

**HENRIQUE NERY CIPRIANI**

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE *Acacia magium* Willd.  
E *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., INOCULADAS COM RIZÓBIO E  
MICORRIZA ARBUSCULAR, SOB EFEITO DE ARSÊNIO**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

**HENRIQUE NERY CIPRIANI**

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE *Acacia magium* Willd.  
E *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., INOCULADAS COM RIZÓBIO E  
MICORRIZA ARBUSCULAR, SOB EFEITO DE ARSÊNIO**

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

APROVADA: 25 de abril de 2011.

---

Profª. Aristéa Alves Azevedo

---

Prof. Igor Rodrigues de Assis

---

Prof. Luiz Eduardo Dias  
(Orientador)

*A Deus, meus pais e minha noiva,  
sempre presentes.*

*“A diferença entre remédio e veneno é apenas a dose.”*

(Paracelso, século XVI)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e à Nossa Senhora, pelo amparo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, por acreditarem em mim.

Ao meu irmão, grande amigo e companheiro.

À minha noiva, pelo carinho.

Ao Departamento de Solos da UFV, pela oportunidade de cursar o Mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG –, pela bolsa de estudos.

Ao Prof. Luiz E. Dias pela confiança, paciência e disposição nos dois anos sob sua orientação.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, em especial à Profa. Aristéa A. Azevedo e à M.Sc. Naiara Campos, pelo grande apoio na condução das análises morfológicas e ensinamentos.

Ao Prof. Maurício D. Costa, à Profa. Catarina M. Kasuya e a todos os estudantes do Laboratório de Associações Micorrízicas da UFV, que tanto me apoiaram nas atividades envolvendo fungos micorrízicos arbusculares.

Ao Dr. Cláudio R. F. S. Soares e ao Departamento de Ciência do Solo da UFLA, pelo envio de amostras de esporos de fungos micorrízicos arbusculares para multiplicação.

Ao Prof. Sidney Stürmer, pela identificação dos esporos de fungos.

À Profa. Kacilda N. Kuki, ao Prof. Fábio M. da Matta, ao M.Sc. Leandro Elias e ao M.Sc. Samuel C. V. Martins, pelos ensinamentos de fisiologia vegetal e pela grande ajuda nas avaliações de trocas gasosas.

A todos os professores e servidores do Departamento de Solos da UFV, pelos ensinamentos e auxílios.

A estudante Roberto J. Gomes, pela paciência e pela grande ajuda prestada durante toda a condução do experimento.

Aos amigos da República “Os Pirigozo”, Samuel, Caio, Franklin, Silvano, Ricardo, Claudinei, Hugo e Maurel pela amizade

Aos amigos do Departamento de Solos da UFV, Paulo Ricardo, Alan Fialho, Marcos Vinícius Locatelli, Adebayo, Igor R. Assis, Sandra Firme e muitos outros aos quais peço desculpas por não me lembrar neste exato momento.

À Sandra Montealegre, Evelyn e Lucas pela amizade e apoio.

Que Deus retribua a todos vocês!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 O arsênio.....	3
2.2 Fitorremediação .....	5
2.3 Fungos micorrízicos arbusculares .....	8
2.3.1 Arsênio e FMAs .....	10
2.4 Fixação biológica de nitrogênio.....	12
2.4.1 Arsênio e rizóbio .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1 Local e período .....	15
3.2 Preparo do substrato .....	15
3.3 Preparo das sementes.....	16
3.4 Preparo dos inóculos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) .....	17
3.5 Condução do experimento .....	17
3.6 Delineamento experimental.....	18
3.7 Avaliações .....	19
3.7.1 Crescimento.....	19
3.7.2 Colonização micorrízica.....	19
3.7.3 Anatomia radicular .....	19
3.7.4 Índice SPAD .....	20
3.7.5 Trocas gasosas .....	20
3.7.6 Análise química de tecido vegetal.....	20
4. RESULTADOS .....	22
4.1 Colonização micorrízica .....	22

4.2 Sintomas visíveis de toxidez.....	22
4.3 Anatomia radicular.....	24
4.4 Crescimento .....	27
4.5 Índice SPAD .....	31
4.6 Trocas gasosas .....	32
4.7 Absorção de As .....	35
4.8 Absorção de P e S .....	38
5. DISCUSSÃO .....	46
6. CONCLUSÕES .....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto geral das plantas ao 120<sup>o</sup> dia de cultivo. Os números correspondem às doses de As ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). .....23
- Figura 2.** Aspecto de plantas de *Mimosa caesalpiniaefolia* com seis semanas de cultivo. A: Planta submetida a  $0 \text{ mg kg}^{-1}$  As. B: Planta submetida a  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  As. ....24
- Figura 3.** Cortes longitudinais de ápices radiculares. A: *Acacia mangium*,  $0 \text{ mg kg}^{-1}$  As. B: *A. mangium*,  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  As. C: *Mimosa caesalpiniaefolia*,  $0 \text{ mg kg}^{-1}$  As. D: *M. caesalpiniaefolia*,  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  As. Barras =  $1 \mu\text{m}$ . .....25
- Figura 4.** Cortes longitudinais de raízes de *Mimosa caesalpiniaefolia* submetida a  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  As. Barras =  $1 \mu\text{m}$ . .....26
- Figura 5.** Corte longitudinal de um fragmento de raiz de *Mimosa caesalpiniaefolia* mostrando um primórdio de raiz lateral crescendo em ângulo aproximadamente reto devido à toxidez de As. Barra =  $1 \mu\text{m}$ . .....26
- Figura 6.** Cortes transversais de raízes. A: *Acacia mangium*,  $0 \text{ mg kg}^{-1}$  As. B: *A. mangium*,  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  As. C: *Mimosa caesalpiniaefolia*,  $0 \text{ mg kg}^{-1}$  As. D: *M. caesalpiniaefolia*,  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  As. Barras =  $1 \mu\text{m}$ . .....27
- Figura 7.** Comprimento de parte aérea (CPA), de raiz (CR) e total (CT) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As (média de duas plantas). MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....29
- Figura 8.** Matéria seca de parte aérea (MSPA), de raiz (MSR) e total (MST) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As (média de duas plantas). .....30
- Figura 9.** Relação raiz/parte aérea (RRPA) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As (média de duas plantas). .....31
- Figura 10.** Índice SPAD de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia*, para os tratamentos com (MIC) e sem micorriza (SMR), em função da dose de As. ....32
- Figura 11.** Relação carbono interno/externo ( $C_i/C_a$ ), eficiência instantânea do uso da água ( $WUE$ ), taxa transpiratória ( $E$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e taxa fotossintética ( $A$ ) de *Acacia mangium* em função da dose de As. ....34
- Figura 12.** Teor de As na parte aérea (AsPA) e na raiz (AsR) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....36

<b>Figura 13.</b> Conteúdo de As na parte aérea (CAsPA), na raiz (CAsR) e total (CAsT) de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....	37
<b>Figura 14.</b> Índice de translocação de As de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....	38
<b>Figura 15.</b> Teor de P na parte aérea (PPA) e na raiz (PR) de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: Sem micorriza. ....	40
<b>Figura 16.</b> Teor de S na parte aérea (SPA) e na raiz (SR) de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....	41
<b>Figura 17.</b> Conteúdo de P na parte aérea (CPPA), na raiz (CPR) e total (CPT) de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....	42
<b>Figura 18.</b> Conteúdo de S na parte aérea (CSPA), na raiz (CSR) e total (CST) de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....	43
<b>Figura 19.</b> Índice de translocação de P (ITP) de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....	44
<b>Figura 20.</b> Índice de translocação de S (ITS) de <i>Acacia mangium</i> e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza. ....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físicas e químicas do substrato antes da aplicação de calcário, de fosfato e dos tratamentos.....	15
<b>Tabela 2.</b> Propriedades químicas do substrato após aplicação de calcário, de fosfato e dos tratamentos.....	16
<b>Tabela 3.</b> Identificação dos tratamentos com base na inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares.....	18
<b>Tabela 4.</b> Valores de F para comprimento relativo de raiz (CRR), de parte aérea (CPAR) e total (CTR), matéria seca relativa de raiz (MSRR), de parte aérea (MSPAR) e total (MSTR) e relação raiz/parte aérea (RRPA). * e **: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.....	28
<b>Tabela 5.</b> Significância dos tratamentos para o índice SPAD. * e **: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente. ....	32
<b>Tabela 6.</b> Significância dos tratamentos para as variáveis de trocas gasosas. <i>C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub></i> : relação gás carbônico interno/externo. <i>E</i> : taxa transpiratória. <i>g<sub>s</sub></i> : condutância estomática. <i>A</i> : taxa fotossintética. <i>WUE</i> : eficiência instantânea do uso da água ( <i>A/E</i> ). * e **: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente. ....	33
<b>Tabela 7.</b> Significância dos tratamentos para os teores de As na raiz (AsR) e na parte aérea (AsPA), para o conteúdo de As na raiz (CAsR), na parte aérea (CAsPA) e total (CAsT), e para o índice de translocação de As (ITAs). * e **: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.....	35
<b>Tabela 8.</b> Significância dos tratamentos para os teores de P e S na raiz (PR e SR) e na parte aérea (PPA e SPA). * e **: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.....	39
<b>Tabela 9.</b> Significância dos tratamentos para o conteúdo de P e S na raiz (CPR e CSR), na parte aérea (CPPA e CSPA), total (CPT e CST) e para os índices de translocação de P e S (ITP e ITS). * e **: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente. ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Taxa fotossintética instantânea
AsPA	Teor de arsênio na parte aérea
AsR	Teor de arsênio na raiz
CAsPA	Conteúdo de arsênio na parte aérea
CAsR	Conteúdo de arsênio na raiz
CAsT	Conteúdo de arsênio total
<i>C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub></i>	Relação CO <sub>2</sub> interno/CO <sub>2</sub> externo
CPA	Comprimento de parte aérea
CPAR	Comprimento de parte aérea relativo
CPPA	Conteúdo de fósforo na parte aérea
CPR	Conteúdo de fósforo na raiz
CPT	Conteúdo de fósforo total
CR	Comprimento de raiz
CRR	Comprimento de raiz relativo
CSPA	Conteúdo de enxofre na parte aérea
CSR	Conteúdo de enxofre na raiz
CST	Conteúdo de enxofre total
CT	Comprimento total
CTR	Comprimento total relativo
<i>E</i>	Taxa evapotranspiratória
FMA <sub>s</sub>	Fungos micorrízicos arbusculares
<i>g<sub>s</sub></i>	Condutância estomática
IT	Índice de translocação
ITAs	Índice de translocação de arsênio
ITP	Índice de translocação de fósforo
ITS	Índice de translocação de enxofre
MIC	Com micorriza e sem rizóbio (tratamento)
MICxRIZ	Com micorriza e rizóbio (tratamento)
MSPA	Matéria seca de parte aérea
MSPAR	Matéria seca de parte aérea relativa
MSR	Matéria seca de raiz
MSRR	Matéria seca de raiz relativa
MST	Matéria seca total
MSTR	Matéria seca total relativa
PPA	Teor de fósforo na parte aérea

