 ° 18'8,73"S – 43 ° 14'11,13"W) foi produzido pelo método “On Farm” (mistura de bagaço de cana de açúcar e vermiculita; 1:1:1 e 1% de composto orgânico) utilizando *Sorghum bicolor* L. como hospedeiro (Moreira et al., 2019; Prado et al., 2021), e concedido pelo Laboratório de Associações Micorrízicas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura – Bioagro, com esporos de *Glomus albidum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora scrobiculata*.

As sementes de *J. princeps* foram colocadas em NaClO 1% durante 5 minutos, seguido da quebra da dormência por escarificação mecânica. Após 20 dias do processo germinativo em copos plásticos, as mudas foram colocadas em tubetes de 250 mL, contendo 10% de inóculo (36 esporos por amostra) e 90% de substrato florestal, tipo Topstrato HT® (N: 0.06%; P: 0.05; K: 0.08%; Ca: 0.21%; Mg: 0.14%; S: 0.19%; Zn: 10.8 ppm; Fe: 13200,4 ppm; Mn: 46.9 ppm; Cu: 8.6 ppm; B: 7.6 ppm; CO: 3,43%; Na: 0.0032%; C/N: 57,16; pH: 5.77). Após 30 dias, foi avaliada a colonização de FMA em raízes finas de *J. princeps*, realizando o clareamento de fragmentos radiculares aleatoriamente coletados (Phillips & Hayman 1970) para a determinação da porcentagem de colonização micorrízica nas mudas (Giovannetti & Mosse 1980), antes de serem levadas para o substrato contaminado com cobre, que foi misturado com 3 soluções de CuSO₄ (2, 4 e 8 mM) e mantido no escuro para sua estabilização.

Posteriormente, 40 mudas dos tratamentos sem e com inóculo foram transplantadas dos tubetes para vasos com substrato contaminado, mantidas durante um período de 35 dias e irrigadas com água três vezes por semana até o dia da coleta.

Quantificação de elementos na matéria seca e substrato

Foram determinados os teores de Cu²⁺, S, P e Ca no substrato e plantas de *J. princeps*, divididas em parte aérea e raízes. O material foi seco em estufa a 75° C, pesado, moído e posteriormente, digerido em solução nitro-perclórica (HNO₃ - HClO₄). O Cu²⁺ e Ca foram determinados por absorção atômica (modelo Spectra 220 FS, Varian, Austrália) segundo Malavolta et al. (1989); o S por turbidimetria e o P por teste colorimétrico (Quin & Woods, 1976). O fator de translocação e bioconcentração de Cu²⁺ foi calculado de acordo com a metodologia proposta por Abdul et al. (2009).

Fator de translocação e bioconcentração

O fator de translocação (FT) e de bioconcentração (FBC) foram calculados de acordo com Mellem et al. (2012), sendo FT o valor que indica a capacidade do metal ser transferido das raízes para a parte aérea e o FBC, o valor que indica a capacidade das plantas em remover compostos metálicos.

Avaliação de crescimento

No final do experimento, foi determinado o comprimento do caule e da raiz principal após 65 dias de exposição a CuSO_4 , com auxílio de uma fita métrica. Posteriormente, parte aérea e raízes das plantas sem e com inóculo, foram divididas e colocadas em estufa até atingir peso constante para determinação da massa seca.

Teor de pigmentos fotossintéticos e determinação de trocas gasosas

Foram extraídos os pigmentos de 4 discos, de 0,5 cm de diâmetro, do quarto nó de folhas expandidas sem sintomas visuais. Estes foram colocados em 8 mL de Dimetilsulfóxido (DSMO) durante 48 horas no escuro, após, foram secos em estufa a 45°C e pesados em balança analítica. 300 μL do extrato resultante foram colocados em poços de placa ELISA e levados a um espectrofotômetro (Serie 600, BECKMAN DU, Fullerton, California) com leitor de microplacas, para determinar a absorvância da clorofila a, b e carotenoides a 663, 646 e 470 nm respectivamente. As equações para obter o teor de pigmentos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco foram calculadas de acordo com os métodos propostos por Wellburn (1994).

A determinação de trocas gasosas foi feita de 8h até 12h sob folhas expandidas do quarto nó, 60 dias depois da exposição das plantas às concentrações de CuSO_4 , usando um analisador de gases infravermelho LI- 6400 (IRGA, LI-COR, Nebraska, USA), com intensidade luminosa constante de $1000 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $400 \mu\text{m}$ de CO_2 . Foram realizadas três medições por folhas em intervalos de 1 minuto, para garantir a estabilidade das leituras. A condutância estomática (G_s , $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$) e a eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) foram avaliadas no presente trabalho.

Delineamento experimental e análise estatística

Os tratamentos consistiram em plantas sem inóculo (S-in) e inoculadas (C-in), com quatro concentrações de CuSO_4 (0, 2, 4 e 8 mM) e 5 repetições para cada concentração ($2 \times 4 \times 5 = 40$). Testes de normalidade e homocedasticidade foram verificados, assim como análises de variância ANOVA e Kruskal-wallis, juntamente com testes de comparação múltipla (HSD de Tuckey) e provas de t-student para comparar as respostas entre os tratamentos sem e com inóculo. Também foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson (CCP) e a Análise de Componentes Principais (PCA) entre os diferentes atributos. As análises estatísticas foram

realizadas em GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.) e no pacote estatístico R v.3.3.1 para CCP e PCA (disponível em www.r-project.org).

Resultados

Quantificação de elementos na matéria seca e substrato

Nos tratamentos sem inóculo, o teor de Cu^{2+} nas mudas de *J. princeps* foi maior na parte aérea que nas raízes. Na concentração 8 mM, houve aumento de Cu^{2+} 5 vezes maior que o encontrado nas plantas da concentração 0 mM. Na parte aérea das mudas com inóculo, verificou-se redução significativa de Cu^{2+} nas concentrações de 0 e 8 mM. Nas raízes inoculadas, o teor de Cu^{2+} foi significativamente maior na concentração de 8 mM, 2.3 vezes mais alto em comparação das raízes sem inóculo (Fig. 1A, B).

Foi observado um acúmulo progressivo de Cu^{2+} no substrato em resposta ao aumento de CuSO_4 (Fig. 1C). Na concentração de 4 mM sem inóculo, houve um acúmulo 3 vezes maior a respeito de 0 mM de CuSO_4 . No substrato com inóculo, houve maior acúmulo de Cu^{2+} a partir da concentração de 2 mM, que se manteve na concentração de 4 mM. Nas concentrações de 0 e 8 mM com inóculo, ocorreu um incremento de Cu^{2+} 1.36 e 2.95 vezes maiores que nas concentrações sem inóculo e 6 vezes mais alto com relação à 0 mM (Fig. 1C). O pH não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos com ausência (variando de 5.32 a 5.70), ou presença (variando de 5.11 a 5.36) do inóculo nas diferentes concentrações de CuSO_4 (Tabela 1).

Na parte aérea das plantas sem inóculo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no conteúdo de S, enquanto que, houve uma diminuição desse elemento nos tratamentos com inóculo nas concentrações de 4 e 8 mM com relação a 0 mM (Fig. 2B). A parte aérea das plantas expostas a 4 mM com inóculo, registraram menores conteúdos de S a respeito das que não tinham inóculo de FMA. Nas raízes sem inóculo, o S não apresentou diferença significativa entre as concentrações de CuSO_4 (Fig. 2A). Nas raízes inoculadas, o S reduziu nas concentrações de 2 e 4 mM em comparação com 0 mM. Da mesma forma, nas raízes inoculadas das concentrações de 0 e 2 mM, foram encontradas reduções significativas de S a respeito das plantas sem inóculo. O conteúdo de P nas plantas, não foi alterado sem e com inóculo, nem nas raízes e parte aérea (Fig. 2C-D).

A aquisição de Ca na parte aérea foi reduzida significativamente na maior concentração de CuSO_4 sem e com inoculação de FMA, em comparação com 0 mM (Figura

2F). Nas plantas inoculadas da concentração de 8 mM, foi encontrado um incremento significativo de Ca em comparação com as plantas sem inóculo. Nas raízes, foi encontrada uma redução na concentração de 2 mM, que se manteve até a concentração de 8mM em comparação às plantas da concentração de 0 mM (Fig. 2E). Para as raízes inoculadas, o Ca foi significativamente maior em 8 mM com relação à mesma concentração sem inóculo.

No substrato, o S foi significativamente maior em 0 mM nas plantas sem inóculo. O conteúdo de P não registrou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Enquanto que para Ca, houve incrementos significativos nas concentrações de 2 e 4 mM do substrato com inóculo (Tabela 1).

Fator de translocação e bioconcentração

O FT das mudas com inóculo de FMA, foi significativamente reduzido em 0 mM em comparação às plantas não inoculadas (Tabela 2). Nas concentrações de 4 e 8 mM dos tratamentos sem inóculo foram registrados valores acima de 1 (1.57 e 3.21 respectivamente). Nas concentrações de 2, 4 e 8 mM das plantas inoculadas, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas no FT, mantendo-se abaixo de 1 (0.69, 0.85 e 0.92 respectivamente).

Os FBC de Cu^{2+} não registraram diferenças estatisticamente significativas nas raízes sem e com inóculo (Tabela 2). Na parte aérea, houve um aumento significativo na bioconcentração de Cu^{2+} , nas concentrações de 0 e 8 mM das plantas sem inóculo, e com valores acima de 1 para a concentração de 8 mM (1.17).

Avaliação de crescimento

O comprimento da parte aérea de *J. princeps* sem inóculo, diminuiu significativamente na concentração de 8 mM em comparação ao tratamento 0 mM (Tabela 3). Porém, houve um incremento no comprimento do caule de 36% nas mudas inoculadas de 8 mM (Tabela 3). O comprimento das raízes sem inóculo, foi significativamente reduzido em 8 mM enquanto que o inóculo promoveu seu crescimento um 49% na mesma dose (Tabela 3). Entretanto, na concentração de 0 mM, encontrou-se uma redução significativa do comprimento da raiz nas plantas com inóculo. A massa seca da raiz e parte aérea não variou com o incremento das concentrações de CuSO_4 (Tabela 3).

Teor de pigmentos fotossintéticos e determinação trocas gasosas

Não foram encontradas diferenças significativas no teor de pigmentos de clorofila a, b e carotenoides tanto nas plantas sem inóculo, quanto nas plantas inoculadas de *J. princeps* em relação às diferentes concentrações de CuSO_4 (Tabela 4).

Houve redução significativa da condutância estomática (G_s), transpiração (E) e fotossíntese (A), no tratamento de 8 mM das plantas sem inóculo (392%, 318% e 399% respectivamente), em comparação às plantas da concentração 0 mM (Fig. 3A, B, C). Nas plantas com inóculo, ao contrário, foi encontrado um aumento significativo da condutância estomática (65%), transpiração (46%) e taxa fotossintética (70%), na concentração de 8 mM em comparação às plantas sem inóculo. A concentração interna de CO_2 (C_i) nas mudas sem inóculo não evidenciou incrementos significativos (Fig. 3D). Foi verificada redução na eficiência de carboxilação (A/C_i) nas plantas sem inóculo, nas concentrações 2 e 8 mM de CuSO_4 de 306 e 606%, respectivamente (Fig. 3E). Por outro lado, foi encontrado um incremento significativo de 74% em A/C_i na concentração de 8 mM das plantas inoculadas. A eficiência do uso de água não foi afetada pelo aumento de CuSO_4 em nenhum dos tratamentos (Fig. 3F).

A correlação do efeito das concentrações de CuSO_4 nas variáveis medidas no experimento foi estabelecida a partir do coeficiente de Pearson e por meio da PCA (Fig. 4). Observou-se que, nas plantas sem inóculo, dois componentes principais explicaram o 89.4 % da variabilidade total dos dados, correspondendo a 57.9% no primeiro eixo, positivamente correlacionado com A/B (Razão entre clorofila a e b), PR (P na raiz) e significativamente com SA (S na parte aérea) e CuA (Cu^{2+} na parte aérea), onde este último representou uma relação inversa com CaA (Ca na parte aérea), indicando o CuA como o componente com maior correlação em PC1 e PC2. Enquanto que, nas plantas com inóculo, a variância foi de 56.9% para PC1 mostrando correlações positivas com A, A/C_i , G_s , A/B, E e CuR (Cu^{2+} em raiz); e negativas entre CuA e PA (P aéreo); CuA e C_i ; CR (comprimento da raiz) e CHIA (Clorofila a) e CuR, explicando uma variabilidade de 29.1% para PC2 (Fig. 5).

Discussão

A interação dos metais entre solo e planta, está determinada pelas características físicas e químicas de cada elemento. O Cu^{2+} é um metal fortemente ligado à matéria orgânica e à rizosfera, porém, em altas concentrações, sua entrada pode aumentar através do tecido radicular (Lem, 2013; Degryse et al., 2008; Pedersen et al., 2000). Neste estudo, o aumento de Cu^{2+} no

substrato sem inóculo, cessou na concentração de 4 mM, evidenciando que a exclusão desse metal por parte das raízes, foi alterada em 8 mM, o que sugere que a partir dessa concentração, a distribuição de Cu^{2+} é drasticamente modificada para a parte aérea de *J. princeps*. O aumento inesperado de cobre no caule e folhas, tem sido um padrão anteriormente registrado, mostrando que, o sistema de regulação da entrada e distribuição de cobre no corpo da planta, são modificados em resposta aos altos teores de Cu^{2+} no solo (Baker e Walker, 1990; Pedersen et al. 2000). Esse resultado sugere que concentrações moderadas de CuSO_4 no substrato sem inóculo (2 e 4 mM), não alteram o teor de Cu^{2+} na parte aérea e nas raízes de *J. princeps* (valores normais entre 7 e 9 mg kg^{-1}). Enquanto que, concentrações de 8 mM de CuSO_4 no substrato, podem aumentar até 4 vezes a concentração de Cu^{2+} na parte aérea (54,45 mg kg^{-1}), ultrapassando os limites permitidos desse metal nas plantas (15 mg kg^{-1}).

Os sistemas de regulação de captação de metais nas plantas, podem ser modificados pela presença de FMA. Neste trabalho foi observado que, na concentração de 8 mM, o conteúdo de cobre no substrato com inóculo foi maior a respeito do conteúdo nas raízes, sugerindo que a inoculação de FMA pode ter modificado a liberação de exsudatos radiculares, e em consequência, foi propiciada a complexação de íons de Cu^{2+} no substrato. A presença de FMA nas plantas aumenta a síntese de ácidos orgânicos e produção de glomalina, os quais promovem uma maior imobilização de metais potencialmente tóxicos no solo (González-Chavez et al. 2004; González-guerrero et al. 2009; Schutzenhubel et al. 2002). Dessa maneira, pode se inferir que o inóculo, promoveu a liberação de ácidos orgânicos no substrato, assim como a quelação de Cu^{2+} nos vacúolos de FMA e da raiz de *J. princeps*, melhorando a resposta frente ao estresse causado pelas altas concentrações de Cu^{2+} , reduzindo sua translocação para a parte aérea.

Neste estudo, se evidenciou que as plantas sem inóculo, podem ser potencialmente usadas na fitoextração de Cu^{2+} , visto que o FT foi alto (>2) e o FBC baixo (<1) na maior concentração de CuSO_4 . Enquanto que, o inóculo usado neste trabalho, reduziu a translocação de Cu^{2+} , restringindo-o nas raízes de *J. princeps*. O anteriormente mencionado, se ajusta com o relatado por Adeyemi et al. (2021), onde o acúmulo de Cu^{2+} ocorreu principalmente nas raízes, devido à presença de cepas de *Funneliformis mosseae*, que diminuíram a entrada de cobre no caule e folhas de *Glycine max* L., mudando o fator de translocação, devido ao acúmulo de Cu^{2+} principalmente nas hifas de *F. mosseae*. Por outro lado, o acúmulo de metais nos FMA, pode ocorrer na parede do micélio extra-radical (Galli et al. 1994; Joner et al. 2000) ou por meio da quelação com moléculas orgânicas, que favorecem sua complexação nos vacúolos contendo grupos de polifosfatos (polyP) (González-Guerrero et al. 2008). Esses grupos de polyP, promovem o acúmulo de metais nas vesículas intra-radiciais dos FMA, que estão associados às

raízes hospedeiras (Adeyemi et al. 2021; Aggarwal et al. 2011). Dessa forma, podemos inferir que o inóculo de FMA extraído das áreas adjacentes ao rejeito de Mariana, auxiliaram na quelatação de Cu^{2+} através das diferentes estruturas fúngicas, que influenciaram no FT de *J. princeps*, provavelmente através da captação de íons metálicos por meio da liberação de ácidos orgânicos ou da quelatação com grupos polyP.

A disponibilidade de P no solo e aumento do conteúdo nos tecidos vegetais, é potenciada por fungos micorrízicos (Elhindi et al. 2018; Stroud 2015), devido ao transporte de P na forma de polyP, através das hifas para a raiz (Ezawa & Saito 2018). Entretanto, as plantas inoculadas não apresentaram esse incremento, possivelmente, em resposta ao efeito negativo do aumento das concentrações de CuSO_4 no substrato, que inibiram a entrada de fosfatos através da raiz. Resultados similares, relatados por Feil et al. (2020), mostraram que o efeito das altas concentrações de CuSO_4 , sob *Cucumis sativus*, afetaram diretamente os transportadores CsPT1.4 e CsPT1.9, reduzindo a capacidade de aquisição de P por parte de plantas inoculadas com FMA. Assim, acredita-se que o aumento de CuSO_4 no substrato, influenciou negativamente o transporte de P na forma de polyP, através das hifas para as raízes de *J. princeps*, diminuindo sua entrada para a raiz ou parte aérea.

A entrada de Ca nas plantas, é diminuída em resposta a altos teores de metais (Gomes et al. 2012; Ja 2005; Österås and Greger 2006), devido às características físicas e químicas dos elementos, que promovem a competência pela entrada através das raízes (Eller e Brix, 2016). A queda de Ca nas plantas sem e inclusive, com inóculo de 8 mM, evidencia o impacto do Cu^{2+} na entrada de Ca para a raiz e parte aérea, o que permite inferir que, a partir de 8 mM de CuSO_4 , a homeostase de Ca começa a ser afetada nas mudas de *J. princeps*. Apesar do Ca ser diminuído nas plantas inoculadas da maior concentração, sua aquisição foi significativamente a respeito das plantas sem inóculo, devido a que FMA também estabiliza a homeostase de nutrientes sob condições estressantes (Aggarwal et al. 2011; Clark and Zeto 2008), o que mostra que, embora, o Ca foi diminuído nas plantas com inóculo, estas mostraram maiores conteúdos de Ca na parte aérea que nas plantas de 8 mM sem inóculo de FMA.