PR	Teor de fósforo na raiz
RIZ	Com rizóbio e sem micorriza (tratamento)
RRPA	Relação raiz/parte aérea
SMR	Sem micorriza e rizóbio (tratamento)
SPA	Teor de enxofre na parte aérea
SPAD	<i>Soil Plant Analysis Development</i>
SR	Teor de enxofre na raiz
WUE	Eficiência instantânea do uso da água ( <i>water use efficiency</i> )

## RESUMO

CIPRIANI, Henrique Nery, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011.  
**Respostas morfofisiológicas de plantas de *Acacia mangium* Willd. e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., inoculadas com rizóbio e micorriza arbuscular, sob efeito de arsênio.** Orientador: Luiz Eduardo Dias. Coorientadores: Maurício Dutra Costa e Jaime Wilson Vargas de Mello.

Embora o As possa ser encontrado naturalmente no solo e em rochas, atividades humanas, como a mineração e o uso indiscriminado de agrotóxicos, podem levar ao aumento da concentração de As na superfície. A fitorremediação pode ser uma alternativa para descontaminar solos com elevadas concentrações de As, contudo, sua eficácia depende do estabelecimento, sobre o substrato, de plantas com alta capacidade de absorção do elemento. As leguminosas *Acacia mangium* Willd. e a *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., por sua rusticidade e rápido crescimento, possuem grande potencial para fitorremediação, que pode ser melhor aproveitado com o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio (rizóbio) e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Além do crescimento, respostas morfofisiológicas à toxidez de As podem auxiliar na identificação de espécies tolerantes. Destarte, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas morfofisiológicas de plantas de *A. mangium* e *M. caesalpiniaefolia*, inoculadas com rizóbio e micorriza arbuscular, sob efeito de As. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, utilizando-se vasos com 2,5 kg de um substrato esterilizado por autoclaveagem composto de três partes de um Latossolo Vermelho distrófico e uma parte de areia lavada (v/v) forrados com sacos plásticos. Devido à sua elevada acidez e baixíssimo teor de P, o substrato recebeu calagem (30 dias antes da semeadura) e  $0,30 \text{ g kg}^{-1} \text{ CaHPO}_4$  (nove dias antes da semeadura). O experimento foi montado em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2 \times 5$  completo, com quatro blocos, sendo duas espécies de plantas, dois tratamentos com rizóbio (sem rizóbio e com rizóbio), dois tratamentos com FMAs (sem FMA e com FMA) e cinco doses de arsênio (0, 50, 100, 200 e  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ ). As estirpes de rizóbio foram adquiridas do CNPAB/Embrapa e inoculadas por imersão das sementes em água contendo o inoculante. Os FMAs foram extraídos de solo de mata nativa e inoculados por pipetagem de suspensão ( $\pm 400$  esporos por vaso). O As foi fornecido na forma de solução de  $\text{As}_2\text{O}_3$  com KOH e peróxido de hidrogênio. Aos 90 dias de cultivo, não sendo detetados indícios de nodulação, descartou-se o tratamento com rizóbio e sem micorriza. No mesmo

momento, o tratamento rizóbio + micorriza foi coletado para confecção de lâminas com cortes de fragmentos das raízes para avaliação da anatomia radicular. Aos 120 dias de cultivo as plantas restantes foram coletadas, fotografadas e avaliadas quanto ao comprimento de raiz, parte aérea e total. Em seguida, foram secas em estufa para avaliação da matéria seca de raiz, de parte aérea e total, e moídas para avaliação dos teores de P, S e As na raiz e na parte aérea. As trocas gasosas foram avaliadas por IRGA uma semana antes da coleta do experimento, somente nas plantas de *A. mangium*. O índice SPAD foi avaliado em ambas as espécies no dia da coleta. Os dados foram submetidos à ANOVA e a análise de regressão. Foram observados danos morfofisiológicos às plantas de *A. mangium* e *M. caesalpiniaefolia*, como morte do meristema apical e de primórdios de raízes; mudanças no desenvolvimento das células do sistema vascular; redução do teor de clorofila, evidenciada pelo aparecimento de clorose (em *M. caesalpiniaefolia*) e redução do índice SPAD (em ambas as espécies); e redução de crescimento. Na *A. mangium*, também foi observada redução da taxa fotossintética e da eficiência instantânea do uso da água. De maneira geral, foi observado que, quanto maior a dose de As, menor o teor de P na raiz e na parte aérea e maior o teor de S na raiz. Os teores elevados de As nas raízes de ambas as espécies indicam que elas podem ser eficazes no processo de fitoestabilização de áreas contaminadas com As. Os FMAs reduziram a absorção e o acúmulo de As pelas plantas de ambas as espécies, o que poderia aliviar a toxicidade do elemento, permitindo maior crescimento. Estudos de longa duração são necessários para verificar essa hipótese.

## ABSTRACT

CIPRIANI, Henrique Nery, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2011.  
**Morphophysiological responses of *Acacia mangium* Willd. and *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. inoculated with rhizobia and arbuscular mycorrhiza under effect of arsenic.** Adviser: Luiz Eduardo Dias. Co-advisers: Maurício Dutra Costa and Jaime Wilson Vargas de Mello.

Although As can be naturally found in soil and rocks, human activities like mining and the indiscriminate use of pesticides can lead to increased concentration of this metalloid on surface. Phytoremediation may be an alternative to decontaminate soils with high concentrations of As, however, its effectiveness depends on the establishment of plants with high As-absorption capacity on the substrate. Due to their hardiness and fast growth, the leguminous species *Acacia mangium* Willd. and *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., have great potential for phytoremediation, which can be best availed with the use of nitrogen-fixing bacteria (rhizobia) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Apart from growth, morphophysiological responses may help identifying tolerant species. Thus, the aim of this study was to evaluate the morphophysiological responses of plants of *A. mangium* and *M. caesalpiniaefolia* inoculated with rhizobia and arbuscular mycorrhiza under effect of arsenic. The experiment was carried out in a greenhouse, using pots with 2.5 kg of a steamed substrate composed of three parts of an Oxisol and one part of sand (v/v) lined with plastic bags. Due to its high acidity and very low P content, the substrate received lime (30 days before sowing) and 0,30 g kg<sup>-1</sup> CaHPO<sub>4</sub> (nine days before sowing). The experiment was arranged in a 2 x 2 x 2 x 5 complete factorial with four blocks, being two plant species, two treatments with rhizobia (with and without rhizobia), two treatments with AMF (with and without AMF) and five arsenic rates (0, 50, 100, 200 and 400 mg kg<sup>-1</sup>). The rhizobia strains were acquired from CNPAB/Embrapa and inoculated by the immersion of the seeds in water containing the inoculant. The AMF were extracted from native forest soil and inoculated by suspension pipetting ( $\pm$  400 spores per pot). The As was provided in the form of a solution of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, KOH and hydrogen peroxide. After 90 days of breeding, since no signs of nodulation were detected, the treatment with rhizobium and without mycorrhiza was discarded. At the same time, the mycorrhizae + rhizobia treatment was collected for preparation of slides with fragments of the roots for the evaluation of the root anatomy. After 120 days of breeding the remaining plants were collected, photographed and

evaluated for root, shoot and total lengths. They were then dried in an oven for evaluation of root, shoot and total dry matter, and ground to assess the levels of P, S and As in the root and shoot. Gaseous exchanges were measured by IRGA one week before the collection of the experiment only in plants of *A. mangium*. The SPAD index was evaluated in both species on the collection day. Data were submitted to ANOVA and regression analysis. Morphophysiological damages were observed on plants of *A. mangium* and *M. caesalpiniaefolia*, such as death of the apical meristem and primordia of roots; changes in the development of the vascular system cells; reduction in chlorophyll content, as evidenced by the appearance of chlorosis (on *M. caesalpiniaefolia*) and reduction of the SPAD index (of both species); and reduced growth. In *A. mangium*, a decrease in photosynthetic rate and instantaneous water use efficiency was also observed. Overall, it was observed that the higher the As rate, the lower the P content in root and shoot and the higher the S content in the root. The high levels of As in the roots of both species indicate that they may be effective in phytostabilization of As-contaminated areas. The AMF reduced the absorption and accumulation of As in both species. This could alleviate As toxicity, allowing further growth. Long-term studies are needed to verify this hypothesis.