Tem sido relatado que tanto o crescimento das raízes, quanto o incremento na aquisição de S em plantas, é aumentado pela inoculação de FMA (Zhan et al. 2013, 2018). No entanto, o comprimento das raízes e o conteúdo de S em *J. princeps* foi significativamente reduzido em plantas com inóculo sob concentrações baixas de CuSO_4 . Tem sido discutida a especificidade na resposta das plantas hospedeiras com relação à colonização de FMA, visto que dependendo das condições do solo das espécies de planta e fungo, a interação pode passar de ser mutualista a parasítica (Friede et al., 2016; Johnson et al., 1997). Li et al. (2011),

encontraram relações mutualistas entre fungo-planta em substratos contaminados com metais, enquanto que, sob concentrações baixas, foi relatado um efeito negativo no crescimento das plantas colonizadas. Portanto, é necessário aprofundar na interação entre as diferentes cepas de fungos presentes no inóculo deste estudo, para estabelecer sua interferência nas respostas de *J. princeps* frente ao aumento nas concentrações de cobre.

A dinâmica na captação de água e nutrientes através das raízes, está relacionada com o crescimento e vitalidade das plantas, porém, sob condições estressantes essas características podem ser afetadas. Entretanto, a inoculação de FMA em pode melhorar o crescimento vegetal, propiciando condições ótimas em solos poluídos (Al-garni 2006; Riaz et al. 2021). Neste trabalho, foi observado que o comprimento do caule e da raiz das mudas inoculadas, foram aumentados na concentração de 8 mM. Verlag et al. (2001), observaram um maior crescimento do caule de *Helianthus annuus* quando inoculado com *Glomus intraradices*. Da mesma forma, Senen et al. (2015), encontraram que um consórcio de FMA com a presença de *G. albidum* aumentou o comprimento da raiz, melhorando a resposta de *Hordeum vulgare* frente a altas concentrações de Pb. Assim, é possível inferir que *G. albidum* e outros FMA presentes no inóculo utilizado neste estudo, podem ter favorecido os parâmetros de crescimento de *J. princeps* exposta a altas concentrações de CuSO_4 .

As plantas dos tratamentos sem e com inóculo não variaram no conteúdo de clorofilas e carotenoides, ou seja, não houve degradação ou efeitos na biossíntese de pigmentos pelo aumento de Cu^{2+} nas plantas. Da mesma forma, a relação de clorofila a/b também não foi alterada, o que indica uma estabilidade nos fotossistemas PSII e PSI (Váradi et al. 2003). Shi & Cai (2009) relataram que concentrações de 400 mg kg^{-1} de cobre reduziram o conteúdo de pigmentos fotossintéticos em *Arachis hypogaea*, enquanto que, concentrações similares em *J. princeps* (4 mM), não modificaram o teor de pigmentos, sugerindo que maiores concentrações de CuSO_4 devem ser testadas para avaliar a os efeitos da translocação de Cu^{2+} sob o conteúdo de clorofilas.

A queda na taxa fotossintética (A), na condutância estomática (Gs) e na transpiração (E) registradas nas plantas sem inóculo está relacionada às alterações anatômicas verificadas. As alterações no formato das paredes celulares do parênquima paliçádico e a redução nos espaços intercelulares do parênquima lacunoso, podem ter contribuído na diminuição de Gs, reduzindo E e A (Ali et al. 2013; Shi et al. 2014; Shi and Cai 2009a), em resposta à fotoinibição e ao fechamento estomático causado pelo excesso de Cu^{2+} (Dalcorso et al. 2014).

A limitação estomática é uma das primeiras respostas fisiológicas em relação ao aumento de concentrações tóxicas de metais nas folhas (Miladinova-Georgieva et al. 2018;

Rucińska-Sobkowiak 2016), assim como o aparecimento de protrusões pécticas na parede do parênquima lacunoso, que pode ser indicativo do aumento transitório de H_2O_2 no apoplasto, em resposta ao estresse abiótico (Wojtaszek 1997; Reig-Arminana et al. 2004; Günthardt-goerg 2007; Shapiguzov et al. 2012). Dessa maneira, podemos inferir que, a limitação estomática e as protrusões da parede no parênquima lacunoso, são alterações iniciais, associadas ao aumento na acumulação de Cu^{2+} em *J. princeps*, e que o inóculo de FMA de Mariana, diminuíram o efeito negativo causado por esse metal, melhorando a taxa fotossintética e as respostas das plantas frente ao estresse abiótico causado por cobre. Assim, pode se inferir que a partir de concentrações de 8 mM de $CuSO_4$, em *J. princeps* sem inóculo, aparecem os primeiros sintomas por toxidez de Cu^{2+} , associados inicialmente a mudanças na anatomia foliar e posteriormente a mudanças nas trocas gasosas. O engrossamento da parede do parênquima paliçádico, em resposta à entrada de metais, pode interferir nos processos de difusão de CO_2 e em consequência, alterar a fotossíntese (Shi e Cai, 2008a; 2008b; 2009), o que evidencia uma relação direta entre a anatomia do mesofilo de *J. princeps* e a redução nas trocas gasosas nas plantas sem inóculo. No entanto, a inoculação de FMA reduziu essas alterações em 8 mM, indicando que o consorcio de FMA, das áreas adjacentes ao rejeito de Fundão, podem reduzir potencialmente, os sintomas causados pelo incremento de cobre nas mudas de *J. princeps*.

O aumento nos teores de Cu^{2+} na parte aérea, (2 e 8 mM de $CuSO_4$), podem ter provocado um efeito inibitório na atividade das enzimas associadas ao Ciclo de Calvin nas mudas de *J. princeps*, visto que, teores elevados de Cu^{2+} e outros metais nas plantas, podem alterar a fixação de carbono pela inibição da RuBisCO, reduzindo a eficiência da carboxilação (A/Ci) (Yang et al. 2020; Andrade et al. 2019; Küpper e Andresen 2016; Leal-Alvarado et al. 2016). No entanto, A/Ci foi aumentada em plantas micorrizadas na maior concentração, evidenciando que, os fungos presentes no inóculo, podem ter melhorado o balanço na fixação de CO_2 no estroma dos cloroplastos de *J. princeps*.

Apesar de ter um aumento significativo de Cu^{2+} na parte aérea das plantas sem inóculo, o transporte de água através do xilema (WUE) não foi afetado. Esse resultado, tem sido relatado anteriormente, como uma estratégia por parte das plantas para melhorar seu regime hídrico, em resposta ao incremento de metais (Miladinova-Georgieva et al. 2018; Pereira et al. 2017; Wolff et al. 2012). Dessa maneira, se confirma que, a apesar da redução de Gs e E nas mudas de *J. princeps* sem inóculo, a WUE não foi afetada em nenhum dos tratamentos, evidenciando uma estratégia por parte de *J. princeps*, para melhorar seu regime hídrico, em relação com o aumento progressivo nas concentrações de $CuSO_4$.

A pesar de não ter encontrado efeitos negativos no transporte de água através do xilema, se observou que na parte aérea das plantas sem inóculo, o aumento de Cu^{2+} teve uma correlação negativa com o transporte de P, restringindo-o na raiz, e alterando sua distribuição. Pelo contrário, S registrou uma correlação positiva com o aumento de Cu^{2+} na parte aérea, mostrando que a homeostase de S pode estar relacionada com a síntese de grupos tíois em *J. princeps*, reduzindo o efeito negativo de cobre na fotossíntese. O coeficiente de Pearson também evidenciou uma redução de Ca associada negativamente ao aumento de Cu^{2+} na parte aérea das plantas sem inóculo, e da mesma forma, uma correlação positiva deste elemento com E, Gs e A, sugerindo que a queda de Ca, assim como das trocas gasosas a partir de 8 mM, são indicativos dos primeiros sintomas causados pelo incremento de Cu^{2+} em *J. princeps*.

O aumento de Cu^{2+} na parte aérea das plantas sem inóculo, teve uma relação inversamente proporcional com o teor de clorofilas, o que pode sugerir que, um incremento acima de 8 mM de CuSO_4 , pode alterar a síntese desses pigmentos e posteriormente, alterar a eficiência quântica do fotossistema II. Em contrapartida, o conteúdo de clorofilas nas plantas com inóculo, manteve uma correlação positiva frente ao aumento de E, Gs, A e A/Ci, que se ajusta a uma menor entrada de Cu^{2+} na parte aérea, como foi relatado neste estudo. O que permite concluir que, o inóculo de FMA usado, reduz o estresse causado nos parâmetros fotossintéticos de plantas de *J. princeps*, expostas a altas concentrações de CuSO_4 .

Conclusão

As plantas jovens de *J. princeps* sem inóculo, expostas a 8 mM, mostraram fatores de translocação superiores a 1, assim como uma correlação significativamente positiva entre o incremento de Cu^{2+} e S, sugerindo estratégias associadas ao sequestro de metais, através de tíois na parte aérea. Da mesma forma, apesar de ter apresentado alterações nos parâmetros de trocas gasosas, o conteúdo de clorofilas e a eficiência do uso de água não foram afetadas, evidenciando que a acumulação de Cu^{2+} na parte aérea, ainda não foi o suficientemente alta para alterar a fase fotoquímica da fotossíntese em *J. princeps*. Pelo contrário, o efeito negativo no ciclo de Calvin foi registrado, reduzindo a eficiência da carboxilação de CO_2 em 8 mM das plantas sem inóculo.

Na maior concentração de CuSO_4 das plantas inoculadas, foi observado um incremento significativo do teor de Ca na parte aérea, assim como um aumento gradativo de S a partir de 2 mM, o que pode sugerir um aumento de grupos tíois na raiz, propiciado pelo consorcio de FMA. Da mesma forma, a estabilização das trocas gasosas, indicam que o inóculo, pode favorecer o

crescimento das mudas de *J. princeps*, aumentando sua tolerância frente ao incremento de CuSO_4 em casa de vegetação, sugerindo que, a inoculação com FMA das áreas impactadas pelo rejeito de Fundão, podem ser potencialmente usados em planos de fitorremediação.

Referencias

Adeyemi, N. O., Atayese, M. O., Sakariyawo, O. S., Azeez, J. O., Abayomi Sobowale, S. P., Olubode, A., et al. (2021). Alleviation of heavy metal stress by arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Glycine max* (L.) grown in copper, lead and zinc contaminated soils. *Rhizosphere*, 18(June 2020). <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100325>.

Aggarwal, A., Kadian, N., Tanwar, A., Yadav, A., & Gupta, K. K. (2011). Role of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in global sustainable development. *Journal of Applied and Natural Science*, 3(2), 340–351. <https://doi.org/10.31018/jans.v3i2.211>.

Al-garni, S. M. S. (2006). Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer *Rhizobium* bacterium, 5(January), 133–142.

Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D., & Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166(5), 1213–1218. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.032>.

Ali, B., Wang, B., Ali, S., Ghani, M. A., Hayat, M. T., Yang, C., et al. (2013). 5-Aminolevulinic Acid Ameliorates the Growth, Photosynthetic Gas Exchange Capacity, and Ultrastructural Changes Under Cadmium Stress in *Brassica napus* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), 604–614. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9328-6>.

Alloway, B. J. (2013). *Heavy metals in soils. Heavy metals in soils*. [https://doi.org/10.1016/s0165-9936\(96\)90032-1](https://doi.org/10.1016/s0165-9936(96)90032-1).

Amin, H., Arain, B. A., Jahangir, T. M., Rasool, A., Mangi, J., Abbasi, M. S., & Amin, F. (2019). Copper (Cu) tolerance and accumulation potential in four native plant species : a comparative study for effective phytoextraction technique. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 00(00), 1–12. <https://doi.org/10.1080/24749508.2019.1700671>.

Andrade, G. C., Castro, L. N., & Silva, L. C. da. (2020). Micromorphological alterations induced by simulated acid rain on the leaf surface of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). *Ecological Indicators*, 116(May), 106526. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106526>.

Andrade, S. A. L., Silveira, A. P. D., & Mazzafera, P. (2010). Science of the Total Environment Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. *Science of the Total Environment*, The, 408(22), 5381–5391. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.064>.

- Arru, L., Rognoni, S., Baroncini, M., Bonatti, P. M., & Perata, P. (2004). Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution. *Euphytica*, *140*(1–2), 33–38. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4752-0>.
- Bekker, A., Slack, J. F., Planavsky, N., Krapež, B., Hofmann, A., Konhauser, K. O., & Rouxel, O. J. (2010). Iron formation: The sedimentary product of a complex interplay among mantle, tectonic, oceanic, and biospheric processes. *Economic Geology*, *105*(3), 467–508. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.105.3.467>.
- Bhalla, S., & Garg, N. (2021). Arbuscular mycorrhizae and silicon alleviate arsenic toxicity by enhancing soil nutrient availability, starch degradation and productivity in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Mycorrhiza*, *31*(6), 735–754. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01056-z>.
- Bhuja, P., McLachlan, K., Stephens, J., & Taylor, G. (2004). Accumulation of 1,3- β -D-glucans, in response to aluminum and cytosolic calcium in *Triticum aestivum*. *Plant and Cell Physiology*, *45*(5), 543–549. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch068>.
- Białońska, D., Zobel, A. M., Kuraś, M., Tykarska, T., & Sawicka-Kapusta, K. (2007). Phenolic compounds and cell structure in bilberry leaves affected by emissions from a Zn-Pb smelter. *Water, Air, and Soil Pollution*, *181*(1–4), 123–133. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9284-x>.
- Brander, U. (1987). Ultrastructure of the Callose and Cellulose Types of Crystal Envelopes in the Calcium Oxalate Idioblasts of, *26*.
- Cardoso, E. B., Júnior, P. P., de Cássia Soares da Silva, M., Cerqueira, A. E. S., Jordão, T. C., Moreira, B. C., et al. (2021). Composition and diversity of prokaryotes at an iron ore post-mining site revealed the natural resilience 10 years after mining exploitation. *Land Degradation and Development*, *32*(1), 256–269. <https://doi.org/10.1002/ldr.3713>.
- Clark, R. B., & Zeto, S. K. (2008). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants *Mineral Acquisition by Arbuscular Mycorrhizal Plants*, 4167. <https://doi.org/10.1080/01904160009382068>.
- Coelho, D. G., Marinato, C. S., de Matos, L. P., de Andrade, H. M., da Silva, V. M., Neves, P. H. S., & de Oliveira, J. A. (2020). Evaluation of Metals in Soil and Tissues of Economic-Interest Plants Grown in Sites Affected by the Fundão Dam Failure in Mariana, Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *16*(5), 596–607. <https://doi.org/10.1002/ieam.4253>.
- Currier, H., & Webster, D. (1985). Callose Formation and Subsequent Disappearance : Studies in Ultrasound Stimulation Author (s): H . B . Currier and D . H . Webster Published by : Oxford University Press Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/4260312> REFERENCES Linked references are, *39*(5), 843–847.
- Da Silva, L. C., Azevedo, A. A., Monteiro Da Silva, E. A., & Oliva, M. A. (2005). Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Australian Journal of Botany*, *53*(8), 789–796. <https://doi.org/10.1071/BT04096>.

- Dalcorso, G., Manara, A., Piasentin, S., & Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics*, *6*(10), 1770–1788. <https://doi.org/10.1039/c4mt00173g>.
- Dary, M., Chamber-pérez, M. A., Palomares, A. J., & Pajuelo, E. (2010). “ In situ ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria, *177*, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.035>.
- Demarty, M., Morvan, C., Thellier, M., Echanges, L., Cnrs, L. A., Rouen, S. De, & Aignan, M. Saint. (1984). Calcium and the cell \ A / all, 441–448.
- Devi, P. U., Murugan, S., Akilapriyadharasini, S., Suja, S., & Chinnaswamy, P. (2007). Effect of mercury and effluents on seed germination, root-shoot length, amylase activity and phenolic compounds in *Vigna unguiculata*. *Nature Environment and Pollution Technology*, *6*(3), 457–462.
- Elhindi, K. M., Al-mana, F. A., El-hendawy, S., Al-selwey, W. A., & Elgorban, A. M. (2018). Soil Science and Plant Nutrition Arbuscular mycorrhizal fungi mitigates heavy metal toxicity adverse effects in sewage water contaminated soil on *Tagetes erecta* L Arbuscular mycorrhizal fungi mitigates heavy metal toxicity adverse effects in. *Soil Science and Plant Nutrition*, *64*(5), 662–668. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1490631>.
- Ezawa, T., & Saito, K. (2018). Tansley insight How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. <https://doi.org/10.1111/nph.15187>.
- Feil, S. B., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Tiziani, R., Mimmo, T., & Cesco, S. (2020). Plant Physiology and Biochemistry Copper toxicity affects phosphorus uptake mechanisms at molecular and physiological levels in *Cucumis sativus* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *157*(October), 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.023>.
- Fernandes, F., & Moura, B. (2021). Foliage visible injury in the tropical tree species , *Astronium graveolens* is strictly related to phytotoxic ozone dose (PODy), 41726–41735.
- Festa, R. A., & Thiele, D. J. (2011). Copper: An essential metal in biology. *Current Biology*, *21*(21), R877–R883. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>.
- Galli, U., Schuepp, H., & Brunold, C. (1994). Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, *92*(2), 364–368. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1994.920224.x>.
- Gonzalez-Chavez, C., D’Haen, J., Vangronsveld, J., & Dodd, J. C. (2002). Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil*, *240*(2), 287–297. <https://doi.org/10.1023/A:1015794622592>.
- González-Chavez, M. C., R, C.-G., Wright, S. F., & Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin , a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi , in sequestering potentially toxic elements, *130*, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>.

González-guerrero, M., Benabdellah, K., Ferrol, N., & Azcón-aguilar, C. (2009). Mechanisms Underlying Heavy Metal Tolerance in Arbuscular Mycorrhizas (pp. 107–122).

González-Guerrero, M., Melville, L. H., Ferrol, N., Lott, J. N. A., Azcón-Aguilar, C., & Peterson, R. L. (2008). Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology*, *54*(2), 103–110. <https://doi.org/10.1139/W07-119>.

Górecka, K., Cvikrová, M., Kowalska, U., Eder, J., Szafrńska, K., Górecki, R., & Janas, K. M. (2007). The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.12.007>.

Guarino, C., Conte, B., Spada, V., Arena, S., Sciarrillo, R., & Scaloni, A. (2014). Proteomic analysis of eucalyptus leaves unveils putative mechanisms involved in the plant response to a real condition of soil contamination by multiple heavy metals in the presence or absence of mycorrhizal/rhizobacterial additives. *Environmental Science and Technology*, *48*(19), 11487–11496. <https://doi.org/10.1021/es502070m>.

Guerra, M. B. B., Teaney, B. T., Mount, B. J., Asunskis, D. J., Jordan, B. T., Barker, R. J., et al. (2017). Post-catastrophe Analysis of the Fundão Tailings Dam Failure in the Doce River System, Southeast Brazil: Potentially Toxic Elements in Affected Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, *228*(7). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3430-5>.

Günthardt-goerg, M. S., Mcquattie, C. J., Scheidegger, C., Rhiner, C., & Matyssek, R. (1997). Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls, (June 2014). <https://doi.org/10.1139/cjfr-27-4-453>.

Günthardt-goerg, M. S., & Vollenweider, P. (2007). Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives, *147*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.033>.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, *219*, 1–14.

Hermle, S., Vollenweider, P., Günthardt-Goerg, M. S., Mcquattie, C. J., & Matyssek, R. (2007). Leaf responsiveness of *Populus tremula* and *Salix viminalis* to soil contaminated with heavy metals and acidic rainwater. *Tree Physiology*, *27*(11), 1517–1531. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.11.1517>.

Janas, K. M., Zielińska-Tomaszewska, J., Rybaczek, D., Maszewski, J., Posmyk, M. M., Amarowicz, R., & Kosińska, A. (2010). The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *167*(4), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.09.016>.

Prado, I. G. de O., da Silva, M. de C. S., Diogo, N. V., Prates Júnior, P., Veloso, T. G. R., et al. (2021). Shifts in Arbuscular Mycorrhizal fungal properties due to vegetative remediation of mine spoil contamination from a dam rupture in Mariana, Brazil. *Applied Soil Ecology*, *162*(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103885>.

- Kan, X., Dong, Y., Feng, L., Zhou, M., & Hou, H. (2021). Contamination and health risk assessment of heavy metals in China's lead–zinc mine tailings: A meta–analysis. *Chemosphere*, 267, 128909. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128909>.
- Katayama, H., Fujibayashi, Y., Nagaoka, S., & Sugimura, Y. (2007). Cell wall sheath surrounding calcium oxalate crystals in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 231(3–4), 245–248. <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0263-x>.
- Krzyszowska, M. (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 35–51. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0581-z>.
- Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8(3), 269–285. <https://doi.org/10.1039/c5mt00244c>.
- Kuriakose, S. V., & Prasad, M. N. V. (2008). Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regulation*, 54(2), 143–156. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9237-4>.
- Lana-Costa, J., da Silva, M. M., Martins, A. O., Guarnier, J. C., Silva Junior, R. de O., Silva, D. M., et al. (2021). Biochemical and physiological aspects of restinga herbaceous plants tolerance to iron ore tailing plume along the coastal region of Espírito Santo-Brazil. *Environmental and Experimental Botany*, 191(July). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104618>.
- Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *PNAS*, 106(20), 8344–8349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>.
- Maruthi Sridhar, B. B., Han, F. X., Diehl, S. V., Monts, D. L., & Su, Y. (2011). Effect of phytoaccumulation of arsenic and chromium on structural and ultrastructural changes of brake fern (*Pteris vittata*). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(4), 285–293. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202011000400006>.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523–530.
- Miladinova-Georgieva, K., Ivanova, K., Georgieva, T., Geneva, M., Petrov, P., Stancheva, I., & Markovska, Y. (2018). EDTA and citrate impact on heavy metals phytoremediation using paulownia hybrids. *International Journal of Environment and Pollution*, 63(1–2), 31–46.
- Moura, B., Segala, E., Alexandre, M., Ribeiro, S., Souza, D., Schaub, M., & Vollenweider, P. (2018). Science of the Total Environment Ozone affects leaf physiology and causes injury to foliage of native tree species from the tropical Atlantic Forest of southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 610–611, 912–925. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.130>.
- O'Lexy, R., Kasai, K., Clark, N., Fujiwara, T., Sozzani, R., & Gallagher, K. L. (2018). Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmatal permeability via deposition and

breakdown of callose. *Journal of Experimental Botany*, 69(15), 3715–3728. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery171>.

Pedersen, M. B., Kjær, C., & Elmegaard, N. (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper to black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in relation to bioavailability and the age of soil contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 431–439. <https://doi.org/10.1007/s002440010124>.

Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G., & Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(8–9), 1665–1677. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.005>.

Pereira, A. S., Cortez, P. A., de Almeida, A. A. F., Prasad, M. N. V., França, M. G. C., da Cunha, M., et al. (2017). Morphology, ultrastructure, and element uptake in *Calophyllum brasiliense* Cambess. (*Calophyllaceae* J. Agardh) seedlings under cadmium exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(18), 15576–15588. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9187-y>.

Pérez-De-Luque, A., Tille, S., Johnson, I., Pascual-Pardo, D., Ton, J., & Cameron, D. D. (2017). The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogen. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16697-4>.

Pita-Barbosa, A., Williams, T. C. R., & Loureiro, M. E. (2019). Effects of short-term arsenic exposure in *Arabidopsis thaliana*: Tolerance versus toxicity responses. *Biologia Plantarum*, 63(1), 43–53. <https://doi.org/10.32615/bp.2019.006>.

Puthur, E. J. J. T. (2020). Direct and indirect influence of arbuscular mycorrhizae on enhancing metal tolerance of plants. *Archives of Microbiology*, 202(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01730-z>.

Quaresma, V. S., Aguiar, V. M. C., Bastos, A. C., Oliveira, K. S., Vieira, F. V., Sá, F., & Baptista Neto, J. A. (2021). The impact of trace metals in marine sediments after a tailing dam failure: the Fundão dam case (Brazil). *Environmental Earth Sciences*, 80(17). <https://doi.org/10.1007/s12665-021-09817-x>.

Queiroz, H. M., Ying, S. C., Abernathy, M., Barcellos, D., Gabriel, F. A., Otero, X. L., et al. (2021). Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. *Environment International*, 146(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106284>.

Quin, B. F., & Woods, P. H. (1976). Rapid manual determination of sulfur and phosphorus in plant material. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 7(4), 415–426. <https://doi.org/10.1080/00103627609366652>.

Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>.

- Reig-Arminana, V., Cervero, J., Garcá, F. J., Ibars, A., & Sanz, M. J. (2004). Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L .), *132*, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.006>.
- Rengel, Z., & Zhang, W. H. (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, *159*(2), 295–314. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00821.x>.
- Riaz, M., Kamran, M., Fang, Y., Wang, Q., Cao, H., Yang, G., et al. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, *402*(March 2020), 123919. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123919>.
- Rucińska-Sobkowiak, R. (2016). Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(11). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2277-5>.
- Sahi, S. V., Israr, M., Srivastava, A. K., Gardea-Torresdey, J. L., & Parsons, J. G. (2007). Accumulation, speciation and cellular localization of copper in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, *67*(11), 2257–2266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.006>.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, *177*(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8).
- Samardakiewicz, S., Strawiński, P., & Woźny, A. (1996). The influence of lead on callose formation in roots of *Lemna minor* L. *Biologia Plantarum*, *38*(3), 463–467. <https://doi.org/10.1007/BF02896682>.
- Sanmartín, N., Pastor, V., Pastor-Fernández, J., Flors, V., Pozo, M. J., & Sánchez-Bel, P. (2021). Role and mechanisms of callose priming in mycorrhiza-induced resistance. *Journal of Experimental Botany*, *71*(9), 2769–2781. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA030>.
- Sant´Anna-santos, B. F. S., Azevedo, A. A., Silva, L. C., & Oliva, M. A. (2012). Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst . F . (*Anacardiaceae*), *84*, 689–702.
- Santana, N. A., Rabuscke, C. M., Soares, V. B., Soriani, H. H., Nicoloso, F. T., Josemar, R., & Jacques, S. (2018). Vermicompost dose and mycorrhization determine the efficiency of copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis*, 12663–12677.
- Schutzendubel, A., Polle, A., Institut, F., Abteilung, I., Baumphysiologie, F., & Universita, G. A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *53*(372), 1351–1365.
- Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., et al. (2016). Potential risks of the residue from Samarco’s mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, *218*, 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>.
- Senen, M., Arias, B., Peña-cabriales, J. J., Alarcón, A., Senen, M., Arias, B., & E, J. J. O. S. (2015). Plants Inoculated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungi Consortium Enhanced Pb

Absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. 6514. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.898023>.

Shapiguzov, A., Julia, P., Wrzaczek, M., & Kangasjärvi, J. (2012). ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through Abiotic stress, 3(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00292>.

Shi, & Cai, Q. (2009a). Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to zinc stress. *Biologia Plantarum*, 53(2), 391–394. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0074-3>.

Shi, G., & Cai, Q. (2009b). Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.02.009>.

Shi, Sun, L., Wang, X., & Liu, C. (2014). Leaf responses to iron nutrition and low cadmium in peanut: Anatomical properties in relation to gas exchange. *Plant and Soil*, 375(1–2), 99–111. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1953-0>.

Silva, L., Freitas-silva, L. De, Rocha, I., & Castro, D. (2020). Leaf Morpho-anatomical Structure Determines Differential Response Among Restinga Species Exposed to Emissions from an Iron Ore Pelletizing Plant.

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB2016), 1–36. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>.

Souza, L. A. De, Adrián, S., Andrade, L. De, Souza, C. R. De, & Schiavinato, M. A. (2011). Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* EM, (3), 1441–1451.

Stroud, R. M. (2015). Fungal association and utilization of phosphate by plants: success, limitations, and future prospects, 6(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00984>
Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., & Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(4), 985–999. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1169-6>.

Thor, K. (2019). Calcium — Nutrient and Messenger, 10(April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440>.

Toler, H. D., Morton, J. B., & Cumming, J. R. (2005). Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. *Water, Air, and Soil Pollution*, 164(1–4), 155–172. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-2718-z>.

Tong, Y. P., Kneer, R., & Zhu, Y. G. (2004). Vacuolar compartmentalization: A second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 9(1), 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.11.009>.

Váradi, G., Polyánka, H., Darkó, É., & Lehoczki, E. (2003). Atrazine resistance entails a limited xanthophyll cycle activity, a lower PSII efficiency and an altered pattern of excess excitation

dissipation. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 47–56. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00089.x>.

Verlag, F., Davies, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N., & Grossi, J. A. S. (2001). Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*), 786.

Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).

Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection, 692, 681–692.

Wolff, G., Pereira, G., Castro, E., Louzada, J., & Coelho, F. (2012). The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 71–77. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000100009>.

Xie, L., & van Zyl, D. (2020). Distinguishing reclamation, revegetation and phytoremediation, and the importance of geochemical processes in the reclamation of sulfidic mine tailings: A review. *Chemosphere*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126446>.

Xu, Q., Qiu, H., Chu, W., Fu, Y., Cai, S., Min, H., & Sha, S. (2013). Copper ultrastructural localization, subcellular distribution, and phytotoxicity in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(12), 8672–8679. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1828-1>.

Yang, S., Liang, S., Yi, L., Xu, B., Cao, J., Guo, Y., & Zhou, Y. (2014). Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing on manganese mine tailings, 8(3), 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11783-013-0602>.

Zhan, F., He, Y., Zu, Y., Zhang, N., Yue, X., Xia, Y., & Luo, Y. (2013). Heavy metal and sulfur concentrations and mycorrhizal colonizing status of plants from abandoned lead / zinc mine land in Gejiu , Southwest China, 7(30), 10. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1780>.

Zhan, F., Li, B., Jiang, M., Yue, X., He, Y., Xia, Y., & Wang, Y. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance antioxidant defense in the leaves and the retention of heavy metals in the roots of maize. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 24338–24347. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2487-z>.

Zhang, X. H., Lin, A. J., Gao, Y. L., Reid, R. J., Wong, M. H., & Zhu, Y. G. (2009). Arbuscular mycorrhizal colonisation increases copper binding capacity of root cell walls of *Oryza sativa* L. and reduces copper uptake. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(5), 930–935. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.08.011>.

Figuras e tabelas

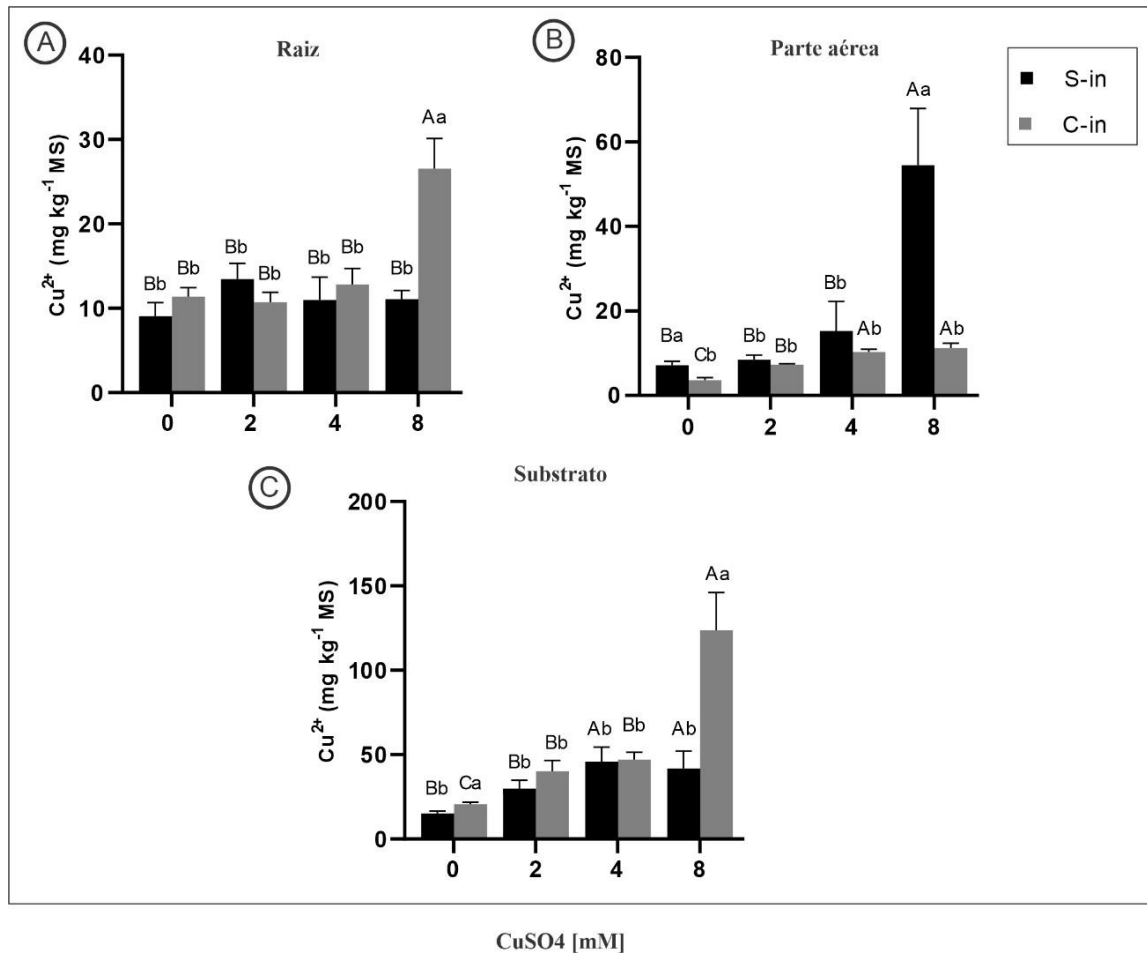


Fig. 1. Acumulação de Cu^{2+} em raiz (A), parte aérea (B) e substrato (C), sob diferentes concentrações de CuSO_4 sem inóculo (S-in = barras negras) e com inóculo (C-in = barras cinza). Médias \pm SE seguidas de letras maiúsculas diferentes entre concentrações de CuSO_4 , e minúsculas entre tratamentos sem e com inóculo (negro e cinza), diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

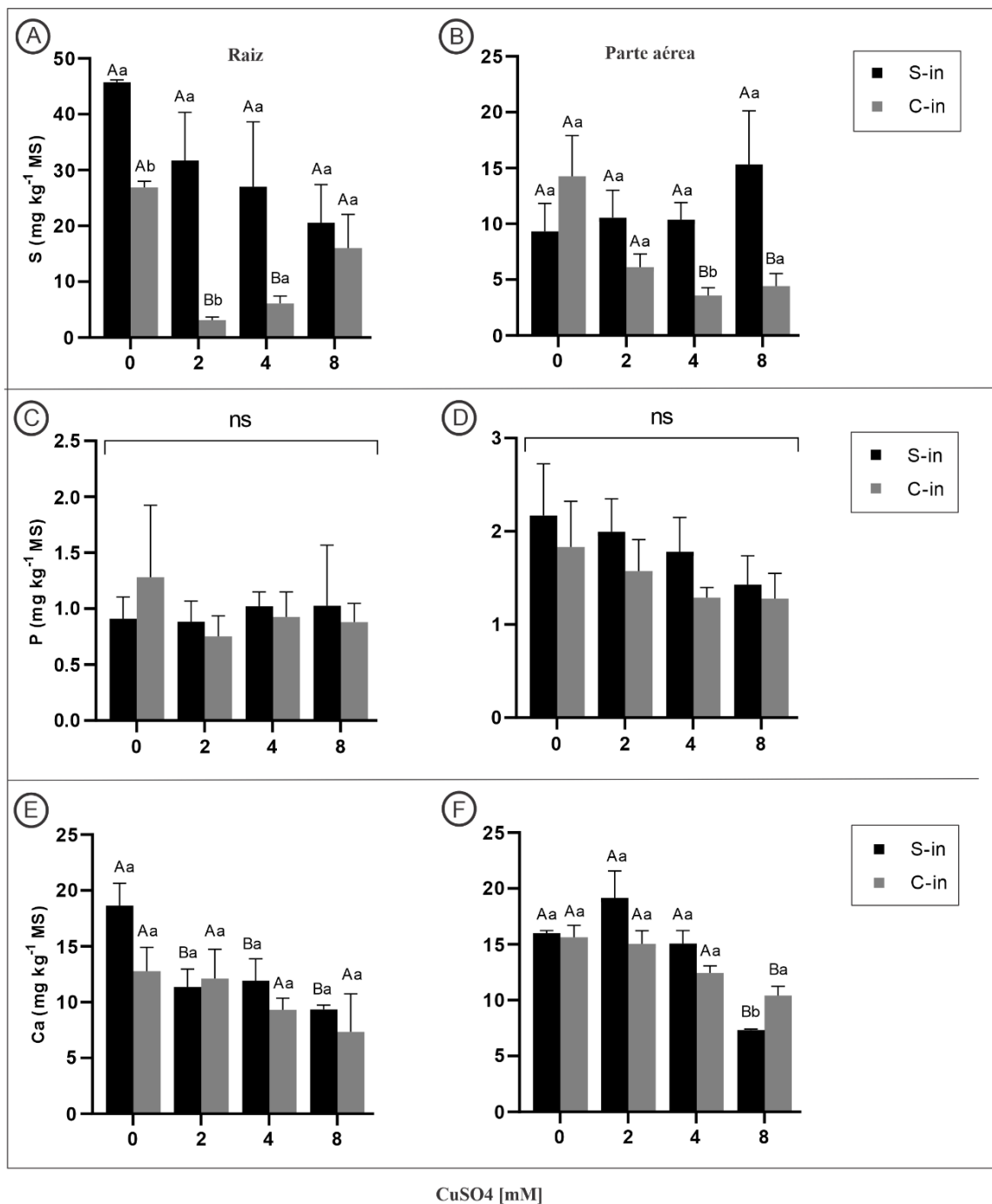


Fig. 2. Conteúdo de S, P e Ca em raízes (A, C, E) e parte aérea (B, D, F) de plantas de *J. princeps* sob diferentes concentrações de CuSO_4 sem inóculo (S-in = barras negras) e com inóculo (C-in = barras cinza). Médias \pm SE seguidas de letras maiúsculas diferentes entre concentrações de CuSO_4 , e minúsculas entre tratamentos sem e com inóculo (negro e cinza), diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Valores médios (\pm SE) do conteúdo de S, P e Ca no substrato de tratamentos sem inóculo (S-in) e com inóculo (C-in) sob diferentes concentrações de CuSO_4 . *Aumentos significativos.