## 1. INTRODUÇÃO

Embora o As possa ser encontrado naturalmente no solo e em rochas, atividades humanas, como a mineração e o uso indiscriminado de agrotóxicos, podem levar ao aumento da concentração de As na superfície. Em alguns casos, o nível de contaminação pode reduzir a capacidade de estabelecimento da vegetação sobre a área, degradando-a.

Existem muitos métodos para se recuperarem áreas degradadas pela contaminação com As, que vão desde técnicas de engenharia pesada à fitorremediação. Dada a crescente conscientização ambiental da população mundial, a fitorremediação, que consiste no uso de plantas no processo de recuperação da área, tem recebido grande atenção por parte da comunidade científica, empresas e instituições públicas.

Para que a fitorremediação seja eficaz, é necessário, em primeiro lugar, que as espécies a serem plantadas sejam capazes de se estabelecerem na área. É desejável também, que elas consigam absorver grandes quantidades do elemento contaminante. Uma vez absorvido, a disponibilidade do contaminante para outras espécies e a possibilidade de contaminação do lençol freático são reduzidas. Outros benefícios podem ser agregados à fitorremediação, especialmente se as espécies utilizadas puderem ser aproveitadas economicamente.

Nesse sentido, a *Acacia mangium* (acácia) e a *Mimosa caesalpiniaefolia* (sansão-do-campo ou sabiá) tem grande potencial para uso em fitorremediação, pois apresentam rápido crescimento, tolerância a solos pouco férteis e valor econômico. A *A. mangium*, inclusive, é plantada comercialmente em diversos países e é conhecida por sua madeira de qualidade, que é usada para fabricação de móveis, dentre outras finalidades. Além de ser uma planta vistosa, sendo muito utilizada como cerca viva, a madeira de *M. caesalpiniaefolia* pode ser usada para energia e produção de mourões.

Por serem leguminosas capazes de se associarem a bactérias fixadoras de nitrogênio, genericamente conhecidas como rizóbio, a *A. mangium* e a *M. caesalpiniaefolia* possuem vantagens que podem beneficiar o processo de fitorremediação. Além de possuírem menor dependência de fertilização nitrogenada, o nitrogênio fixado biologicamente costuma exceder a demanda da planta, sendo liberado no solo, tornando-se disponível para outras plantas e, também, microrganismos.

Visando promover ainda mais o estabelecimento das plantas na área degradada, pode-se tirar proveito de outra associação simbiótica, encontrada na grande maioria das

plantas terrestres: a micorriza arbuscular. Nesse tipo de associação, fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) colonizam as raízes da planta hospedeira que, em troca do fornecimento de hidrocarbonetos para o fungo, recebem nutrientes minerais, notadamente P, um nutriente frequentemente escasso em solos tropicais.

Quando utilizadas em conjunto, a inoculação com rizóbio e FMAs, embora representem grande demanda de hidrocarbonetos, normalmente atuam em sinergia, promovendo o crescimento da planta hospedeira. Poucos estudos, no entanto, são feitos avaliando-se os efeitos da associação simultânea de rizóbio e FMAs no crescimento de plantas cultivadas em substrato contaminado com As.

Visando sua aplicação em áreas contaminadas com As, para melhor avaliar os efeitos da inoculação conjunta de FMAs e rizóbio no processo de fitorremediação, é necessário avaliar, além do crescimento e da absorção de As pela planta hospedeira, alterações morfofisiológicas, como a anatomia radicular e a taxa fotossintética. Essas variáveis têm influência direta na capacidade de fixação de carbono pela planta e de seu estabelecimento na área contaminada.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar alterações morfofisiológicas em *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia*, inoculadas com rizóbio e micorriza arbuscular, sob efeito de arsênio.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O arsênio

Trigésimo terceiro membro da tabela periódica, pertencente ao grupo 15, o arsênio é classificado como metaloide (ou semimetal) por possuir aparência física e propriedades de um metal porém comportar-se quimicamente como ametal (Atkins & Jones, 1997). A massa atômica do isótopo mais estável é de 74,92 u e sua densidade é de 5,72 kg dm<sup>-3</sup>, sendo muitas vezes referido como um “metal pesado” de acordo com algumas definições para o termo (Wolfram Alpha, 2009; para uma discussão sobre a aplicabilidade do termo, ver IUPAC, 2002). É o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre, 14º nos oceanos e 12º no corpo humano (Woolson, 1975).

Em alguns animais, como ratos, porquinhos-da-índia, cabras e galinhas, o arsênio desempenha alguma função no metabolismo da metionina, sendo que a suplementação de As parece apresentar efeito estimulante do crescimento mesmo em doses muito elevadas (NRC, 1999). Elevada ingestão de arsênio é tóxica e pode provocar náusea, vômito e diarreia, sendo que doses superiores a 2 g pode levar uma pessoa a óbito pouco tempo após a contaminação (DHS, 2002). A exposição crônica ao As pode promover o surgimento de diversas enfermidades, incluindo vários tipos de câncer, alterações na pigmentação da pele, hiperqueratose e danos aos sistemas nervoso e reprodutivo (Mandal & Suzuki, 2002; Capitani, 2007; Vahidnia et al., 2007).

As formas inorgânicas do arsênio, As<sup>3+</sup> e As<sup>5+</sup>, são as mais comuns e ocorrem como oxianions arsenito (AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup>) e arsenato (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), frequentemente identificadas pelo número de oxidação, As(III) e As(V), respectivamente. A ocorrência relativa dessas formas é função do pH e do potencial (Eh) do meio (Masscheleyn et al., 1991). O arsenato predomina em ambientes sem limitações de oxigênio, sendo fortemente adsorvido à fração argila do solo, bem como a oxi-hidróxidos de ferro, manganês, alumínio e à matéria orgânica. Por sua vez, o arsenito é a forma mais estável sob condições redutoras. Em geral, o As(III) é adsorvido com menor intensidade às partículas do solo, sendo considerado mais solúvel, móvel e tóxico que o As(V) (Mandal & Suzuki, 2002; Grossl et al., 2004).

As formas orgânicas do arsênio são formadas a partir da metilação de compostos inorgânicos de As por microrganismos, produzindo, em condições oxidantes, ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) e óxido de trimetilarsina

(TMA<sub>2</sub>O) (Reichert & Trelles, 1921). Essas formas são consideradas menos tóxicas que as inorgânicas e seu comportamento no solo é similar a estas, sendo que, quanto maior o grau de metilação, menor a adsorção às partículas (Litter et al., 2008). Em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, as formas orgânicas de arsênio são degradadas novamente a As inorgânico por bactérias anaeróbicas obrigatórias e facultativas (Hasegawa, 1997).

O arsênio ocorre naturalmente em mais de 200 minerais, dos quais 60 % são arsenatos, 20 % sulfetos e sulfossais e o restante inclui arsenetos, arsenitos, óxidos, silicatos e arsênio elemental. Esses minerais são frequentemente encontrados em depósitos metalíferos, sendo a arsenopirita (FeAsS) o mais comum (Mandal & Suzuki, 2002). Os sulfetos podem ser oxidados quando expostos à atmosfera (em minerações, por exemplo), produzindo soluções ácidas ricas em sulfatos de ferro hidrossolúveis que podem ser lixiviadas, mobilizando elementos químicos tóxicos (como o As) presentes no meio, causando acidificação e contaminação do solo, de cursos d'água e do lençol freático, fenômeno conhecido como “drenagem ácida” (Mello et al., 2003).

Os níveis de arsênio nos solos e na água variam grandemente entre regiões geográficas e são determinados principalmente pela composição das rochas que deram origem aos solos e que estão próximas às fontes de água (Mandal & Suzuki, 2002; Litter et al., 2008). Solos descontaminados normalmente possuem de 1 a 40 mg kg<sup>-1</sup> de As, sendo que solos arenosos e derivados de granitos apresentam menores teores que solos argilosos aluviais e orgânicos (Kabata-Pendias & Pendias, 1984). A concentração de As nas águas é naturalmente baixa (1-10 µg L<sup>-1</sup>), sendo maior nos oceanos e águas subterrâneas do que em rios e lagos (Mandal & Suzuki, 2002; Litter et al., 2008).

Em áreas próximas a minerações, no entanto, a concentração de As na água pode variar entre 100 e 5.000 µg L<sup>-1</sup> (Harrington et al., 1978), ou seja, 500 vezes o teor recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001). Mesmo no Brasil, onde o clima tropical muito úmido e os elevados teores de Fe e Al nos solos previnem o acúmulo de As nos aquíferos, em algumas regiões, como o Quadrilátero Ferrífero (MG), os teores de As nas águas subterrâneas encontram-se bem acima do limite recomendado devido à proximidade de minerações e depósitos de estéril (Bundschuh et al., 2008).