Tabela 2. Valores médios (\pm SE) do Fator de translocação (FT) e Fatores de bioconcentração (FBC) da raiz de da parte aérea de tratamentos sem inóculo (S-in) e com inóculo (C-in) sob diferentes concentrações de CuSO₄. *Aumentos significativos.

| CuSO ₄ (mM) | Fator de translocação e bioconcentração | | | | | | | | |
|------------------------|---|------|----------|----------|------|----------|-----------------|------|----------|
| | FT | | | FBC Raiz | | | FBC parte aérea | | |
| | S-in | C-in | \pm SE | S-in | C-in | \pm SE | S-in | C-in | \pm SE |
| 0 | 0,81* | 0,33 | 0,10 | 0,63 | 0,56 | 0,18 | 0,48* | 0,18 | 0,08 |
| 2 | 0,67 | 0,69 | 0,18 | 0,49 | 0,29 | 0,15 | 0,29 | 0,19 | 0,04 |
| 4 | 1,57 | 0,85 | 0,74 | 0,26 | 0,28 | 0,08 | 0,44 | 0,22 | 0,29 |
| 8 | 3,21 | 0,92 | 1,85 | 0,31 | 0,22 | 0,11 | 1,17* | 0,12 | 0,13 |

Tabela 3. Valores médios (\pm SE) do comprimento e matéria seca da raiz e da parte aérea de tratamentos sem inóculo (S-in) e com inóculo (C-in) sob diferentes concentrações de CuSO_4 .
*Aumentos significativos.

Tabela 4. Valores médios (\pm SE) do Fteor de clorofilas de tratamentos sem inóculo (S-in) e com inóculo (C-in) sob diferentes concentrações de CuSO₄. *Aumentos significativos.

| CuSO ₄ (mM) | Teor de pigmentos fotossintéticos | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----------------------------------|------|----------|-------|------|----------|-----------|-------|----------|---------|------|----------|--------------|-------|----------|
| | Chl a | | | Chl b | | | Chl total | | | Chl a/b | | | Carotenoides | | |
| | S-in | C-in | \pm SE | S-in | C-in | \pm SE | S-in | C-in | \pm SE | S-in | C-in | \pm SE | S-in | C-in | \pm SE |
| 0 | 8,08 | 9,78 | 2,03 | 2,77 | 3,45 | 0,72 | 10,85 | 13,23 | 2,67 | 2,92 | 2,88 | 0,34 | 17,21 | 16,69 | 3,92 |
| 2 | 6,06 | 8,15 | 1,14 | 2,42 | 2,98 | 0,53 | 8,48 | 11,13 | 1,65 | 2,55 | 2,77 | 0,17 | 13,49 | 13,78 | 2,64 |
| 4 | 7,55 | 7,09 | 1,51 | 2,90 | 2,35 | 0,33 | 10,45 | 9,44 | 1,82 | 2,52 | 2,98 | 0,30 | 13,57 | 10,05 | 3,25 |
| 8 | 6,57 | 8,49 | 1,72 | 2,29 | 2,70 | 0,52 | 8,87 | 11,19 | 2,22 | 2,95 | 3,08 | 0,25 | 15,65 | 16,54 | 3,82 |

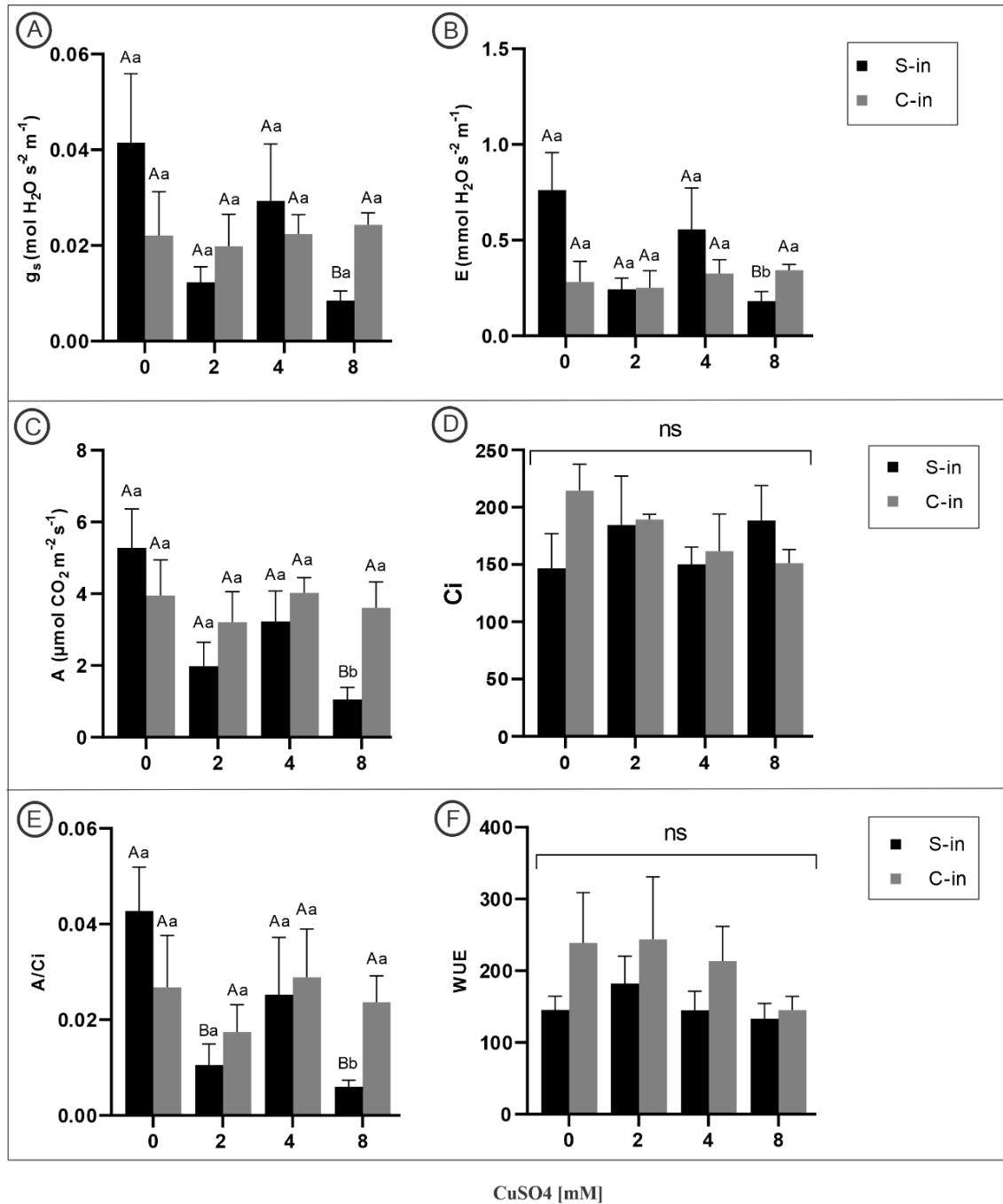


Fig. 3. Condutância estomática (A), Transpiração (B), Taxa fotossintética (C), Concentração interna de CO_2 , (D), Eficiência instantânea de carboxilação (E) e Eficiência do uso de água (F) em folíolos de plantas de *Joannesia princeps* sob diferentes concentrações de CuSO_4 sem inóculo (S-in = barras negras) e com inóculo (C-in = barras cinza). Médias \pm SE seguidas de letras maiúsculas diferentes entre concentrações de CuSO_4 , e minúsculas entre tratamentos sem e com inóculo (negro e cinza), diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

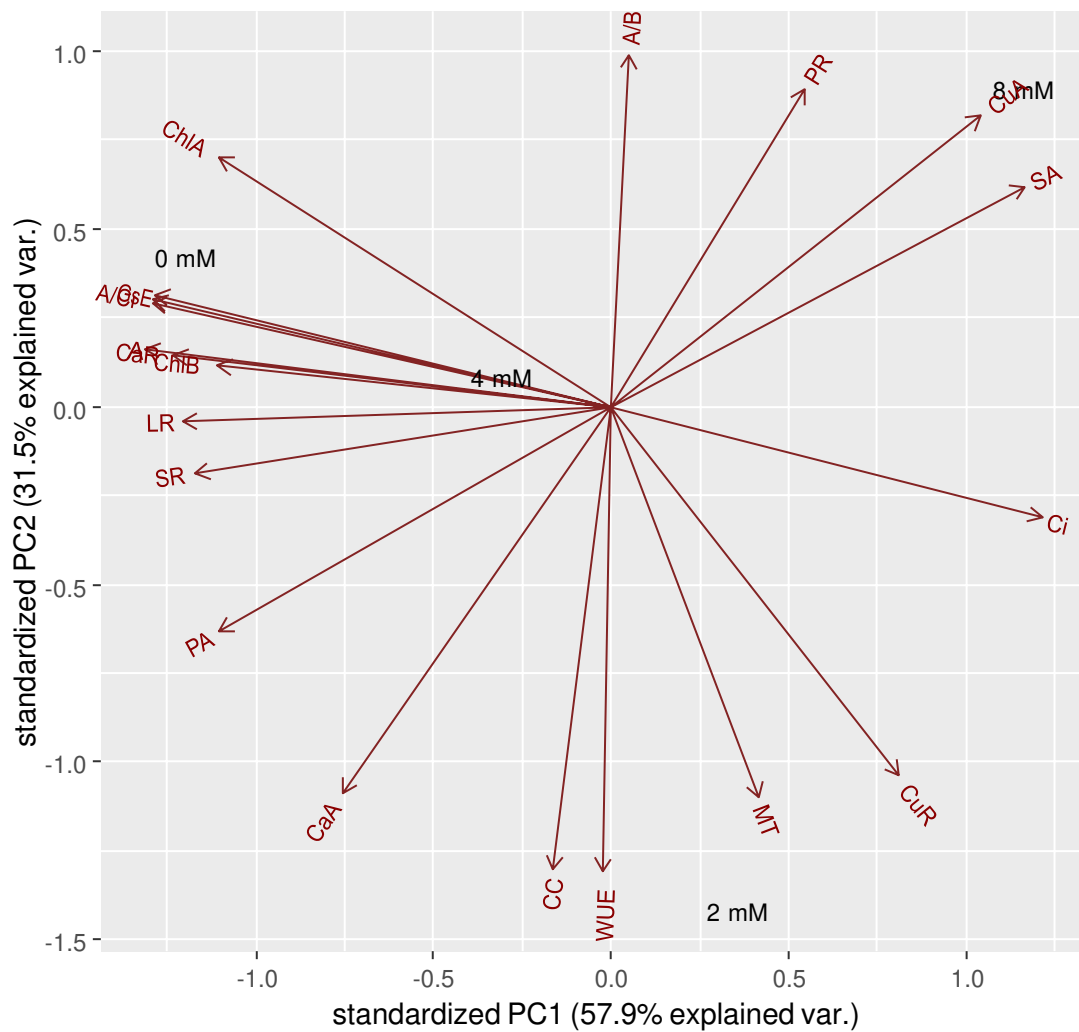


Fig. 4. Análise de componentes principais (PCA) dos atributos do crescimento de *J. princeps* sem inóculo de FMA, sob diferentes concentrações de CuSO_4 . CuA: Cu^{2+} na parte aérea; CuR: Cu^{2+} na raiz; PA: P na parte aérea; PR: P na raiz; AS: S na parte aérea; SR: S na raiz; CaA: Ca na parte aérea; CaR: Ca na raiz. ChIA: Clorofila a; ChIB: Clorofila b; A/B: Razão de clorofila a e b; MT: Massa seca total; CC: Comprimento do caule; LR: Comprimento da raiz; A: Taxa fotossintética; Gs: Condutância estomática; E: Transpiração, Ci: concentração interna de CO_2 ; A/Ci: Eficiência de carboxilação; WUE: Eficiência do uso de água.

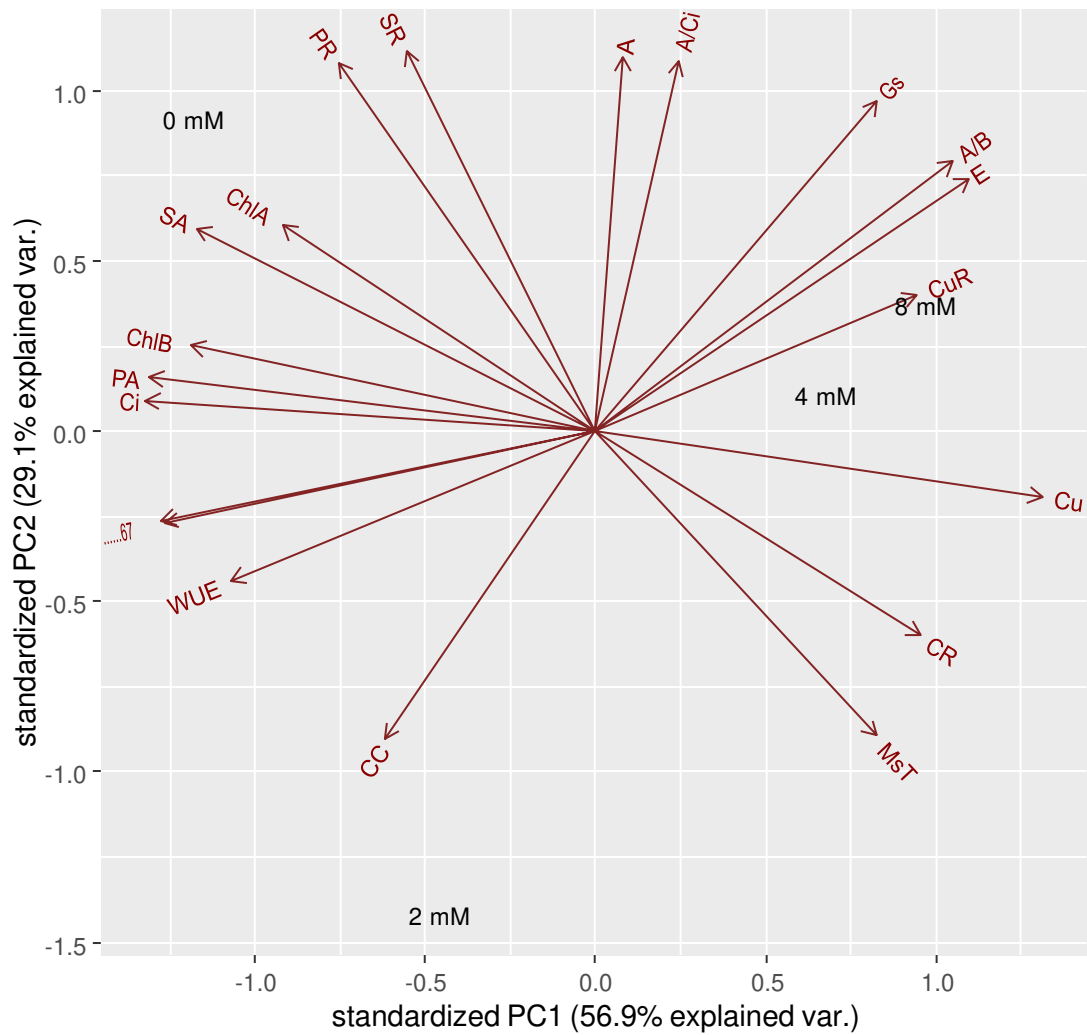


Fig. 5. Análise de componentes principais (PCA) dos atributos do crescimento de *J. princeps* com com inóculo de FMA sob diferentes concentrações de CuSO_4 . CuA: Cu^{2+} na parte aérea; CuR: Cu^{2+} na raiz; PA: P na parte aérea; PR: P na raiz; AS: S na parte aérea; SR: S na raiz; CaA: Ca na parte aérea; CaR: Ca na raiz. ChlA: Clorofila a; ChlB: Clorofila b; A/B: Razão de clorofila a e b; MT: Massa seca total; CC: Comprimento do caule; LR: Comprimento da raiz; A: Taxa fotossintética; Gs: Condutância estomática; E: Transpiração, Ci: concentração interna de CO_2 ; A/Ci: Eficiência de carboxilação; WUE: Eficiência do uso de água.

CAPITULO II

Influência de fungos micorrízicos arbusculares nas respostas morfoanatômicas e histoquímicas das folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) sob toxicidade de cobre

Esneider Rojas Vargas, Luzimar Campos da Silva*

Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

**Autor para correspondência: luzimar@ufv.br*

Resumo

O rompimento da barragem de Fundão em Mariana (MG) no ano de 2015, foi um dos maiores desastres ambientais do mundo. O aumento na concentração de metais potencialmente tóxicos como o cobre (Cu^{2+}), promovem danos na morfofisiologia de plantas em resposta ao estresse, porém, alterações da anatomia foliar de plantas nativas, ocorrendo nos solos degradados pelos rejeitos de Fundão, têm sido pouco estudadas. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações anatômicas nas folhas de *J. princeps*, buscando entender se a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) reduzem o estresse causado por Cu^{2+} . Plantas sem e com inóculo de FMA, foram colocadas em vasos com substrato contaminado com 0, 2, 4 e 8 mM de CuSO_4 durante 35 dias. A exposição a essas concentrações evidenciou engrossamento da parede e desarranjo celular do parênquima paliçádico e lacunoso das plantas sem inóculo expostas a 8 mM, assim como, aumento na densidade de fenóis e grãos de amido nos cloroplastos, deposição de protrusões pécticas e calose ao redor dos cristais de oxalato de cálcio na mesma concentração. Nas plantas inoculadas, não foram observadas alterações na anatomia foliar, no entanto, a distribuição na deposição de calose foi modificada, encontrando-se depositada nas paredes do parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e algumas células do parênquima fundamental da nervura principal. Concluímos que a inoculação de FMA nas plantas de *J. princeps* reduziram o estresse causado nas folhas pelo aumento das concentrações de CuSO_4 e, provavelmente, promoveram mecanismos de tolerância através da deposição de calose nos tecidos foliares.

Palavras-chave: Rejeito de Fundão, anatomia foliar, metais potencialmente tóxicos, FMA, parênquima lacunoso, tolerância.

Introdução

A poluição por metais potencialmente tóxicos é o principal problema de contaminação decorrente da mineração, devido à sua persistência em ecossistemas terrestres e aquáticos, sua alta biodisponibilidade e fácil entrada na cadeia alimentar (Kan et al., 2021; Peralta-Videa et al., 2009). O Brasil é um dos maiores produtores de minério de ferro do mundo, com aproximadamente 13% das reservas mundiais nas regiões de Urucum, Serra de Carajás e o Quadrilátero ferrífero, localizado no estado de Minas Gerais (BDMG, 2002; Bekker et al., 2010). Em 2015, o rompimento da barragem de Fundão em Mariana, MG, liberou 60 milhões de toneladas de rejeitos (Guerra et al. 2017; Segura et al. 2016; Xie e van Zyl 2020), resultando no aumento do pH do solo e das concentrações de Fe, Mn, Cr, Pb e Cu, atingindo a plataforma continental de Espírito Santo no Oceano Atlântico (Quaresma et al. 2021; Queiroz et al. 2021).

Algumas gramíneas de regiões próximas à catástrofe de Mariana toleraram altas concentrações de metais, apesar de terem mostrado alterações na deposição de metabólitos e na arquitetura da anatomia foliar (Silva, 2020). Por outro lado, plantas adjacentes à foz do Rio

Doce apresentaram estratégias de aclimação frente à presença de Cu^{2+} , aumentando a resistência estomática e a síntese de compostos antioxidantes (Lana-Costa et al. 2021). Foi encontrado também, um aumento da concentração Cu^{2+} na parte aérea de *Brachiaria decumbens*, *Stylosanthes guianensis* e *Saccharum officinarum* (66,25, 169,30 e 96,75 mg kg^{-1} respectivamente) em Paracatu de Baixo (MG) e um aumento da mobilidade desse elemento na foz de Rio Doce (Coelho et al. 2020; Aguiar et al., 2020), mostrando que, devido aos processos de oxido-redução, assim como a origem litológica da região, o Cu^{2+} está se tornando um dos elementos potencialmente tóxicos que devem ser monitorados nas regiões afetadas pelos rejeitos de Fundão, visto que o aumento na translocação para a parte aérea das plantas, apresenta um risco na biomagnificação e posterior entrada para a cadeia alimentar.

O fluxo de íons através do tecido radicular, depende da estrutura química, assim como da carga do metal (Rascio and Navari-Izzo 2011; Singh et al. 2016). Em baixas concentrações, o Cu^{2+} é um elemento essencial para as plantas, atuando como cofator de enzimas envolvidas na respiração celular ou homeostase de Fe (Festa e Thiele 2011; Sahi et al. 2007). Porém, concentrações acima de 15 mg kg^{-1} de Cu^{2+} são consideradas tóxicas para as plantas (Alloway 2013), acumulando-se principalmente no parênquima paliçádico e lacunoso das folhas quando é translocado para a parte aérea (Arru et al. 2004; Sahi et al. 2007; Xu et al. 2013).

Nas áreas impactadas de Mariana, tem sido relatado um aumento progressivo na diversidade de bactérias e FMA (Prado et al. 2021) que podem favorecer os processos de

sucessão ecológica. Tem sido relatado que a presença de FMA pode potencializar o estabelecimento de comunidades vegetais, assim como melhorar as condições físico-químicas do solo, reduzindo a biodisponibilidade de metais tóxicos (Puthur 2020; Santana et al. 2018; Souza et al. 2011; Yang et al. 2014). Assim, reforça-se a importância da implementação de processos de revegetação com FMA, para acelerar os processos de recuperação inicial nas áreas impactadas pelos rejeitos de Fundão (Lima et al., 2022).

Estudos que envolvem a interação de FMA e plantas submetidas a solos contaminados por metais têm mostrado um incremento na tolerância de Cu^{2+} , devido à influência de diferentes cepas de fungos endomiorrízicos, que melhoraram as respostas morfofisiológicas de diferentes espécies vegetais sob diferentes concentrações de sais de Cu^{2+} (Adeyemi et al. 2021; Gonzalez-Chavez et al. 2002; Toler et al. 2005). Isto indica que a simbiose planta-FMA em solos degradados pode ser útil para aumentar a resistência da vegetação nativa em solos poluídos por Cu^{2+} em áreas impactadas por mineração.

O estabelecimento de *Joannesia princeps*, Vell. (Euphorbiaceae), tem sido relatado em áreas sob influência da mineração (Silva, 2013; Balestrin, 2018), sendo uma espécie amplamente responsiva a poluentes aéreos como ozônio, chuva ácida e material particulado nas folhas (Araujo, 2021, Andrade et al. 2020; Silva-R, 2020; Silva et al. 2005). Entretanto, estudos das alterações morfoanatômicas e posterior influência de FMA frente ao aumento de metais, são escassos. Portanto, o objetivo desse estudo foi caracterizar as alterações na anatomia foliar e histoquímica de *J. princeps*, submetida ao aumento de diferentes concentrações CuSO_4 em substratos sem e com um inóculo micorrízico de FMA. Pretende-se testar a hipótese de que plantas submetidas ao aumento de CuSO_4 são favorecidas pelo inóculo, diminuindo as alterações anatômicas causadas nas folhas.

Material e métodos

Condições de cultivo e delineamento experimental

O cultivo das plantas e as análises das alterações morfoanatômicas das folhas de *J. princeps*, submetidas ao aumento de CuSO_4 e FMA foram avaliadas na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) e no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa MG (UFV), Brasil (20 ° 45'20``S, 42 ° 52 '40'O), respectivamente.

A coleta de sementes maduras foi realizada no período de outubro a novembro de 2020 em áreas de solo próximas às árvores matrizes de *J. princeps* do Departamento de Engenharia

Florestal da Universidade Federal de Viçosa (MG, Brasil). As sementes foram higienizadas, quebradas para superar a dormência e colocadas em substrato florestal (Topstrato HT®) autoclavado para viabilizar sua germinação em um período de 20 dias. Posteriormente, as mudas foram plantadas em tubetes de 250 mL, durante 30 dias com 25 mL de inóculo de FMA extraído do solo de uma região de mata nativa adjacente a Mariana (MG, Brasil) (20° 18' 8,73" S – 43° 14' 11,13" W). O inoculante foi produzido pelo método de “On Farm” (Moreira et al., 2019; Prado et al., 2021), fazendo uma mistura de bagaço de cana de açúcar e vermiculita (1:1:1) e 1% de composto orgânico (cama de frango), utilizando *Sorghum bicolor* L. como hospedeiro. O inóculo foi concedido pelo Laboratório de Associações Micorrízicas (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura – Bioagro), contendo esporos de *Glomus albidum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora scrobiculata*.

Antes de colocar as plantas em substrato com cobre (colocado previamente por 30 dias em soluções 2, 4 e 8 mM de CuSO₄), foi avaliada a colonização de FMA em 24 mudas de *J. princeps*, tomando raízes finas previamente diafanizadas em solução de KOH 10%, em Banho de Maria a 75°C por sete minutos. Posteriormente, foram lavadas e colocadas em solução de KOH/H₂O₂ 10% (1:1) durante 10 minutos. As raízes foram lavadas com água destilada e colocadas em HCl 4%, coradas com azul de tripano por 2 minutos e observadas ao microscópio para estabelecer a porcentagem de colonização (Giovannetti e Mosse 1980; Phillips e Hayman, 1970).

Finalmente, 40 plantas sem e com inóculo foram transferidas a vasos de 2,5 L contendo 1.8 kg de substrato florestal (N: 0.06%; P: 0.05; K: 0.08%; Ca: 0.21%; Mg: 0.14%; S: 0.19%; Zn: 10.8 ppm; Fe: 13200,4 ppm; Mn: 46.9 ppm; Cu: 8.6 ppm; B: 7.6 ppm; CO: 3,43%; Na: 0.0032%; C/N: 57,16; pH: 5.77) contaminado com CuSO₄, durante um período de 35 dias. O delineamento experimental consistiu em dois tratamentos de plantas sem inóculo (S-in) e inoculadas (C-in), com quatro níveis de concentração: 0 (substrato não contaminado), 2, 4 e 8 mM (substrato contaminado com CuSO₄) e 5 mudas para cada concentração (2 x 4 x 5 = 40).

Caracterização visual e estrutural em microscópio de luz

Diariamente, foram observadas possíveis alterações visuais nas folhas das plantas expostas a CuSO₄ até o dia da coleta. Em seguida, fragmentos do centro e das margens foliares dos folíolos do quarto nó, foram coletados e fixados em glutaraldeído (2,5 %), lavados com tampão fosfato 0.1 M (Karnovsky, 1965), desidratados em série etílica e incluídos em metacrilato de hidróxi-metil (Historesin Leica) entre as 8:00 e 12:00 do meio dia. Seções

transversais de 5 µm foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (Modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Parte dos fragmentos foram corados com Azul de Toluidina (pH 4,0) (O'Brien & McCully, 1981) e montados em resina sintética (Permout, Fisher Scientific, Pittsburgh), para caracterização anatômica e observação de possíveis alterações em resposta ao incremento de CuSO₄.

Análise histoquímica

Para a análise histoquímica, parte das lâminas com os cortes foram submetidos aos testes: para detecção de pectinas com Vermelho de Rutênio, compostos fenólicos com Cloreto Férrico e amido com Lugol (Johansen, 1940). Para detecção de calose, foi usado o método proposto por Smith e McCully (1978) com Azul de Anilina. Fragmentos estocados em etanol 70% (v/v) foram cortados transversalmente com micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg & Bhering, Belo Horizonte, Brazil), para detecção de lignina com floroglucina ácida (Johansen, 1940). As lâminas usadas nos testes histoquímicos foram montadas em água imediatamente após serem coradas. Os cortes foram fotografados com fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com um sistema acoplado a uma câmera AxioCam (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Resultados

Porcentagem de colonização de FMA

A colonização de FMA nos fragmentos analisados em *J. princeps* apresentaram fungos do tipo Dark-septate associados às raízes, assim como diferentes estruturas de fungos micorrízicos arbusculares, principalmente vesículas (13%) e hifas (33%). A porcentagem média de colonização micorrízica total foi de 46% (Tabela 1). Não foram encontrados arbúsculos associados às células do córtex nos fragmentos de raízes analisados.

Caracterização visual e estrutural em microscópio de luz

Os folíolos de *J. princeps* em corte transversal, apresentam epiderme uniestratificada, com os estômatos voltados para a face abaxial (hipoestomática), mesofilo dorsiventral, parênquima lacunoso com grandes espaços intercelulares (Figs. 1A, 2A). A nervura principal é

proeminente, com feixe vascular colateral, rodeada por colênquima angular na face abaxial e uma camada maior subjacente à epiderme na face adaxial (Fig. 1A, E). Também são encontrados idioblastos contendo compostos fenólicos e drusas, distribuídos irregularmente na nervura principal (Fig 1E).

Plantas do tratamento 0 mM de CuSO_4 sem inóculo (Fig. 2A) apresentaram um arranjo uniforme nas células do parênquima paliçádico, núcleos localizados nas regiões mais próximas às paredes das células (Fig. 2B) e paredes do parênquima paliçádico e epiderme abaxial sem alterações (Fig. 2C, D). No entanto, nas plantas expostas a 8 mM, foram visualizados desarranjos e variações no formato das células do parênquima paliçádico, assim como paredes aparentemente engrossadas e levemente sinuosas, núcleos mais densos e deslocados da região próxima à parede, ficando mais no centro das células (Fig. 2E, F). Também se observou um aumento gradual nas projeções da parede do parênquima lacunoso em 4 e 8 mM (Fig. 1C, 2G respectivamente), junto com o aparecimento de células hipertrofiadas na epiderme abaxial (Fig. 1E) e uma redução visual dos espaços intercelulares, na concentração de 8 mM (Fig. 2E). Por outro lado, no tratamento de 8 mM com inóculo, tanto o parênquima paliçádico, quanto o parênquima lacunoso, tiveram arranjo semelhante à concentração de 0 mM de CuSO_4 sem inóculo (Fig. 2I, J).

Análise histoquímica

Nas diferentes concentrações de CuSO_4 , o teste com Vermelho de Rutênio mostrou reação com as paredes celulares do parênquima lacunoso de *J. princeps* sem e com inóculo (Fig 3). Verificou-se reação positiva nas protrusões da parede, observadas nas folhas das plantas expostas à concentração de 8 mM sem inóculo, assim como paredes visualmente mais espessadas (Fig. 3C-G). Nas plantas inoculadas expostas a 8 mM de CuSO_4 não foram relatadas protrusões da parede no parênquima lacunoso ou espessamentos da parede na mesma região (Fig. 3H).

O teste com cloreto férrico evidenciou compostos fenólicos em todas as concentrações de CuSO_4 , principalmente nas células da epiderme e extravasados no lume dos elementos do xilema da nervura de maior porte, no tratamento de 8 mM sem inóculo (Fig. 4C, detalhe), a diferença das plantas inoculadas, cuja densidade foi menor (Fig. 4G, H).

No teste histoquímico com lugol, foi observado um aumento na frequência e tamanho dos grãos de amido nos cloroplastos das plantas sem inóculo, expostas à maior concentração de cobre (Fig. 5B), a respeito do tratamento de 0 mM (Fig. 5A). Enquanto que, para as plantas com

inóculo da concentração de 8 mM de CuSO₄, foi possível observar um menor tamanho dos grãos de amido no parênquima paliçádico em comparação com os tratamentos sem FMA (Fig. 5 C, D).

Foi observada deposição de calose ao redor dos cristais de oxalato de cálcio, associados à nervura mediana e à margem das folhas de *J. princeps* sem inóculo, expostas a 8 mM de CuSO₄ (Fig. 6 C-E). Verificou-se reação positiva de calose nas folhas inoculadas na maior concentração, ao redor das drusas do parênquima paliçádico e algumas regiões da parede do parênquima lacunoso (Fig. 6 F-H). Na concentração de 0 mM de CuSO₄ (Fig. 6A, B) e nas concentrações de 2 e 4 mM de CuSO₄ não foi visualizada a deposição de calose.

Discussão

A variação na homeostase de nutrientes causada pelo aumento nas concentrações de metais influencia as respostas morfoanatômicas das plantas. A anatomia foliar, tem um carácter prognóstico a qual evidencia os primeiros sintomas em plantas submetidas a estresse abiótico, antes de serem observados sintomas na morfologia foliar (Sant'Anna-santos et al. 2012; Silva et al. 2020). Neste trabalho, as variações na anatomia foliar de *J. princeps* em ausência do inóculo, mostraram paredes sinuosas e um desarranjo progressivo nas células do parênquima paliçádico a partir de 4 mM de CuSO₄.

As alterações na parede celular, podem estar associadas à redução significativa de Ca na parte aérea das plantas, visto que o Ca está envolvido na estabilização e coesão da parede celular (Demarty et al. 1984; Thor 2019) e sua entrada através da raiz pode ser diminuída por altas concentrações de metais (Gomes et al. 2012; Ja 2005; Österås and Greger 2006). Assim, pode-se inferir que a alteração no formato celular registrado neste estudo, está relacionada com a desestabilização da estrutura das paredes celulares de folhas de *J. princeps*. Porém, nos tratamentos com inóculo, não foram registradas modificações no formato celular, devido a menores teores de Cu²⁺ na parte aérea e ao aumento na captação de Ca, que pode ser favorecida pela presença de FMA (Aggarwal et al. 2011; Clark and Zeto 2008).

A visualização de núcleos mais densos e deslocados da parede da célula nas mudas expostas a 8 mM sem inóculo pode significar o começo de senescência celular em resposta ao estresse, causado pelas altas concentrações de CuSO₄ em *J. princeps*. Dessa forma, é possível afirmar que a partir da concentração de 8 mM CuSO₄ começa a se registrar alterações no

parênquima clorofiliano e lacunoso das folhas de *J. princeps*, modificando a distribuição interna e formato do conteúdo citoplasmático.

A redução visual dos espaços intercelulares no parênquima lacunoso ocorreu devido ao incremento de Cu^{2+} na parte aérea de *J. princeps*. Esse resultado se ajusta ao relatado por Maruthi et al. (2011) e Pita-Barbosa et al. (2019) em *Arabidopsis thaliana* e *Pteris vittata* expostas ao As e Cr respectivamente, onde evidenciaram, além da redução nos espaços intercelulares do parênquima lacunoso, um efeito na fotossíntese das plantas. Dessa forma, sugere-se que a redução nos espaços intercelulares do parênquima lacunoso de *J. princeps* pode ter modificado o intercâmbio de CO_2 , aumentando o estresse a partir de concentrações de 8 mM de CuSO_4 .

O aparecimento de protruções de natureza péctica nas paredes do parênquima lacunoso, verificadas a partir do teste com vermelho de rutênio, são indicadoras do estresse derivado de processos intercelulares lentos que, em consequência, alteram a estrutura da parede celular (Fernandes and Moura 2021; Günthardt-goerg et al. 1997). As modificações na parede celular por estresse abiótico são resultados de um possível aumento de H_2O_2 no apoplasto, que pode alterar o metabolismo secundário (Wojtaszek 1997; Wojtaszek 1997; Reig-Arminana et al. 2004; Günthardt-goerg 2007; Shapiguzov et al. 2012;), incrementando irregularmente a deposição de pectina na parede (Hermle et al. 2007; Moura et al. 2018). Assim, é possível afirmar que a maior concentração de CuSO_4 usada neste estudo, induziu o aumento no aparecimento de protruções na parede do parênquima lacunoso, que pode ser considerada como um dos primeiros sintomas associados ao estresse pela entrada de Cu^{2+} em *J. princeps*. Da mesma forma, pode-se inferir que concentrações a partir de 8 mM, poderiam começar a modificar os processos fotossintéticos. Nas plantas inoculadas não foram observadas alterações anatômicas na anatomia foliar, indicando que além de diminuir a entrada de íons Cu^{2+} na parte aérea, a presença de fungos endomicorrízicos diminuiu o aparecimento de protruções pécticas na parede celular das folhas.