Áreas degradadas pela contaminação com arsênio, como pilhas de rejeito de mineração ou antigos pátios de secagem de madeira tratada, devem ser recuperadas para que possam ser novamente utilizadas. Preferencialmente, essa recuperação deve ser feita

através de métodos de baixo custo e ambientalmente compatíveis, proporcionando outros benefícios, além da descontaminação do solo.

## 2.2 Fitorremediação

Os métodos tradicionais de remediação de solo baseiam-se em técnicas de engenharia pesada, como escavação, remoção e lavagem, encapsulamento ou contenção *in situ*, e estabilização química. Entretanto, esses métodos costumam ser onerosos, além de possuírem baixa “sensibilidade ecológica”, o que tem levado à necessidade de se desenvolverem projetos de baixo custo, sustentáveis e ecologicamente corretos (Pulford & Dickinson, 2005). Nesse contexto, a fitorremediação pode ser uma alternativa para o problema (Salt et al., 1998; Pulford & Watson, 2003; Ball, 2005; Pulford & Dickinson, 2005).

Fitorremediação é definida como o uso de plantas para remover contaminantes do ambiente ou torná-los inofensivos (Salt et al., 1998), podendo ser dividida em cinco grupos principais (Pulford & Watson, 2003):

- Fitoextração: plantas removem metais do solo e os acumulam em suas partes coletáveis (Kumar et al., 1995; Nascimento et al., 2009).
- Fitodegradação: plantas e microorganismos associados degradam contaminantes orgânicos (Burken & Schnoor, 1997).
- Rizofiltração: as raízes das plantas absorvem metais de efluentes (Dushenkov et al., 1995).
- Fitoestabilização: plantas reduzem a mobilidade e biodisponibilidade de contaminantes no ambiente por imobilização ou prevenindo sua migração (Smith & Bradshaw, 1972; Vangronsveld et al., 1995).
- Fitovolatilização: volatilização de contaminantes para a atmosfera via plantas (Bañuelos et al., 1997; Burken & Schnoor, 1999).

No caso do arsênio, a fitoextração e a fitoestabilização parecem ser as técnicas mais aplicáveis na recuperação de sítios contaminados. No entanto, há dificuldade em se encontrarem espécies adequadas para esse fim devido à toxicidade do arsênio às plantas.

O arsenato é facilmente absorvido pelos vegetais devido à sua similaridade com o fosfato. Esses ânions competem entre si não só por sítios de ligação nas enzimas transportadoras das raízes (Asher & Reay, 1979; Meharg & Macnair, 1991; Wang et al., 2002), mas também por sítios de adsorção nas partículas do solo (Peryea, 1991; Smith et al., 1998), resultando em controversas interações entre ambos em relação à

disponibilidade e aquisição pela planta (Cao et al., 2003; Tu & Ma, 2003; Caille et al., 2004). Recentemente, em estudos como os de Christophersen et al. (2009), trabalhando com *Medicago truncatula* e cevada, e Gunes et al. (2009), em experimento com grão-de-bico, não foram encontradas evidências de inibição competitiva entre arsenato e fosfato, realçando ainda mais a complexidade da interação entre As e P durante a absorção pela planta.

A similaridade entre o arsenato e o fosfato também se manifesta no metabolismo dos vegetais. Na via glicolítica, o arsenato pode substituir o fosfato, interferindo na fosforilação oxidativa pela produção de um éster-arsenato de ADP, que é instável e sofre hidrólise de forma não enzimática, processo conhecido como arsenólise (Aposhian, 1989). Dessa forma, não há produção de ATP e a planta é privada de sua fonte de energia.

O arsenito, por sua vez, não compete tão fortemente com o fósforo, tendo maior mobilidade no solo. Seus efeitos fitotóxicos também são diferentes. O arsenito tem alta afinidade por grupos sulfidrílicos presentes nos aminoácidos como a cisteína, desativando, assim, muitas enzimas envolvidas em processos metabólicos intermediários (Ehrlich, 1990). Da mesma forma, ao se ligar a grupos sulfidrílicos, o arsenito pode destruir a membrana das células radiculares, afetando a absorção de água e nutrientes (Carbonell-Barrachina et al., 1994).

Recentemente, uma importante descoberta revelou que o arsênio pode substituir o fósforo na molécula de DNA. Wolfe-Simon et al. (2010) analisaram a composição de bactérias isoladas de um lago vulcânico da Califórnia (*Mono Lake*) e verificaram a presença de arsenato, não de fosfato, em macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas. Além disso, quando cultivadas em meio sem P, as bactérias eram capazes de metabolizar As para sustentar, de forma relativamente eficiente, seu crescimento (Wolfe-Simon et al., 2010). Essa descoberta cria novas perspectivas para estudos sobre a origem e a evolução da vida e sobre a interação P x As nos seres vivos. No entanto, para a maioria dos seres vivos, o As tem efeito clastogênico e compromete o crescimento e a diferenciação dos tecidos.

Apesar da toxicidade, várias espécies de samambaias (Ma et al., 2001; Francesconi et al., 2002; Visoottiviseth et al., 2002; Zhao et al., 2002) e de outros grupos de plantas (DeKoe, 1994; Meharg, 2003) têm sido apontadas como capazes de acumular arsênio acima do teor disponível no solo (hiperacumuladoras), possuindo, portanto, potencial para fitoextração.

Entretanto, estudos como os realizados por Salido et al. (2003) e Kertulis-Tartar et al. (2006) indicam que o processo de fitoextração de arsênio pode ser demorado, mesmo para espécies com grande potencial de acumulação e de rápido crescimento. Em áreas muito contaminadas e nas quais há risco de transferência do As acumulado na parte aérea das plantas para a cadeia alimentar, a fitoestabilização parece ser a alternativa de recuperação mais adequada.

Muitas espécies adequadas à fitoestabilização de arsênio vêm sendo identificadas (Madejón et al., 2004; French et al., 2006; Vazquez et al., 2006; Tlustoš et al., 2007; King et al., 2008; Melo et al., 2009; Dias et al., 2010; Melo et al., 2010). A maioria dessas espécies são arbóreas, proporcionando alguns benefícios adicionais para uso em áreas degradadas, como: elevada biomassa, variabilidade genética, valor econômico, aceitação pública e estabilização do sítio (Pulford & Dickinson, 2005). Esses benefícios podem ser mais bem aproveitados através da utilização de leguminosas de rápido crescimento e múltiplo uso, como *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. e *Acacia mangium* Willd..

*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. é uma fabácea de ocorrência natural no Norte e no Nordeste brasileiro, onde é conhecida como sabiá e muito utilizada para a produção de estacas, carvão e lenha. Sua folhagem e frutos são considerados uma valiosa fonte de alimento para grandes e pequenos ruminantes, especialmente no período seco. Na região Sudeste, é conhecida como sansão-do-campo e é muito usada como cerca-viva devido à beleza e à presença de espinhos. É uma árvore relativamente muito produtiva, de rápido crescimento e fácil manejo (Ribaski et al., 2003).

*Acacia mangium* Willd. é uma fabácea arbórea de crescimento rápido originária da Oceania e do sudeste asiático mas que se adaptou muito bem às condições climáticas brasileiras. É muito utilizada na revegetação de áreas degradadas devido à sua tolerância a solos inférteis e ácidos, elevada produção de serrapilheira e capacidade de fixação de nitrogênio. Também pode ser explorada comercialmente para fabricação de polpa de celulose, moirões de cerca, estacas para a construção civil e carvão, entre outros fins (Marto, 2007).

As espécies citadas possuem a vantagem de se associarem a bactérias fixadoras de nitrogênio e a fungos micorrízicos arbusculares, que proporcionam melhores condições para seu desenvolvimento, entre outros benefícios para o processo de recuperação da área degradada como um todo (Dodd, 1999; Franco & Balieiro, 1999).

### 2.3 Fungos micorrízicos arbusculares

Associações micorrízicas são relações simbióticas que se formam entre as raízes das plantas e fungos do solo. Essa simbiose é caracterizada pelo movimento bidirecional de nutrientes, no qual fluem compostos orgânicos (carboidratos) para o fungo e nutrientes minerais para a planta. Em solos pouco férteis, os nutrientes absorvidos pelos fungos micorrízicos podem promover o crescimento e a produtividades dos vegetais. Como resultado, plantas que se associam a esses fungos normalmente são mais competitivas e mais aptas a tolerar estresses ambientais do que plantas não micorrízicas (Sylvia, 2005).

As raízes da maior parte das plantas de solo são micorrízicas, sendo que 83 % das dicotiledôneas, 79 % das monocotiledôneas e todas as gimnospermas formam associações com fungos micorrízicos (Wilcox, 1991). Essas associações variam grandemente quanto à forma e à função (Sylvia, 2005), mas as associações do tipo vesículo-arbuscular são o tipo mais comum (Harley & Harley, 1987) e desempenham papel vital para a sustentabilidade da agricultura em regiões tropicais, com impacto na estrutura de comunidades vegetais e no dreno de carbono atmosférico, possuindo grande potencial biotecnológico (Berbara et al., 2006).

As micorrizas vesículo-arbusculares caracterizam-se pela formação de um haustório extremamente ramificado, semelhante a pequenas árvores (arbúsculos), no interior das células do córtex radicular (endomicorrizas), mas sem penetrar a membrana plasmática, e pelo micélio que se prolifera no solo (hifa externa ou extrarradicular). Os arbúsculos são o principal sítio de troca de solutos entre o fungo e o hospedeiro, mas possuem vida curta (inferior a 15 dias), podendo ser de difícil visualização em amostras coletadas diretamente no campo.