Nas plantas sem inóculo foi possível visualizar uma maior deposição de compostos fenólicos na margem das folhas, assim como na nervura de maior porte nas concentrações de 8 mM. O aumento de fenóis nos vacúolos, em resposta ao aumento na concentração de metais, está relacionada com a detoxificação e tolerância a altos teores desses elementos (Górecka et al. 2007; Janas et al. 2010), incrementando a formação de complexos com derivados fenólicos glicosídeos nas regiões hidrofílicas da célula, como mecanismo de resistência a elementos potencialmente tóxicos (Białońska et al. 2007; Tong et al. 2004). Esses complexos promovem a eliminação de radicais livres e evitam o dano oxidativo do aparato fotossintético (Michalak

2006; Sakihama et al. 2002; Sytar et al. 2013). Da mesma forma, Hristozkova et al. (2016) e Kisa et al. (2016) relataram que a inoculação de fungos micorrízicos aumentou significativamente a concentração de fenóis em folhas em *Calendula officinalis* e *Zea mays* respectivamente, sob o efeito de Cd e Pb.

Dessa maneira, é possível sugerir que apesar do incremento gradativo nas concentrações de CuSO₄, *J. princeps* pode apresentar mecanismos de tolerância associados à síntese de fenóis para reduzir o estresse causado por Cu²⁺ no tecido foliar, evidenciada no aumento da densidade de compostos fenólicos nos vacúolos na nervura principal das folhas de *J. princeps*. Portanto, recomenda-se caracterizar o tipo de compostos fenólicos sintetizados por *J. princeps* em condições de estresse por Cu²⁺ de mudas sem e com inóculo de FMA para verificar se os mecanismos de detoxificação a respeito da síntese desses compostos, varia de acordo com a presença de fungos endomicorrízicos.

O aumento da densidade dos grãos de amido nos cloroplastos das folhas de *J. princeps* pode indicar que o incremento de CuSO₄ diminuiu o carregamento do floema e a capacidade de transporte de assimilados (Alaoui-Sossé et al. 2004), assim como a possível redução na atividade da amilase, interferindo com o rompimento de amido (Devi et al. 2007; Kuriakose and Prasad 2008). Concentrações potencialmente tóxicas de metais, podem alterar a atividade da amilase, reduzindo o rompimento de amido e em consequência, aumentando a acumulação de polissacarídeos no mesofilo. Portanto, infere-se que a partir de 8 mM de CuSO₄ em plantas de *J. princeps* sem inóculo, pode ser alterada a atividade metabólica em resposta ao estresse por altas concentrações de cobre no solo. Entretanto, sugere-se determinar a atividade da amilase e outras enzimas associadas ao metabolismo primário de *J. princeps*, para determinar se o aumento de CuSO₄ modifica a atividade enzimática da planta.

A deposição de calose em plantas, é decorrente ao incremento do estresse causado por altas concentrações de metais, que promovem a inativação de H-ATPases da membrana, aumentando sua permeabilidade e posterior entrada de cálcio no citoplasma, induzindo a ativação de enzimas que sintetizam calose (Bhuja et al. 2004; O'Leary et al. 2018; Rengel and Zhang 2003). O aumento na intensidade de calose nas células, tem sido postulada também como uma barreira tanto à entrada de patógenos (Pérez-De-Luque et al. 2017; Sanmartín et al. 2021) quanto de metais (Krzesłowska 2011; Samardakiewicz et al. 1996), incluindo plantas inoculadas com FMA (Guarino et al. 2014). Nesse sentido, a reação positiva para calose, verificada em algumas regiões da parede do parênquima paliçádico e lacunoso das plantas com inóculo, sugere uma possível proteção contra a entrada de Cu²⁺ no citoplasma celular, como sugerem Arru et al. (2004); Sahi et al. (2007) e Xu et al. (2013).

A deposição de calose nas drusas, pode ter relação com um avançado estado de desenvolvimento desses cristais em folhas maduras (Brander 1987; Currier and Webster 1985; Katayama et al. 2007). Entretanto, a reação positiva com azul de anilina, na parede dos cristais de oxalato de cálcio de *J. princeps*, só foi encontrada na maior concentração de CuSO_4 das plantas sem e com inóculo, o que permite inferir que, possivelmente, existe uma relação entre a deposição de calose nas drusas e o aumento na concentração de CuSO_4 . Porém, é necessário identificar se os cristais de oxalato de cálcio nesta espécie imobilizam íons de Cu^{2+} . Da mesma forma, investigar se a síntese de calose nas drusas tem algum papel na proteção dos tecidos foliares sob altas concentrações de metais.

Conclusão

As alterações no formato e posição do núcleo, modificações no formato das células do parênquima paliádico, diminuição dos espaços intercelulares e deposição tanto de protrusões pécticas, quanto de calose na parede do parênquima lacunoso, são resultados do efeito negativo causado pelo aumento nas concentrações de CuSO_4 nas plantas sem inóculo. Da mesma forma, encontrou-se maior intensidade de fenóis nos vacúolos, sugerindo um papel antioxidativo frente aos altos teores de Cu^{2+} nas folhas.

As mudas inoculadas não mostraram alterações decorrentes da toxidez de Cu^{2+} . Entretanto, foi observada uma maior distribuição na deposição de calose, especificamente nas paredes do parênquima lacunoso e ao redor dos cristais de oxalato de cálcio indicando que a síntese desse composto pode ter um papel como barreira frente à entrada de cobre das plantas de *J. princeps*.

Sugere-se realizar experimentos focados em entender o papel das drusas em relação à tolerância por metais, assim como estudos de MET, para compreender o efeito da acumulação de Cu^{2+} no citoplasma e no núcleo das células do parênquima paliádico e lacunoso de *J. princeps*.

Referências

Araújo H. H. (2021). Efeitos morfoanatômicos, metabólicos e genotoxicidade do herbicida glifosato em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): contribuições para o biomonitoramento ambiental. Dissertação Universidade Federal de Viçosa. Brasil.

- Adeyemi, N. O., Atayese, M. O., Sakariyawo, O. S., Azeez, J. O., Abayomi Sobowale, S. P., Olubode, A., et al. (2021). Alleviation of heavy metal stress by arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Glycine max* (L.) grown in copper, lead and zinc contaminated soils. *Rhizosphere*, 18(June 2020). <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100325>.
- Aggarwal, A., Kadian, N., Tanwar, A., Yadav, A., & Gupta, K. K. (2011). Role of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in global sustainable development. *Journal of Applied and Natural Science*, 3(2), 340–351. <https://doi.org/10.31018/jans.v3i2.211>.
- Al-garni, S. M. S. (2006). Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer *Rhizobium* bacterium, 5(January), 133–142.
- Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D., & Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166(5), 1213–1218. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.032>.
- Ali, B., Wang, B., Ali, S., Ghani, M. A., Hayat, M. T., Yang, C., et al. (2013). 5-Aminolevulinic Acid Ameliorates the Growth, Photosynthetic Gas Exchange Capacity, and Ultrastructural Changes Under Cadmium Stress in *Brassica napus* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), 604–614. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9328-6>.
- Alloway, B. J. (2013). *Heavy metals in soils. Heavy metals in soils*. [https://doi.org/10.1016/s0165-9936\(96\)90032-1](https://doi.org/10.1016/s0165-9936(96)90032-1).
- Amin, H., Arain, B. A., Jahangir, T. M., Rasool, A., Mangi, J., Abbasi, M. S., & Amin, F. (2019). Copper (Cu) tolerance and accumulation potential in four native plant species : a comparative study for effective phytoextraction technique. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 00(00), 1–12. <https://doi.org/10.1080/24749508.2019.1700671>.
- Andrade, G. C., Castro, L. N., & Silva, L. C. da. (2020). Micromorphological alterations induced by simulated acid rain on the leaf surface of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). *Ecological Indicators*, 116(May), 106526. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106526>.
- Andrade, S. A. L., Silveira, A. P. D., & Mazzafera, P. (2010). Science of the Total Environment Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. *Science of the Total Environment*, The, 408(22), 5381–5391. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.064>.
- Arru, L., Rognoni, S., Baroncini, M., Bonatti, P. M., & Perata, P. (2004). Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution. *Euphytica*, 140(1–2), 33–38. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4752-0>.
- Bekker, A., Slack, J. F., Planavsky, N., Krapež, B., Hofmann, A., Konhauser, K. O., & Rouxel, O. J. (2010). Iron formation: The sedimentary product of a complex interplay among mantle, tectonic, oceanic, and biospheric processes. *Economic Geology*, 105(3), 467–508. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.105.3.467>.

- Bhalla, S., & Garg, N. (2021). Arbuscular mycorrhizae and silicon alleviate arsenic toxicity by enhancing soil nutrient availability, starch degradation and productivity in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Mycorrhiza*, *31*(6), 735–754. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01056-z>.
- Bhuja, P., McLachlan, K., Stephens, J., & Taylor, G. (2004). Accumulation of 1,3- β -D-glucans, in response to aluminum and cytosolic calcium in *Triticum aestivum*. *Plant and Cell Physiology*, *45*(5), 543–549. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch068>.
- Białońska, D., Zobel, A. M., Kuraś, M., Tykarska, T., & Sawicka-Kapusta, K. (2007). Phenolic compounds and cell structure in bilberry leaves affected by emissions from a Zn-Pb smelter. *Water, Air, and Soil Pollution*, *181*(1–4), 123–133. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9284-x>.
- Brander, U. (1987). Ultrastructure of the Callose and Cellulose Types of Crystal Envelopes in the Calcium Oxalate Idioblasts of, *26*.
- Cardoso, E. B., Júnior, P. P., de Cássia Soares da Silva, M., Cerqueira, A. E. S., Jordão, T. C., Moreira, B. C., et al. (2021). Composition and diversity of prokaryotes at an iron ore post-mining site revealed the natural resilience 10 years after mining exploitation. *Land Degradation and Development*, *32*(1), 256–269. <https://doi.org/10.1002/ldr.3713>.
- Clark, R. B., & Zeto, S. K. (2008). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants *Mineral Acquisition by Arbuscular Mycorrhizal Plants*, *4167*. <https://doi.org/10.1080/01904160009382068>.
- Coelho, D. G., Marinato, C. S., de Matos, L. P., de Andrade, H. M., da Silva, V. M., Neves, P. H. S., & de Oliveira, J. A. (2020). Evaluation of Metals in Soil and Tissues of Economic-Interest Plants Grown in Sites Affected by the Fundão Dam Failure in Mariana, Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *16*(5), 596–607. <https://doi.org/10.1002/ieam.4253>.
- Currier, H., & Webster, D. (1985). Callose Formation and Subsequent Disappearance : Studies in Ultrasound Stimulation Author (s): H . B . Currier and D . H . Webster Published by : Oxford University Press Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/4260312> REFERENCES Linked references are, *39*(5), 843–847.
- Da Silva, L. C., Azevedo, A. A., Monteiro Da Silva, E. A., & Oliva, M. A. (2005). Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Australian Journal of Botany*, *53*(8), 789–796. <https://doi.org/10.1071/BT04096>.
- Dalcorso, G., Manara, A., Piasentin, S., & Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics*, *6*(10), 1770–1788. <https://doi.org/10.1039/c4mt00173g>.
- Dary, M., Chamber-pérez, M. A., Palomares, A. J., & Pajuelo, E. (2010). “ In situ ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria, *177*, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.035>.

Demarty, M., Morvan, C., Thellier, M., Echanges, L., Cnrs, L. A., Rouen, S. De, & Aignan, M. Saint. (1984). Calcium and the cell \ A / all, 441–448.

Devi, P. U., Murugan, S., Akilapriyadharasini, S., Suja, S., & Chinnaswamy, P. (2007). Effect of mercury and effluents on seed germination, root-shoot length, amylase activity and phenolic compounds in *Vigna unguiculata*. *Nature Environment and Pollution Technology*, 6(3), 457–462.

Elhindi, K. M., Al-mana, F. A., El-hendawy, S., Al-selwey, W. A., & Elgorban, A. M. (2018). Soil Science and Plant Nutrition Arbuscular mycorrhizal fungi mitigates heavy metal toxicity adverse effects in sewage water contaminated soil on *Tagetes erecta* L Arbuscular mycorrhizal fungi mitigates heavy metal toxicity adverse effects in. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(5), 662–668. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1490631>.

Ezawa, T., & Saito, K. (2018). Tansley insight How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. <https://doi.org/10.1111/nph.15187>.

Feil, S. B., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Tiziani, R., Mimmo, T., & Cesco, S. (2020). Plant Physiology and Biochemistry Copper toxicity affects phosphorus uptake mechanisms at molecular and physiological levels in *Cucumis sativus* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 157(October), 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.023>.

Fernandes, F., & Moura, B. (2021). Foliage visible injury in the tropical tree species , *Astronium graveolens* is strictly related to phytotoxic ozone dose (PODy), 41726–41735.

Festa, R. A., & Thiele, D. J. (2011). Copper: An essential metal in biology. *Current Biology*, 21(21), R877–R883. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>.

Galli, U., Schuepp, H., & Brunold, C. (1994). Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 92(2), 364–368. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1994.920224.x>.

Gonzalez-Chavez, C., D’Haen, J., Vangronsveld, J., & Dodd, J. C. (2002). Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil*, 240(2), 287–297. <https://doi.org/10.1023/A:1015794622592>.

González-Chavez, M. C., R, C.-G., Wright, S. F., & Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin , a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi , in sequestering potentially toxic elements, 130, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>.

González-guerrero, M., Benabdellah, K., Ferrol, N., & Azcón-aguilar, C. (2009). Mechanisms Underlying Heavy Metal Tolerance in Arbuscular Mycorrhizas (pp. 107–122).

González-Guerrero, M., Melville, L. H., Ferrol, N., Lott, J. N. A., Azcón-Aguilar, C., & Peterson, R. L. (2008). Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(2), 103–110. <https://doi.org/10.1139/W07-119>.

- Górecka, K., Cvikrová, M., Kowalska, U., Eder, J., Szafránska, K., Górecki, R., & Janas, K. M. (2007). The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.12.007>.
- Guarino, C., Conte, B., Spada, V., Arena, S., Sciarrillo, R., & Scaloni, A. (2014). Proteomic analysis of eucalyptus leaves unveils putative mechanisms involved in the plant response to a real condition of soil contamination by multiple heavy metals in the presence or absence of mycorrhizal/rhizobacterial additives. *Environmental Science and Technology*, *48*(19), 11487–11496. <https://doi.org/10.1021/es502070m>.
- Guerra, M. B. B., Teaney, B. T., Mount, B. J., Asunskis, D. J., Jordan, B. T., Barker, R. J., et al. (2017). Post-catastrophe Analysis of the Fundão Tailings Dam Failure in the Doce River System, Southeast Brazil: Potentially Toxic Elements in Affected Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, *228*(7). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3430-5>.
- Günthardt-goerg, M. S., Mcquattie, C. J., Scheidegger, C., Rhiner, C., & Matyssek, R. (1997). Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls, (June 2014). <https://doi.org/10.1139/cjfr-27-4-453>.
- Günthardt-goerg, M. S., & Vollenweider, P. (2007). Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives, *147*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.033>.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, *219*, 1–14.
- Hermle, S., Vollenweider, P., Günthardt-Goerg, M. S., Mcquattie, C. J., & Matyssek, R. (2007). Leaf responsiveness of *Populus tremula* and *Salix viminalis* to soil contaminated with heavy metals and acidic rainwater. *Tree Physiology*, *27*(11), 1517–1531. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.11.1517>.
- Janas, K. M., Zielińska-Tomaszewska, J., Rybaczek, D., Maszewski, J., Posmyk, M. M., Amarowicz, R., & Kosińska, A. (2010). The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *167*(4), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.09.016>.
- Prado, I. G. de O., da Silva, M. de C. S., Diogo, N. V., Prates Júnior, P., Veloso, T. G. R., et al. (2021). Shifts in Arbuscular Mycorrhizal fungal properties due to vegetative remediation of mine spoil contamination from a dam rupture in Mariana, Brazil. *Applied Soil Ecology*, *162*(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103885>.
- Kan, X., Dong, Y., Feng, L., Zhou, M., & Hou, H. (2021). Contamination and health risk assessment of heavy metals in China's lead–zinc mine tailings: A meta–analysis. *Chemosphere*, *267*, 128909. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128909>.
- Katayama, H., Fujibayashi, Y., Nagaoka, S., & Sugimura, Y. (2007). Cell wall sheath surrounding calcium oxalate crystals in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, *231*(3–4), 245–248. <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0263-x>.

Krzyszowska, M. (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 35–51. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0581-z>.

Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8(3), 269–285. <https://doi.org/10.1039/c5mt00244c>.

Kuriakose, S. V., & Prasad, M. N. V. (2008). Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regulation*, 54(2), 143–156. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9237-4>.

Lana-Costa, J., da Silva, M. M., Martins, A. O., Guarnier, J. C., Silva Junior, R. de O., Silva, D. M., et al. (2021). Biochemical and physiological aspects of restinga herbaceous plants tolerance to iron ore tailing plume along the coastal region of Espírito Santo-Brazil. *Environmental and Experimental Botany*, 191(July). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104618>.

Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *PNAS*, 106(20), 8344–8349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>.

Maruthi Sridhar, B. B., Han, F. X., Diehl, S. V., Monts, D. L., & Su, Y. (2011). Effect of phytoaccumulation of arsenic and chromium on structural and ultrastructural changes of brake fern (*Pteris vittata*). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(4), 285–293. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202011000400006>.

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523–530.

Miladinova-Georgieva, K., Ivanova, K., Georgieva, T., Geneva, M., Petrov, P., Stancheva, I., & Markovska, Y. (2018). EDTA and citrate impact on heavy metals phytoremediation using paulownia hybrids. *International Journal of Environment and Pollution*, 63(1–2), 31–46.

Moura, B., Segala, E., Alexandre, M., Ribeiro, S., Souza, D., Schaub, M., & Vollenweider, P. (2018). Science of the Total Environment Ozone affects leaf physiology and causes injury to foliage of native tree species from the tropical Atlantic Forest of southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 610–611, 912–925. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.130>.

O'Lexy, R., Kasai, K., Clark, N., Fujiwara, T., Sozzani, R., & Gallagher, K. L. (2018). Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmatal permeability via deposition and breakdown of callose. *Journal of Experimental Botany*, 69(15), 3715–3728. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery171>.

Pedersen, M. B., Kjær, C., & Elmegaard, N. (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper to black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in relation to bioavailability and the age of soil contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 431–439. <https://doi.org/10.1007/s002440010124>.

Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G., & Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain.

International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 41(8–9), 1665–1677. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.005>.

Pereira, A. S., Cortez, P. A., de Almeida, A. A. F., Prasad, M. N. V., França, M. G. C., da Cunha, M., et al. (2017). Morphology, ultrastructure, and element uptake in *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Calophyllaceae J. Agardh) seedlings under cadmium exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(18), 15576–15588. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9187-y>.

Pérez-De-Luque, A., Tille, S., Johnson, I., Pascual-Pardo, D., Ton, J., & Cameron, D. D. (2017). The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogen. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16697-4>.

Pita-Barbosa, A., Williams, T. C. R., & Loureiro, M. E. (2019). Effects of short-term arsenic exposure in *Arabidopsis thaliana*: Tolerance versus toxicity responses. *Biologia Plantarum*, 63(1), 43–53. <https://doi.org/10.32615/bp.2019.006>.

Puthur, E. J. J. T. (2020). Direct and indirect influence of arbuscular mycorrhizae on enhancing metal tolerance of plants. *Archives of Microbiology*, 202(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01730-z>.

Quaresma, V. S., Aguiar, V. M. C., Bastos, A. C., Oliveira, K. S., Vieira, F. V., Sá, F., & Baptista Neto, J. A. (2021). The impact of trace metals in marine sediments after a tailing dam failure: the Fundão dam case (Brazil). *Environmental Earth Sciences*, 80(17). <https://doi.org/10.1007/s12665-021-09817-x>.

Queiroz, H. M., Ying, S. C., Abernathy, M., Barcellos, D., Gabriel, F. A., Otero, X. L., et al. (2021). Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. *Environment International*, 146(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106284>.

Quin, B. F., & Woods, P. H. (1976). Rapid manual determination of sulfur and phosphorus in plant material. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 7(4), 415–426. <https://doi.org/10.1080/00103627609366652>.

Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>.

Reig-Arminana, V., Cervero, J., Garcá, F. J., Ibars, A., & Sanz, M. J. (2004). Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.), 132, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.006>.

Rengel, Z., & Zhang, W. H. (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159(2), 295–314. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00821.x>.

Riaz, M., Kamran, M., Fang, Y., Wang, Q., Cao, H., Yang, G., et al. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated

soils: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 402(March 2020), 123919. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123919>.

Rucińska-Sobkowiak, R. (2016). Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(11). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2277-5>.

Sahi, S. V., Israr, M., Srivastava, A. K., Gardea-Torresdey, J. L., & Parsons, J. G. (2007). Accumulation, speciation and cellular localization of copper in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, 67(11), 2257–2266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.006>.

Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8).

Samardakiewicz, S., Strawiński, P., & Woźny, A. (1996). The influence of lead on callose formation in roots of *Lemna minor* L. *Biologia Plantarum*, 38(3), 463–467. <https://doi.org/10.1007/BF02896682>.

Sanmartín, N., Pastor, V., Pastor-Fernández, J., Flors, V., Pozo, M. J., & Sánchez-Bel, P. (2021). Role and mechanisms of callose priming in mycorrhiza-induced resistance. *Journal of Experimental Botany*, 71(9), 2769–2781. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA030>.

Sant'Anna-santos, B. F. S., Azevedo, A. A., Silva, L. C., & Oliva, M. A. (2012). Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. f. (*Anacardiaceae*), 84, 689–702.

Santana, N. A., Rabuscke, C. M., Soares, V. B., Soriani, H. H., Nicoloso, F. T., Josemar, R., & Jacques, S. (2018). Vermicompost dose and mycorrhization determine the efficiency of copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis*, 12663–12677.

Schutzendubel, A., Polle, A., Institut, F., Abteilung, I., Baumphysiologie, F., & Universita, G. A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, 53(372), 1351–1365.

Segura, F. R., Nunes, E. A., Paniz, F. P., Paulelli, A. C. C., Rodrigues, G. B., Braga, G. Ú. L., et al. (2016). Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, 218, 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>.

Senen, M., Arias, B., Peña-cabriales, J. J., Alarcón, A., Senen, M., Arias, B., & E, J. J. O. S. (2015). Enhanced Pb Absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. Plants Inoculated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungi Consortium Enhanced Pb Absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. Plants Inoculated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungi Consortium, 6514. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.898023>.

Shapiguzov, A., Julia, P., Wrzaczek, M., & Kangasjärvi, J. (2012). ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through Abiotic stress, 3(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00292>.

Shi, & Cai, Q. (2009a). Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to zinc stress. *Biologia Plantarum*, 53(2), 391–394. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0074-3>.

- Shi, G., & Cai, Q. (2009b). Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.02.009>.
- Shi, Sun, L., Wang, X., & Liu, C. (2014). Leaf responses to iron nutrition and low cadmium in peanut: Anatomical properties in relation to gas exchange. *Plant and Soil*, 375(1–2), 99–111. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1953-0>.
- Silva, L., Freitas-silva, L. De, Rocha, I., & Castro, D. (2020). Leaf Morpho-anatomical Structure Determines Differential Response Among Restinga Species Exposed to Emissions from an Iron Ore Pelletizing Plant.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB2016), 1–36. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>.
- Souza, L. A. De, Adrián, S., Andrade, L. De, Souza, C. R. De, & Schiavinato, M. A. (2011). Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *glomus etunicatum* em, (3), 1441–1451.
- Stroud, R. M. (2015). Fungal association and utilization of phosphate by plants : success , limitations , and future prospects, 6(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00984>.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., & Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(4), 985–999. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1169-6>.
- Thor, K. (2019). Calcium — Nutrient and Messenger, 10(April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440>.
- Toler, H. D., Morton, J. B., & Cumming, J. R. (2005). Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. *Water, Air, and Soil Pollution*, 164(1–4), 155–172. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-2718-z>.
- Tong, Y. P., Kneer, R., & Zhu, Y. G. (2004). Vacuolar compartmentalization: A second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 9(1), 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.11.009>.
- Várad, G., Polyánka, H., Darkó, É., & Lehoczki, E. (2003). Atrazine resistance entails a limited xanthophyll cycle activity, a lower PSII efficiency and an altered pattern of excess excitation dissipation. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 47–56. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00089.x>.
- Verlag, F., Davies, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N., & Grossi, J. A. S. (2001). Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*), 786.

- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection, 692, 681–692.
- Wolff, G., Pereira, G., Castro, E., Louzada, J., & Coelho, F. (2012). The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 71–77. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000100009>.
- Xie, L., & van Zyl, D. (2020). Distinguishing reclamation, revegetation and phytoremediation, and the importance of geochemical processes in the reclamation of sulfidic mine tailings: A review. *Chemosphere*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126446>.
- Xu, Q., Qiu, H., Chu, W., Fu, Y., Cai, S., Min, H., & Sha, S. (2013). Copper ultrastructural localization, subcellular distribution, and phytotoxicity in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(12), 8672–8679. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1828-1>.
- Yang, S., Liang, S., Yi, L., Xu, B., Cao, J., Guo, Y., & Zhou, Y. (2014). Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing on manganese mine tailings, 8(3), 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11783-013-0602-4>.
- Zhan, F., He, Y., Zu, Y., Zhang, N., Yue, X., Xia, Y., & Luo, Y. (2013). Heavy metal and sulfur concentrations and mycorrhizal colonizing status of plants from abandoned lead / zinc mine land in Gejiu , Southwest China, 7(30), 10. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1780>.
- Zhan, F., Li, B., Jiang, M., Yue, X., He, Y., Xia, Y., & Wang, Y. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance antioxidant defense in the leaves and the retention of heavy metals in the roots of maize. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 24338–24347. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2487-z>.
- Zhang, X. H., Lin, A. J., Gao, Y. L., Reid, R. J., Wong, M. H., & Zhu, Y. G. (2009). Arbuscular mycorrhizal colonisation increases copper binding capacity of root cell walls of *Oryza sativa* L. and reduces copper uptake. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(5), 930–935. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.08.011>.

Figuras e Tabelas

Tabela 1. Porcentagem de colonização de fungos micorrízicos arbusculares em fragmentos de raízes de *J. princeps* dos tratamentos sem inóculo (S-in) e com inóculo (C-in), antes de serem expostas às diferentes concentrações de CuSO₄.

| porcentagem de colonização micorrízica | | |
|---|---------------|---------------|
| Tratamentos | S-in % | C-in % |
| Hifas | 0 | 33 |
| Vesículas | 0 | 13 |
| Arbusculos | 0 | 0 |
| Total | 0 | 46 |

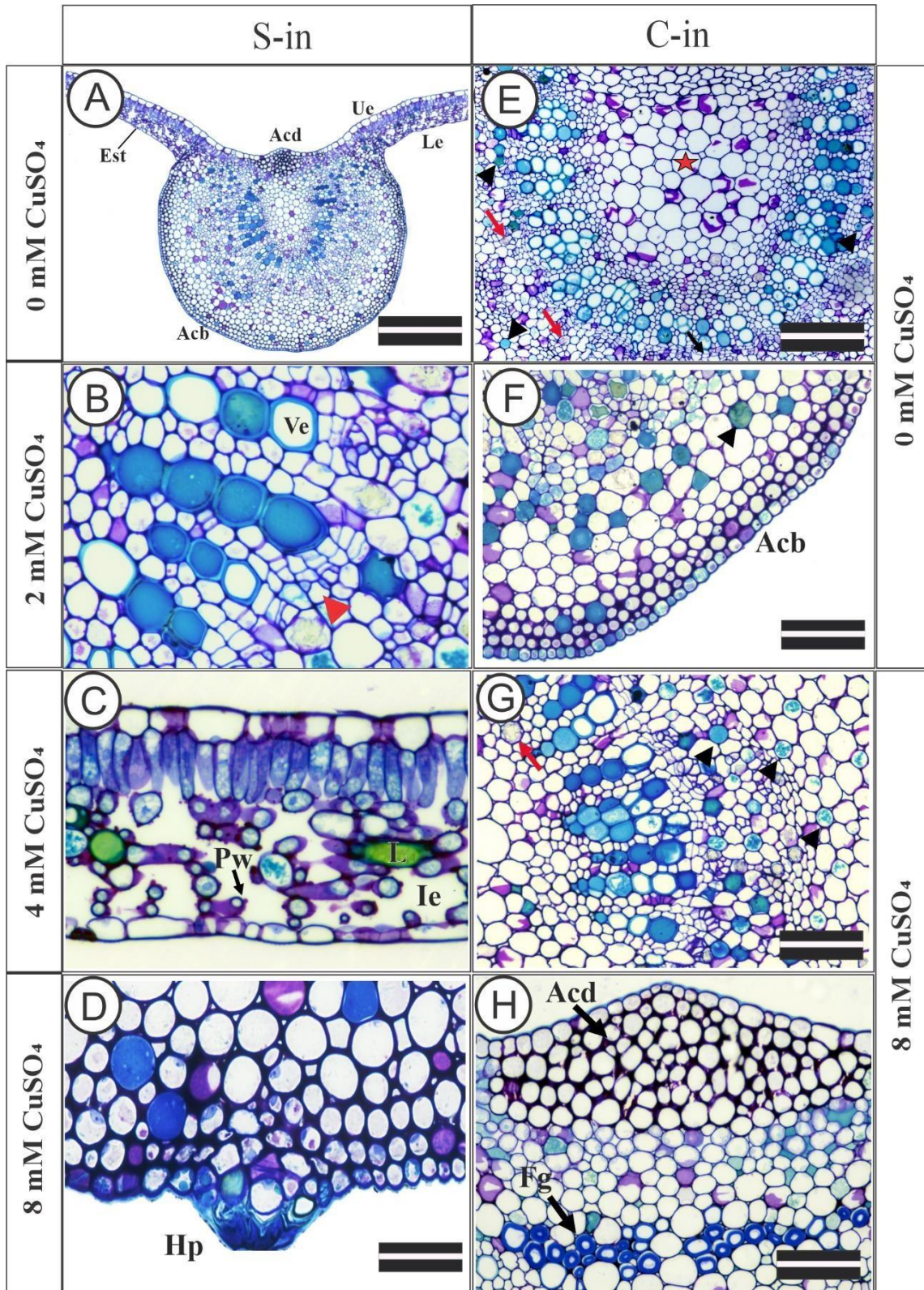


Fig. 1. Anatomia foliar de *J. princeps*, sob diferentes concentrações de CuSO_4 sem inóculo (A-D) e com inóculo (E-H) em seções transversais. Sem alterações associadas pelo aumento de CuSO_4 (A, B, E-H) e com alterações na parede do parênquima lacunoso (C) e aparente hipertrofia na face abaxial da nervura de maior porte (D). Ue: Epiderme adaxial; Le: Epiderme abaxial; Ac: Colênquima angular; Acd: Colênquima angular adaxial; Acb: Colênquima angular abaxial; Est: estômato; Pw: Protrusões da parede; L: Laticífero; Ve: Elementos de vaso; Fg: Fibras gelatinosas; Hp: Hipertrofia; Ie: Espaços intercelulares; Seta: Câmbio; Ponta de seta

negra: Compostos fenólicos; Ponta de seta vermelha: Floema; Estrela vermelha: Células de parênquima; Seta vermelha: Idioblastos cristalíferos. Barras: A = 280 μm ; B = 80 μm ; C, H = 75 μm ; D, E = 50 μm ; F, G = 65 μm .

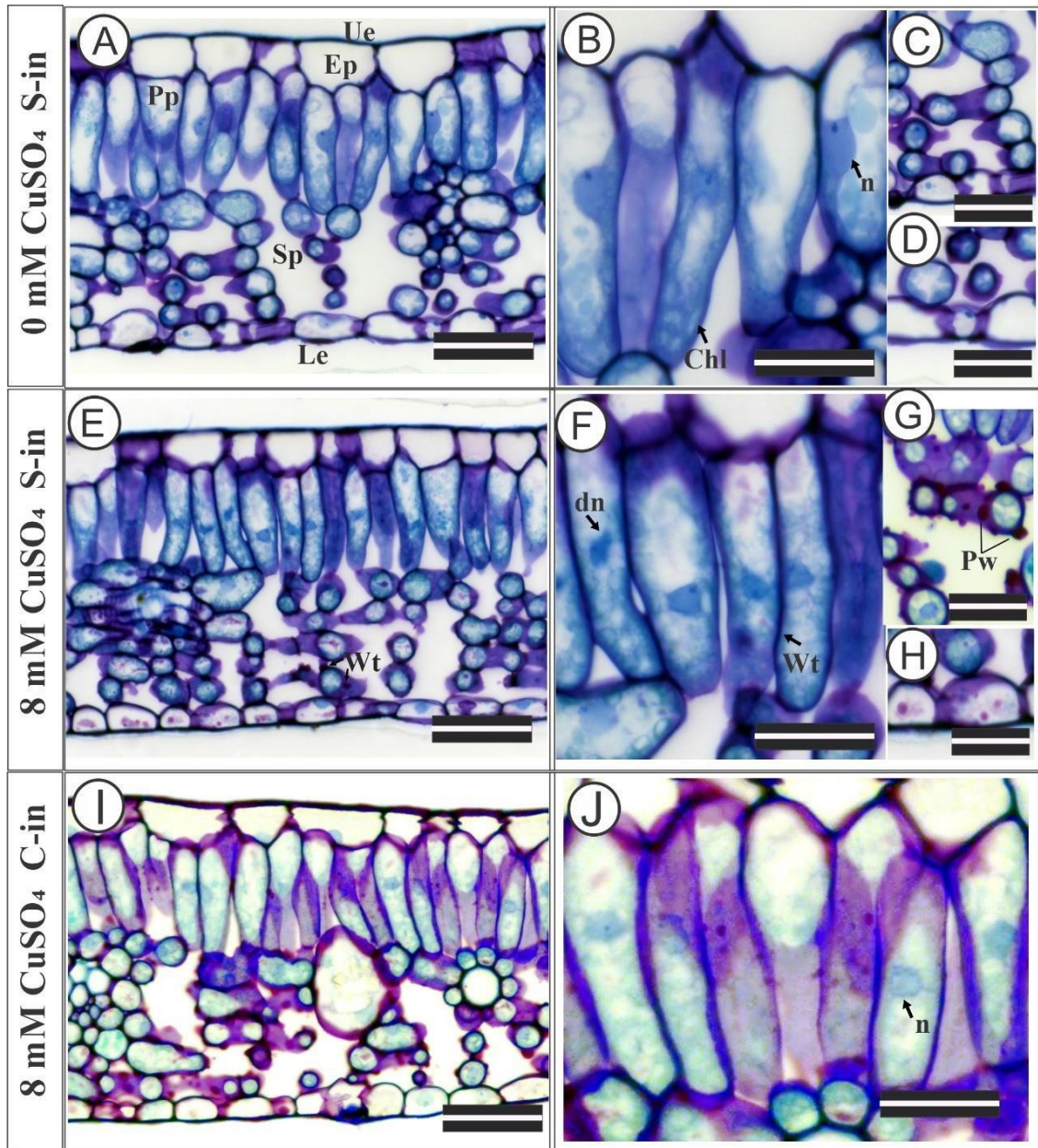


Fig. 2. Anatomia foliar de *J. princeps*, sob diferentes concentrações de CuSO_4 sem inóculo: 0 mM de CuSO_4 (A-D); 8 mM (E-H), com engrossamento na parede (E), núcleos densos e deslocados da parede celular (F), protrusões da parede no parênquima lacunoso (G) e epiderme aparentemente alterada (H) e com inóculo: 8 mM (I-J), sem danos visuais. Ue: Epiderme adaxial; Le: Epiderme abaxial; Ep: Epiderme; Pp: Parênquima paliçádico; Sp: Parênquima lacunoso; Chl: Cloroplasto; n: Núcleo; dn: Núcleo denso; Pw: Protrusões da parede; Wt: engrossamento da parede. Barras: A, E, I = 50 μm ; B, F, J = 20 μm ; C, D, G, H = 15 μm .