As vesículas são estruturas ricas em lipídios que normalmente se formam nos espaços intercelulares cuja principal função é, supostamente, de reserva. Entretanto, nem todos os fungos endomicorrízicos formam vesículas. Por isso, atualmente, a literatura refere-se às micorrizas vesículo-arbusculares simplesmente por arbusculares. Os principais gêneros de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são: *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Sclerocystis* e *Glomus*, sendo este o mais abundante (Lamont, 1982).

A inoculação de FMAs pode trazer vários benefícios para o processo de revegetação de áreas degradadas. Dentre eles, o mais reportado é a melhoria do estado nutricional da planta hospedeira pelo aumento da absorção de nutrientes, especialmente os de baixa mobilidade no solo, como Cu, P e Zn (Marschner, 1995). Esse efeito pode ser atribuído

ao aumento do volume do solo explorado pelas hifas extrarradiculares que, somado ao seu pequeno diâmetro (1-12  $\mu\text{m}$ ), permite a exploração de espaços fora do alcance da raiz, além de alterações químicas que os exsudados micorrízicos promovem na rizosfera, solubilizando elementos minerais.

Adicionalmente, em relação ao fósforo, os FMAs podem armazenar o nutriente em períodos de alta disponibilidade na forma de polifosfatos, fornecendo-o para a planta em condições de déficit (Berbara et al., 2006). Os FMAs também produzem fosfatases, fazendo com que a planta hospedeira tenha acesso ao fósforo ligado a compostos orgânicos (Tarafdar & Marschner, 1994). Plantas inoculadas com FMAs, portanto, normalmente requerem menores quantidades de adubação fosfatada (Bagyaraj & Sreelamulu, 1982; Medina et al, 1990), algo particularmente interessante para sistemas de manejo pouco intensivo (Douds et al., 1993), como é frequentemente o caso de revegetação de áreas degradadas.

As hifas dos fungos micorrízicos arbusculares também podem interligar as raízes de diferentes plantas dentro de uma comunidade, funcionando como ponte para a troca de nutrientes entre elas (Newman, 1988). Isso é de interesse especial para o processo de revegetação de áreas degradadas, visto que há possibilidade de transferência de nitrogênio de leguminosas fixadoras para plantas não fixadoras, quando cultivadas em consórcio (Marschner, 1995; Cruz & Martins, 1997; Rodrigues et al., 2003). Em leguminosas cultivadas em solos deficientes de fósforo, os FMAs promovem a nodulação, a fixação de  $\text{N}_2$  e o crescimento da planta hospedeira (Marschner, 1995), como observado em *sansão-do-campo* por Burtity et al. (2000), mostrando o potencial da associação entre FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio.

Os fungos micorrízico arbusculares também melhoram, indiretamente, as relações hídricas da planta e do solo (Marschner, 1995). Esse benefício está associado ao melhor estado nutricional do hospedeiro e a mudanças na morfologia da raiz estimuladas pelos FMAs (Marschner, 1995). Além disso, as hifas dos FMAs melhoram a agregação do solo (Tisdall, 1994; Wright & Upadhyaya, 1998), aumentando sua capacidade de retenção de água.

A tolerância das plantas a metais pesados também é influenciada pelos FMAs (Siqueira et al., 1999; Soares, 2004). Dentre os benefícios dos FMAs para as plantas, em relação aos metais pesados, encontram-se: retenção dos metais pela adsorção à parede celular do micélio do fungo ou fixação em grânulos de polifosfato (Galli et al., 1994); restrição da translocação para a parte aérea (Leyval et al., 1997); e minimização dos

efeitos fitotóxicos devido à melhoria do estado nutricional do hospedeiro (Leyval et al., 1997; Christie et al., 2004). González-Chávez et al. (2004) observaram que a glomalina, uma glicoproteína hidrofóbica produzida em grande quantidade pelos FMAs, também pode contribuir para a remediação de solos contaminados, pois é capaz de adsorver metais pesados, reduzindo sua mobilidade no solo.

De fato, o caráter ubíquo dos fungos micorrízicos e os benefícios proporcionados por eles, não só para a planta hospedeira, mas para o solo e outros microrganismos, são tão importantes que, recentemente, foi proposto o termo “micorriorremediação”, enaltecendo o papel das micorrizas nos processos de fitorremediação de solos degradados (Khan, 2006).

Em geral, os FMAs também aumentam a tolerância do hospedeiro ao arsênio, mas os efeitos da micorriza na absorção e translocação de As podem diferir dos metais pesados devido à competição entre o fosfato e o arsenato no solo e na planta e à influência dos FMAs na absorção de P. Assim, diversas interações entre os fungos e o As podem ocorrer, com reflexo no crescimento, na nutrição e no acúmulo do metaloide pela planta hospedeira (Trotta et al., 2006; Dong et al., 2008; Jankong & Visoottiviseth, 2008; Arriagada et al., 2009; Liu et al., 2009).

### **2.3.1 Arsênio e FMAs**

Propágulos viáveis de fungos micorrízicos arbusculares são encontrados em solos contaminados por arsênio (Meharg et al., 1994; Meharg & Cairney, 2000; Leung et al., 2005). Não obstante, propágulos comerciais também são utilizados satisfatoriamente em experimentos envolvendo As e FMAs (Trotta et al., 2006; Jankong & Visoottiviseth, 2008), mostrando que os FMAs são, em geral, resistentes à exposição pouco prolongada ao metaloide.

Em revisão sobre a influência do arsênio nos FMAs, Smith et al. (2010) observaram que os dados referentes à porcentagem de colonização micorrízica de muitos experimentos são controversos porque o maior ou menor crescimento das raízes (e não das hifas) interfere nos resultados. Assim, muitos experimentos mostram aumento de colonização, enquanto outros resultam em decréscimo, não necessariamente devido ao efeito tóxico do As nos fungos. Contudo, parece claro que o As, isoladamente, não elimina a colonização e que, portanto, os FMAs desempenham papel importante no crescimento de plantas em solos contaminados pelo metaloide (Smith et al., 2010).

A despeito da presença de micorrizas, a absorção direta (pelas raízes) de P e As ainda ocorre. No caso do fósforo, acredita-se que a absorção direta do nutriente não seja afetada pela presença de FMAs (Smith et al., 2001), ocorrendo paralelamente à absorção pelas hifas (Marschner, 1995). A questão é se essa suposição seria igualmente válida para o As(V), devido à sua analogia com o fosfato.

Embora o transporte de P pelas hifas não esteja completamente esclarecido, é bem provável que envolva o movimento de moléculas de polifosfato de sítios de absorção de P para sítios de degradação dessas moléculas e posterior transferência para as células da planta hospedeira (Ezawa et al., 2002). Smith et al. (2010) ressaltam que, caso exista transporte de As(V) pelas hifas, não haveria formação de poliarsenato devido à inerente instabilidade desse composto, diferindo, portanto, do mecanismo de translocação de P.

Com base em resultados de diversos estudos envolvendo As e FMAs, que mostram, em geral, maior tolerância ao arsênio e maior relação P/As nas plantas infectadas, Smith et al. (2010) formularam algumas hipóteses para explicar esses efeitos: 1) a absorção de As pela via direta não é influenciada pelos FMAs, mas a maior absorção de P pela via fúngica, que não ocorre (ou ocorre muito pouco) para o As, resulta em maior relação P/As; ou 2) a absorção de As pela via direta é reduzida na presença de FMAs devido a mudanças na expressão de genes que resultariam em menor absorção de P e, conseqüentemente, menor absorção de As pela via direta (assumindo que os transportadores de P e As sejam os mesmos) sem, contudo, alterar a absorção pela via fúngica, ou resultariam em maior especificidade na absorção de fósforo, excluindo o arsênio. Os mesmos autores sugerem que o As(V) absorvido pelos fungos pode ser retido nas hifas, ou até ser reduzido a As(III) e, então, expelido para a solução do solo.

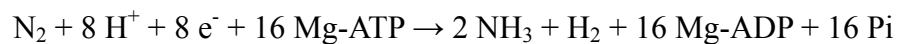
Recentemente, Liu et al. (2009), avaliaram os efeitos de micorriza arbuscular no crescimento e no acúmulo de As por *Pteris vittata*. Em experimento com vasos geminados, que incluía tratamentos onde porções diferentes do sistema radicular eram inoculadas com *Glomus mosseae*, os pesquisadores verificaram que, quando o As e a micorriza encontravam-se no mesmo compartimento, a absorção de As foi maior, indicando que, possivelmente, o fungo contribuiu diretamente para a absorção do elemento.

De fato, os efeitos dos FMAs na absorção de arsênio variam conforme as condições experimentais e com as espécies de fungos e plantas utilizadas por causa da complexidade envolvida nos mecanismos de controle da absorção e translocação de As (Liu et al., 2009; Zhao et al., 2009; Smith et al., 2010). É nítida a carência de estudos

mais aprofundados a respeito dos mecanismos de tolerância dos FMAs e dos vegetais ao arsênio, bem como os de absorção e transporte do elemento pelas hifas e sua distribuição pela planta hospedeira.

#### **2.4 Fixação biológica de nitrogênio**

Fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo de redução de N<sub>2</sub> atmosférico a NH<sub>3</sub> realizado por organismos procariotos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, podendo ser resumido na seguinte equação (Zuberer, 2005):



É considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese, sendo a principal forma de transferência de nitrogênio para o solo e os seres vivos (Galloway et al., 2004). Os microrganismos fixadores de nitrogênio podem ser de vida livre ou estar associados às plantas, em diversos tipos de associações que variam de acordo com a estrutura, espécie vegetal e microbiana, e localização do microrganismo. Nesta revisão será abordada somente a associação simbiótica, mais pertinente ao projeto em questão. Para maiores informações sobre os outros tipos de associações podem ser consultados os trabalhos de Moreira & Siqueira (2002), Zuberer (2005) e Reis et al. (2006).

Assim como a simbiose com fungos micorrízicos, a associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio é uma relação de dupla troca com benefícios para os microrganismos e a planta hospedeira. Este tipo de associação caracteriza-se pela formação de uma estrutura na raiz, denominada nódulo, capaz de abrigar as bactérias fixadoras, na qual as condições para a fixação de nitrogênio e troca de substâncias entre o simbionte e o hospedeiro são otimizadas.

No mecanismo de infecção mais comum, inicialmente, a planta libera uma variedade de compostos químicos (isoflavonoides e flavonoides) das células radiculares para o solo, que são responsáveis pelo reconhecimento do hospedeiro pela bactéria, permitem a adesão do procarioto à superfície dos pelos radiculares e estimulam a multiplicação dos microrganismos. Em seguida, as bactérias secretam fatores nod (lipoquitoligossacarídeos), substâncias que estimulam a divisão de células radiculares que as envolvem, formando os nódulos, verdadeiros “pacotes” de bactérias. Após a infecção da raiz pelas bactérias, os nódulos se tornam visíveis em, aproximadamente, uma semana (Reis et al., 2006).

Os nódulos podem ser de crescimento determinado, de formato circular clássico, comuns em soja e feijão, ou indeterminado, no qual o centro responsável pela fixação biológica muda conforme novos tecidos são formados, assemelhando-se a arbúsculos, sendo comumente encontrados em espécies arbóreas, em especial da subfamília Mimosoideae (Faria et al., 1999; Reis et al., 2006). O local de infecção também pode variar. Em trevo e feijão, por exemplo, a penetração ocorre nos pelos radiculares com formação de tubos de infecção, enquanto em sesbânia, a bactéria penetra o primórdio radicular de raízes adventícias, localizado no caule (Graham, 2005).

A associação simbiótica mais significativa é a que ocorre entre bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (denominadas simplificadaamente de rizóbio) com leguminosas. Nos nódulos, as bactérias encontram um ambiente com baixa pressão de O<sub>2</sub> (favorecendo a atividade da nitrogenase), estão livres da competição com outros organismos do solo e recebem, da planta, grande suprimento de carboidratos para suas atividades. Em compensação, fornecem para a planta, todo NH<sub>3</sub> produzido em excesso.

A contribuição relativa da fixação biológica de nitrogênio para a nutrição da comunidade vegetal é muito variável em função das espécies de plantas e bactérias envolvidas, bem como do tipo de solo e manejo (Franco & Balieiro, 1999; Schipanski et al., 2010). Normalmente, a contribuição é maior para os ecossistemas florestais e menor para sistemas de cultivo muito intensivos, com grande aporte de fertilizantes minerais (Zuberer, 2005).

Atualmente, a FBN é vista como uma alternativa (ou suplemento) aos fertilizantes nitrogenados. Somente para exemplificar, nos Estados Unidos, cerca de 50 a 60 % do N utilizado na produção de soja é proveniente de fixação biológica (Salvagiotti et al., 2008), enquanto no Brasil a maior parte dos cultivos dessa leguminosa dispensa completamente a adubação mineral nitrogenada (Cantarella, 2007). Isso representa não somente ganho financeiro, visto que o custo de produção da cultura é reduzido, mas também ambiental, pois reduz-se a necessidade de fontes de N artificiais.

No contexto de revegetação de áreas degradadas, a FBN assume grande importância. A elevada capacidade de fixação de espécies arbóreas nativas, associadas ao seu ciclo de vida relativamente longo, faz das leguminosas fixadoras de N uma excelente forma de economia de insumos e enriquecimento do solo ou substrato com N, além de favorecerem o processo de sucessão vegetal e serem, normalmente, mais tolerantes a ambientes degradados (Campello, 1998; Franco & Balieiro, 1999; Freitas et al., 2010; Mendes Filho et al., 2010).

### 2.4.1 Arsênio e rizóbio

Microrganismos fixadores de nitrogênio podem ser encontrados em uma enorme diversidade de ambientes, tanto em vida livre, como associados a plantas e fungos (Zuberer et al., 2005), incluindo locais contaminados por arsênio (Macur et al., 2001; Carrasco et al., 2005). Leguminosas espontâneas também são encontradas nesses ambientes (Carrasco et al., 2005) o que tem despertado o interesse pelo uso de leguminosas fixadoras de nitrogênio na fitorremediação de solos contaminados por As.

Estudos mostram que o tempo de nodulação e o número de nódulos são bastante prejudicados na presença de As mas, pelo menos em níveis de contaminação moderados, a nodulação e a FBN ainda ocorrem (Carrasco et al., 2005; Reichman, 2007; Pajuelo et al., 2008). Além disso, como observado para soja, por Reichman (2007), apesar de reduzido, o crescimento da planta nodulada ainda pode ser maior do que da planta sem rizóbio.

Os efeitos negativos do As observados na nodulação normalmente se devem à toxidez do elemento para a planta, não para o microrganismo, visto que eles são capazes de reduzir grande parte do As(V) a As(III), expelindo-o para fora da célula (Yang et al., 2005). As plantas, em compensação, tem o desenvolvimento radicular fortemente prejudicado, reduzindo a possibilidade de infecção (Pajuelo et al., 2008). Curiosamente, o As parece não ter efeito direto sobre a atividade da nitrogenase (Carrasco et al., 2005), ou seja, o número de nódulos é reduzido, mas eles continuam ativos (Pajuelo et al., 2008).

A despeito da carência de estudos sobre as leguminosas arbóreas noduladas cultivadas em solos contaminados por arsênio, não se pode descartar o potencial dessas espécies na fitorremediação desses solos pois, além da fitoestabilização, as leguminosas arbóreas ainda podem servir de fonte de N para outras plantas cultivadas em consórcio ou rotação. Alguns autores sugerem ainda que os nódulos podem acumular grandes quantidades de metais pesados (Sriprang et al., 2002; Ike et al., 2007). Por fim, o isolamento de estirpes de rizóbio resistentes a As (Mandal et al., 2008; Pajuelo et al., 2008) fortalece ainda mais a possibilidade de se utilizarem leguminosas na fitorremediação de solos contaminados por As.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e período

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, entre 27 de junho e 27 de outubro de 2010. As diversas análises foram realizadas nos laboratórios de Associações Micorrízicas (DMB), de Anatomia Vegetal (Departamento de Biologia Vegetal) e de Fertilidade do Solo (Departamento de Solos), todos da UFV.

#### 3.2 Preparo do substrato

O substrato consistiu de amostras destorroadas e peneiradas (2 mm) da camada superficial (0-20 cm) de um Latossolo Vermelho distrófico da região de Sete Lagoas, MG (Tabela 1), misturadas com areia, na proporção de três partes de solo para uma parte de areia (v/v). A mistura foi submetida a análises físicas e químicas seguindo-se a metodologia descrita pela Embrapa (1997) e à esterilização através de duas autoclavagens a 121 °C e 101,32 kPa (1,0 atm) por 90 min, com intervalo de 48 h entre elas. Após a esterilização, 2,5 kg de substrato foram acondicionados em vasos de 3 L forrados com sacos plásticos.

**Tabela 1.** Propriedades físicas e químicas do substrato antes da aplicação de calcário, de fosfato e dos tratamentos.

pH- H <sub>2</sub> O	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	t	T	V	m	MO	P-rem
	mg dm <sup>-3</sup>		-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----							---%---		dag kg <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
4,58	3,3	36	1,15	0,13	1,07	9,1	1,37	2,44	10,43	13,1	43,4	4,16	27,4
Areia grossa	Areia fina		Silte		Argila		Classe textural		Densidade aparente		Equivalente de umidade		
			-----%-----						kg dm <sup>-3</sup>	kg kg <sup>-1</sup>			
34	6		5		56		Argilosa		1,14		0,209		

Trinta e cinco dias antes do plantio foi feita calagem visando elevar a saturação por bases a 50 % utilizando-se uma mistura de três partes de CaCO<sub>3</sub> para uma de MgCO<sub>3</sub> (p/p). A partir desse momento até o plantio, o solo permaneceu incubado com quantidade de água desionizada correspondente a 80 % do equivalente de umidade (EU).

Quinze dias após a calagem, foi feita a aplicação de cinco doses de arsênio (0, 50, 100, 200 e 400 mg dm<sup>-3</sup>) fornecidas na forma de trióxido de arsênio (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Como o As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> é solubilizado somente em meio básico, foi utilizada solução de KOH para dissolvê-lo. A escolha pelo KOH deve-se ao elevado consumo de luxo de K pelas plantas, além de possuir efeito dispersante no solo bem inferior ao do NaOH. Para garantir o fornecimento do As na forma de As(V), foi adicionado peróxido de hidrogênio à solução de KOH.