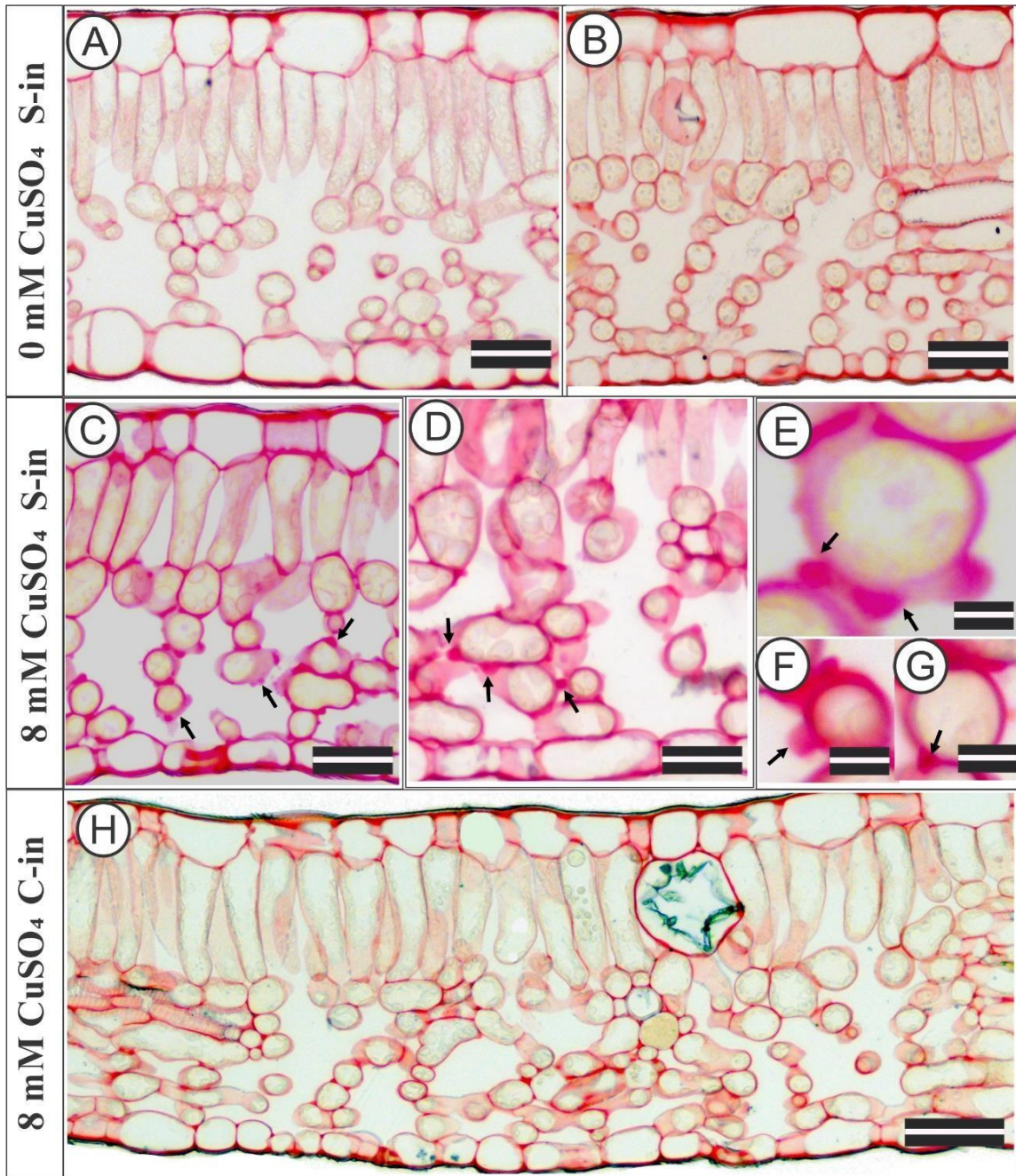


Fig. 3. Teste histoquímico com Vermelho de Rutênio em folíolos de *J. princeps*, sob diferentes concentrações de CuSO₄ sem inóculo: 0 mM de CuSO₄ (A, B); 8 mM (C-G), com protrusões de natureza pécica na parede do parênquima lacunoso. Com inóculo: 8 mM (H), sem deposição de pectinas. Setas: Protrusões pécicas na parede. Barras: A-C = 70 μm; D = 40 μm; E-G = 20 μm; H = 80 μm.

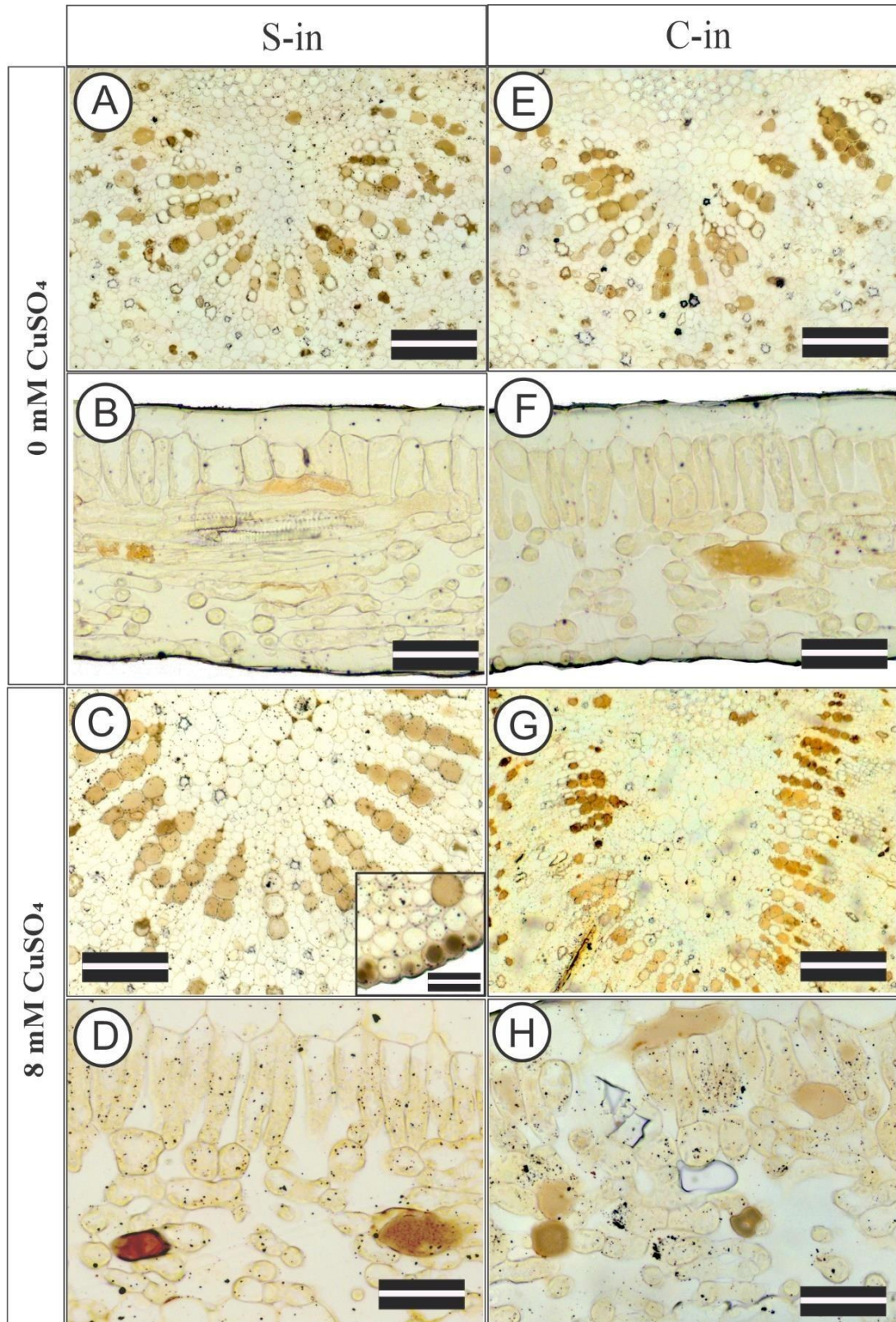


Fig. 4. Teste histoquímico com Cloreto Férrico em folíolos de *J. princeps*, sob diferentes concentrações de CuSO₄ sem inóculo: 0 mM de CuSO₄ (A, B); 8 mM (C), com deposição de compostos fenólicos na epiderme da nervura principal; (D), compostos fenólicos aparente mais densos. Com inóculo: 0 mM de CuSO₄ (E, F); 8 mM (G, H). Barras: A-H = 80 µm; Detalhe C = 30 µm.

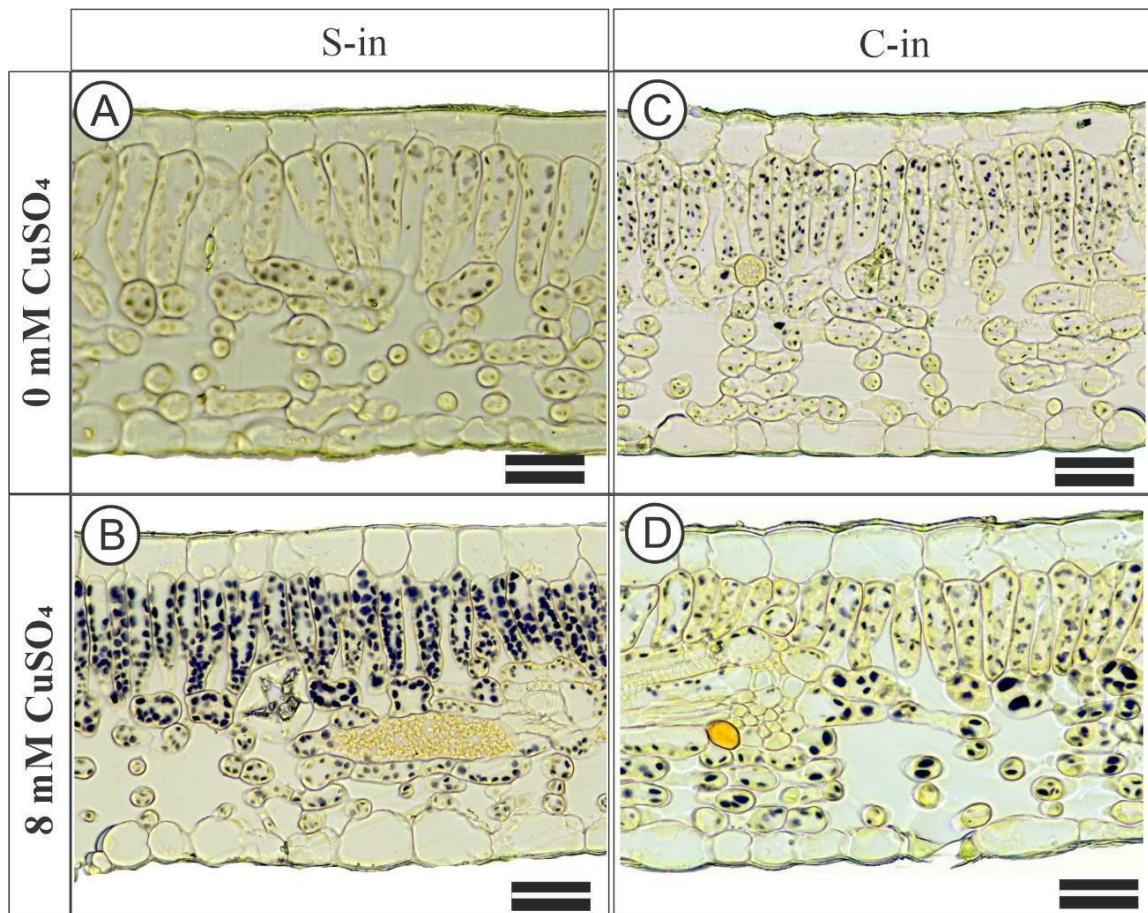


Fig. 5. Teste histoquímico com Lugol em folíolos de *J. princeps*, sob diferentes concentrações de CuSO₄ sem inóculo: 0 mM de CuSO₄ (A); 8 mM (B), com maior densidade e visualmente maior tamanho de grãos de amido nos cloroplastos; com inóculo: 0 mM de CuSO₄ (C); 8 mM (D), sem diferenças aparentes a respeito da concentração de 0 mM de CuSO₄ Barras: A, B, C e D = 25 μm.

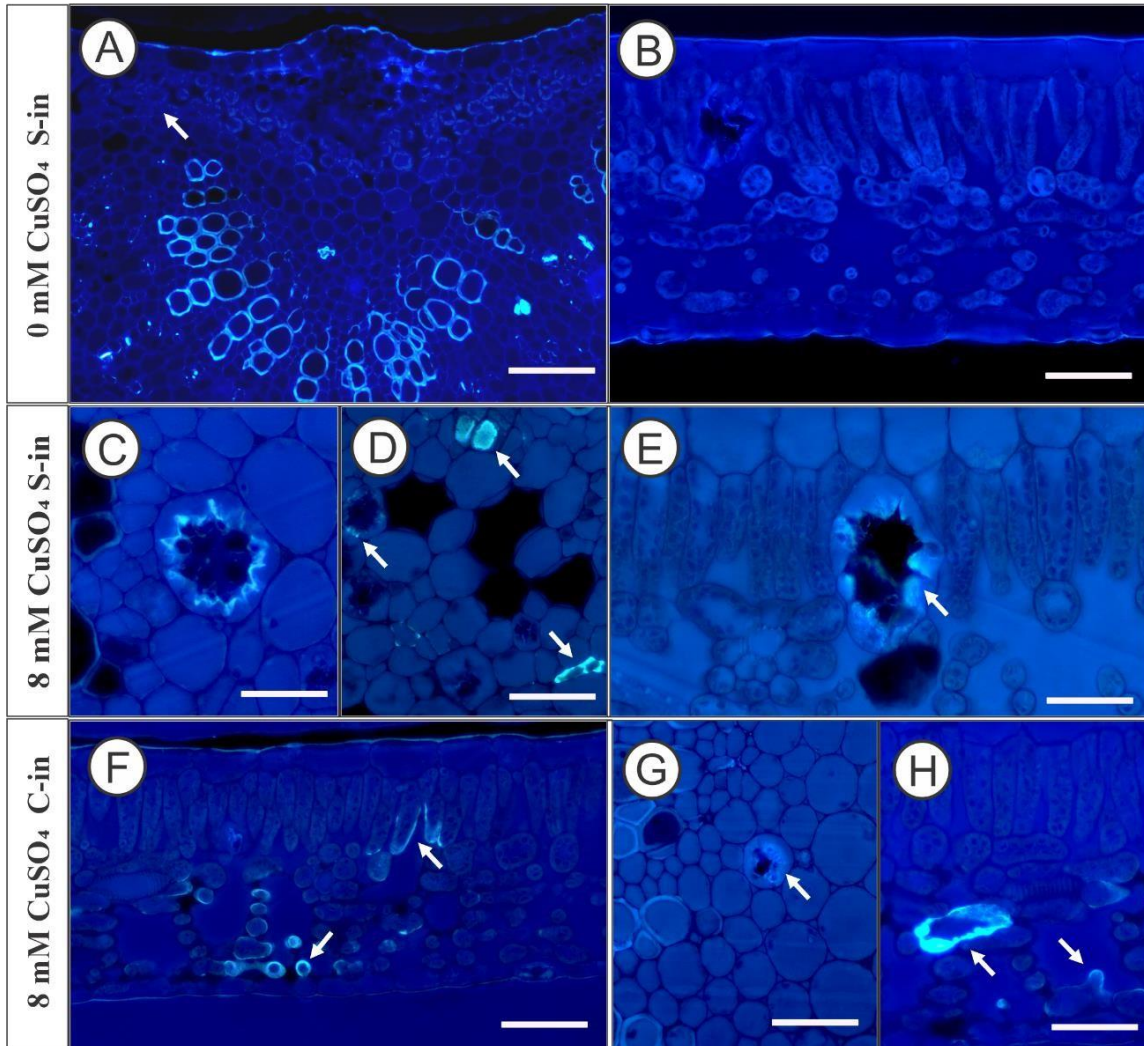


Fig. 6. Teste histoquímico com azul de Anilina em folíolos de *J. princeps*, sob diferentes concentrações de CuSO_4 sem inóculo: 0 mM de CuSO_4 (A-B); 8 mM (C-E), com deposição de calose no envelope da parede os cristais de oxalato de cálcio (C), células do parênquima e placas crivadas (D) e ao redor da bainha da parede dos cristais de oxalato de cálcio na margem das folhas (E). Com inóculo: 8 mM (F-H), com intensa deposição de calose na parede do parênquima paliçádico e lacunoso (F, H) e cristais de oxalato de cálcio (G). Barras: A = 70 μm ; B = 50 μm ; C = 40 μm ; D = 35 μm .

Conclusões Gerais

As respostas na anatomia foliar de *J. princeps* permitiram confirmar que concentrações a partir de 8 mM de CuSO₄, alteraram a configuração do mesófilo, com relação ao engrossamento das paredes, redução aparente dos espaços intercelulares e deslocamento do núcleo da periferia das células do parênquima paliádico. Também, o incremento no teor de cobre, aumentou a deposição de protruções da parede, calose e a densidade de fenóis e grãos de amido, unicamente nas plantas sem inóculo, expostas a 8 mM. A inoculação de FMA nas plantas de *J. princeps*, além de diminuir as alterações anatômicas no tecido foliar, propiciaram a síntese de calose em outras regiões, sugerindo mecanismos celulares ainda desconhecidos que precisam ser dilucidados, para entender a importância da deposição desse composto no mesófilo.

Se encontrou alteração da condutância estomática, transpiração, taxa fotossintética e da eficiência instantânea da carboxilação. O que permite concluir que a partir de 8 mM de CuSO₄, os parâmetros de trocas gasosas foram reduzidos, visto que o engrossamento das paredes das células do mesófilo, podem ter modificado a entrada de CO₂ e alterado a eficiência da carboxilação. No entanto, o inóculo extraído das áreas adjacentes a Mariana, reduziram, o estresse causado nas folhas, e incrementaram o acúmulo de Cu²⁺ na raiz e substrato em 8 mM. Assim, o inóculo de FMA pode ser potencialmente implementado nas áreas impactadas pelos rejeitos de Fundão, para favorecer a redução na translocação de cobre. Entretanto, é necessário aprofundar na atividade enzimática de *J. princeps* frente ao aumento de CuSO₄, para avaliar sua tolerância com altas concentrações de cobre. Por outro lado, isolar os FMA presentes do inóculo pode ser uma estratégia interessante para conhecer a influência de cada um, frene ao incremento de metais potencialmente tóxicos.

Sendo este o primeiro trabalho avaliando os efeitos de metais potencialmente tóxicos sob *J. princeps*, se sugere realizar mais experimentos nesta espécie, focados em entender o papel das drusas e a deposição de calose na imobilização de metais, assim como a atividade enzimática e produção de EROs nas folhas, para entender os mecanismos de tolerância associados. Também, é importante entender sua relação na síntese de fitoquelatinas, devido à correlação significativamente positiva encontrada entre o aumento de Cu²⁺ na parte aérea e S das plantas sem inóculo, para estabelecer a relação de *J. princeps* com altos teores de cobre e outros metais.