Dessa forma, juntamente com o arsenato, foi fornecido K ao substrato em quantidade variável com o tratamento. Assim, foi aplicada solução de KOH em quantidade suficiente para nivelar a dose de potássio de todos os vasos com base no tratamento referente a 400 mg kg<sup>-1</sup> As, que recebeu 0,92 g de K por vaso.

Nove dias antes do plantio foi aplicado 0,30 g kg<sup>-1</sup> de CaHPO<sub>4</sub> anidro (p.a.). Após esse período, o substrato passou por nova análise química (Tabela 2). Os teores de As disponível, avaliados pelo extrator Mehlich-3, foram de 0,00; 0,76; 3,63; 8,82 e 29,65 mg dm<sup>-3</sup> nos solos que receberam 0, 50, 100, 200 e 400 mg kg<sup>-1</sup> As, respectivamente.

**Tabela 2.** Propriedades químicas do substrato após aplicação de calcário, de fosfato e dos tratamentos.

pH- H <sub>2</sub> O	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	t	T	V	m	MO	P-rem
	mg dm <sup>-3</sup>		-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----							---%---		dag kg <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
6,24	12,2	207	2,80	0,65	0,00	4,0	3,98	3,98	7,98	49,9	0,0	4,27	33,2

### 3.3 Preparo das sementes

As sementes de sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) não receberam tratamento para quebra de dormência e foram desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio 2,5 % por cinco minutos. Já as sementes de acácia (*Acacia mangium* Willd.) passaram por um tratamento para quebra de dormência através de imersão em água fervente, deixando-se a água esfriar enquanto as sementes permaneciam em embebição por 24 h. Todas as sementes foram lavadas em água destilada antes da inoculação com rizóbio.

Os inoculantes de rizóbio, específicos para as espécies utilizadas no experimento, foram adquiridos juntos ao CNPAB/EMBRAPA, sendo a inoculação das sementes feita feita por imersão em solução açucarada contendo o inoculante, até que as sementes ficassem envoltas por uma cada uniforme de inoculante, seguindo-se a recomendação do fornecedor.

### 3.4 Preparo dos inóculos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

Amostras de solo coletadas de um fragmento de Mata Atlântica localizado no campus da UFV passaram pelo processo de peneiramento úmido, seguido por centrifugação e flutuação em sacarose a 40 % (Daniels & Skipper, 1982) para coleta de esporos de FMAs. O material foi então coletado em placas de Petri canaletadas para contagem direta de esporos, com auxílio de estereomicroscópio (Zeiss – 40x). Lâminas com amostras desses esporos foram enviadas à Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), Santa Catarina, para identificação, sendo encontradas as seguintes espécies: *Glomus diaphanum*, *Acaulospora mellea*, *Acaulospora scrobiculata* e outras quatro espécies de *Glomus* e uma de *Acaulospora* indefinidas.

A inoculação dos vasos foi feita minutos antes do plantio através da pipetagem de 2 mL de uma solução de esporos e água destilada contendo, aproximadamente, 200 esporos por mL, previamente desinfestada com hipoclorito de sódio 2,5 % por dois minutos, sobre sulcos de 1 cm de profundidade abertos no substrato.

Acreditando-se não ter sido efetiva a primeira inoculação (com base nos resultados obtidos na primeira avaliação de colonização) uma nova foi feita ao 90<sup>o</sup> dia de cultivo, aplicando-se 2 mL de nova solução de esporos por vaso, extraídos da mesma localidade da aplicação anterior. Neste caso, a pipetagem foi feita em covetas abertas próximas às raízes das plantas, sendo a solução de esporos desinfestada utilizando-se outro procedimento.

Inicialmente, os esporos passaram por três imersões em solução de estreptomicina 100 mg L<sup>-1</sup> de 10 min cada. Entre cada imersão, os esporos eram enxaguados com água destilada. Em seguida, os esporos permaneceram por 5 min imersos em solução de cloramina 1 %, sendo novamente enxaguados com água destilada, completando a desinfestação. Tanto este procedimento, quanto o anterior são utilizados rotineiramente pelo Laboratório de Associações Micorrízicas da UFV.

### 3.5 Condução do experimento

Dez sementes foram distribuídas em cada vaso, sendo mantidas duas plantas por vaso trinta dias após a emergência das plântulas, procurando-se escolher as que apresentaram melhor crescimento. As mudas foram irrigadas diariamente com água desionizada de forma a manter o solo com umidade correspondente a 80 % do EU. A Tabela 3 mostra a identificação de cada tratamento com base na inoculação com rizóbio e micorriza.

**Tabela 3.** Identificação dos tratamentos com base na inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares.

<b>Tratamento*</b>	<b>Inoculação com rizóbio</b>	<b>Inoculação com FMA</b>
SMR	Não	Não
MIC	Não	Sim
RIZ	Sim	Não
MICxRIZ	Sim	Sim

\*Cada tratamento listado foi repetido para cada combinação de espécie de planta e dose de As, totalizando 40 tratamentos (4 x 2 x 5).

A adubação de cobertura foi feita a partir do 30<sup>o</sup> dia de cultivo pela aplicação de 3 mL de solução de Hoagland quinzenalmente em cada vaso, excluindo-se o N dos tratamentos inoculados com rizóbio e o P e o K de todos os tratamentos. Ao longo do terceiro mês de plantio, foram feitas três aplicações de 3 mL de solução 1 mol L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para complementar a adubação fosfatada.

No terceiro mês de plantio, foi feita uma avaliação preliminar para verificar a nodulação e a colonização micorrízica das plantas. A avaliação consistiu na coleta dos tratamentos com rizóbio e sem FMA (RIZ), sem rizóbio e com FMA (MIC) e com rizóbio e com FMA (MICxRIZ) do bloco 1 do experimento, totalizando 30 vasos.

Como não foram encontrados indícios de nodulação nem de colonização micorrízica, os vasos correspondentes ao tratamento RIZ foram descartados, enquanto o tratamento MICxRIZ foi coletado para as análises de anatomia radicular. O tratamento sem rizóbio e sem FMA (SMR) e o tratamento MIC foram mantidos até o término do período experimental. Sintomas visíveis de toxidez foram fotografados e descritos.

Ao 120<sup>o</sup> dia de exposição ao As as plantas foram coletadas inteiras e fotografadas. Após as medições de comprimento de raiz e de parte aérea foram separadas em raiz (R) e parte aérea (PA), lavadas em água de torneira e enxaguadas em água desionizada, evitando-se danos às raízes finas. Antes do enxágue, as raízes permaneceram de molho por um minuto em solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl para remoção do As aderido superficialmente às raízes. As amostras foram, então, postas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 60-70 °C até peso constante.

### 3.6 Delineamento experimental

O experimento foi montado, inicialmente, em esquema fatorial completo 2 x 2 x 2 x 5, sendo duas espécies vegetais (*Mimosa caesalpiniaefolia* e *Acacia mangium*), quatro tratamentos microbiológicos (sem inoculação, inoculação com rizóbio, inoculação com

FMA, e inoculação com rizóbio e FMA) e cinco doses de As (0, 50, 100, 200 e 400 mg dm<sup>-3</sup>), utilizando-se um delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Devido ao descarte do tratamento RIZ as análises estatísticas foram feitas considerando-se um fatorial 2 x 2 x 5.

### 3.7 Avaliações

#### 3.7.1 Crescimento

Foram medidos os comprimentos de raiz (CR) e parte aérea (CPA) de cada planta, além da matéria seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA) sendo pesadas, simultaneamente, as duas plantas de cada vaso. A relação R/PA foi calculada com base na produção de matéria seca. Para possibilitar a comparação entre espécies, as avaliações foram feitas com base no crescimento relativo ao tratamento controle (sem As) de cada uma:

$$\text{Valor relativo (\%)} = \frac{\text{Valor da variável obtido com um tratamento qualquer}}{\text{Valor da variável obtido no tratamento sem As correspondente}} \times 100$$

#### 3.7.2 Colonização micorrízica

Aproximadamente a metade das raízes de cada planta dos tratamentos MIC e MICxRIZ foi coletada para avaliação da colonização micorrízica, sendo a outra metade reservada para pesagem e análise de tecido. Essa coleta foi feita aleatoriamente ao longo de toda a raiz. As amostras foram clarificadas com KOH 1,78 mol L<sup>-1</sup> em banho-maria a 90 °C e coradas com azul de tripano (Phillips & Hayman, 1970) para contagem dos segmentos colonizados em lupa, empregando-se o método de interseção em placa quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980).

#### 3.7.3 Anatomia radicular

Fragmentos obtidos de cortes transversais de segmentos apicais e intermediários de raiz foram coletados para análise em microscopia de luz. Logo após a coleta, os fragmentos foram fixados em glutaraldeído 0,25 mol L<sup>-1</sup> e paraformaldeído 1,33 mol L<sup>-1</sup> em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) acrescido de cloreto de cálcio 5 mmol L<sup>-1</sup> (Karnovsky, 1965). Posteriormente, procedeu-se a inclusão em metacrilato (Historesin) após desidratação das amostras em série alcoólica crescente. Utilizando-se um micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc.),

foram obtidos cortes transversais e longitudinais com 3  $\mu\text{m}$  de espessura, os quais foram corados em azul de Toluidina a pH 4,0 (O'Brian e McCully, 1981) e montados em meio Permout.

### 3.7.4 Índice SPAD

Para a determinação do índice SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) foi utilizado o medidor de clorofila portátil SPAD-502Plus (Konica Minolta) utilizando-se a segunda folha mais jovem completamente expandida de cada planta (terceiro nó). Nas plantas de *Acacia mangium*, o índice corresponde à média de três medições feitas ao longo de cada folha. Nas plantas de *Mimosa caesalpiniaefolia*, o índice refere-se à média dos dois folíolos terminais.

### 3.7.5 Trocas gasosas

As trocas gasosas das plantas de *Acacia mangium* foram avaliadas para registro da taxa fotossintética líquida ( $A$ ), da taxa transpiratória ( $E$ ), da condutância estomática ( $g_s$ ), da relação entre a concentração interna e a concentração externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) e a eficiência instantânea do uso da água ( $WUE$ ;  $A/E$ ), utilizando-se um medidor portátil de fotossíntese LCpro+ (ADC BioScientific Ltda.). As medições foram feitas na folha mais jovem completamente expandida de cada planta (segundo nó) dos tratamentos com 0, 50 e 100  $\text{mg kg}^{-1}$  As, entre 8:20 e 10:30 h, uma semana antes da coleta do experimento.

Os tratamentos de *A. mangium* com 200 e 400  $\text{mg dm}^{-3}$  As e os tratamentos com *Mimosa caesalpiniaefolia* não foram avaliados devido ao tamanho das folhas e folíolos estarem abaixo do limite permitido para se obterem medições confiáveis com a câmara de infravermelho acoplada ao medidor de fotossíntese.

### 3.7.6 Análise química de tecido vegetal

A determinação da concentração de As, P e S nas plantas foi feita a partir de amostras de material seco, finamente triturado, submetidas à digestão nitro-perclórica 3:1 (Tedesco et al., 1995). A quantificação dos teores dos elementos nos extratos foi realizada por espectrometria de emissão atômica, com plasma induzido em argônio (ICP-OES). A avaliação do P e do S justifica-se pela relação entre os teores desses nutrientes e a resposta das plantas à toxidez por As.

Os conteúdos dos elementos nas raízes, na parte aérea e total foram calculados com base nos teores e na produção de matéria seca. Os índices de translocação dos nutrientes

e do arsênio foram calculados em relação à quantidade acumulada, de acordo com a seguinte fórmula (Abichequer & Bohnen, 1998):

$$IT (\%) = \frac{\text{Conteúdo do elemento na parte aérea}}{\text{Conteúdo do elemento na planta}} \times 100$$

### **3.8 Análise dos dados**

A normalidade e a homoscedasticidade dos dados foram verificadas pelos testes de Ryan-Joiner e Barlett, respectivamente, a 1 % de significância. Para se corrigirem eventuais desvios de normalidade ou heteroscedasticidade foram aplicadas as transformações de Box-Cox e, alternativamente, a de Johnson, nos casos em que a primeira transformação foi ineficaz. Posteriormente, foi feita análise de variância, a 5 % de significância, para verificar o efeito dos tratamentos.

Para observar o comportamento das variáveis em função da dose de As foi feita análise de regressão, ajustando-se os modelos linear, quadrático e raiz-quadrático. Para cada variável, foi escolhido o modelo com coeficiente de determinação maior ou igual a 0,75 e menor número de parâmetros significativos. Todas as análises estatísticas foram processadas com auxílio dos softwares Sisvar e Minitab 16.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Colonização micorrízica

A colonização micorrízica foi pouco eficaz, sendo verificada muito baixa colonização na *Acacia mangium* e, aparentemente, nenhuma colonização na *Mimosa caesalpiniaefolia*. Somente em seis vasos do tratamento MIC foi possível realizar a avaliação. A taxa de colonização média entre esses vasos foi de 1,98 %, sendo 8,45 % o valor máximo observado.

A causa mais provável da ocorrência de baixa taxa de colonização micorrízica foi o baixo crescimento dos fungos e das plantas, dadas as condições climáticas do período experimental. Tendo sido plantadas no inverno, as plantas apresentaram crescimento lento. Da mesma forma, os fungos e a colonização devem ter se desenvolvido muito tardiamente. Assim, as estruturas fúngicas dificilmente seriam vistas pelo método de contagem adotado.

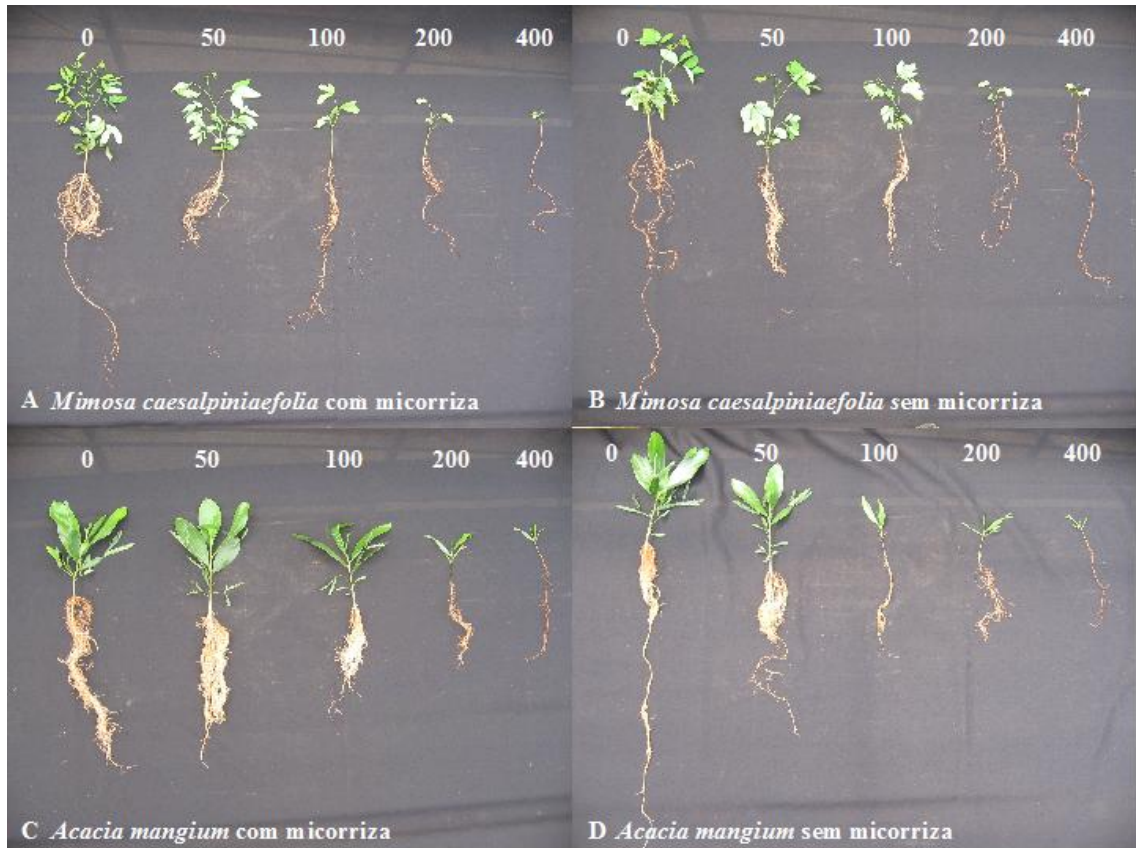
Não obstante, hifas de FMAs foram observadas durante a avaliação da colonização em mais de seis vasos, com diferentes doses de As, sem, contudo, estarem aderidas às raízes. Portanto, não foram contabilizadas. Além disso, embora a análise estatística não tenha mostrado efeito significativo da inoculação com FMAs no crescimento das plantas, à exceção do comprimento da parte aérea (Seção 4.4), em diversas variáveis os efeitos puderam ser observados (Seções 4.5, 4.5 e 4.8).

O efeito significativo da micorriza em algumas variáveis (especialmente as relacionadas à absorção de nutrientes e As), a despeito da baixa taxa de colonização observada, é perfeitamente plausível, pois a simples ocorrência da colonização é suficiente para desencadear alterações na expressão de genes nas plantas, afetando significativamente a absorção de P e As (Smith et al., 2010). Contudo, efeitos no crescimento somente poderiam ser observados com a prolongação do tempo de cultivo. Dessa forma, é pertinente que os efeitos dos FMAs sejam considerados na exposição e discussão dos resultados deste experimento.

### 4.2 Sintomas visíveis de toxidez

O principal sintoma da toxidez de As foi a redução do crescimento, independentemente da espécie ou da presença de micorriza (Figura 1). Foi possível observar redução no comprimento das plantas, tanto de raiz quanto de parte aérea, e na

quantidade de folhas. A emissão de raízes laterais também foi prejudicada, sendo que, na dose mais alta de As, praticamente não se encontraram raízes laterais.



**Figura 1.** Aspecto geral das plantas ao 120<sup>o</sup> dia de cultivo. Os números correspondem às doses de As (mg kg<sup>-1</sup>).

Além da severa redução de crescimento, já ao final do primeiro mês de cultivo, foi observada clorose no primeiro par de folhas das plantas de *Mimosa caesalpiniaefolia* submetidas à maior dose de As. A clorose foi bastante similar à observada em casos de deficiência de Fe, na qual o limbo adquire coloração esbranquiçada enquanto as nervuras permanecem verdes (Figura 2).

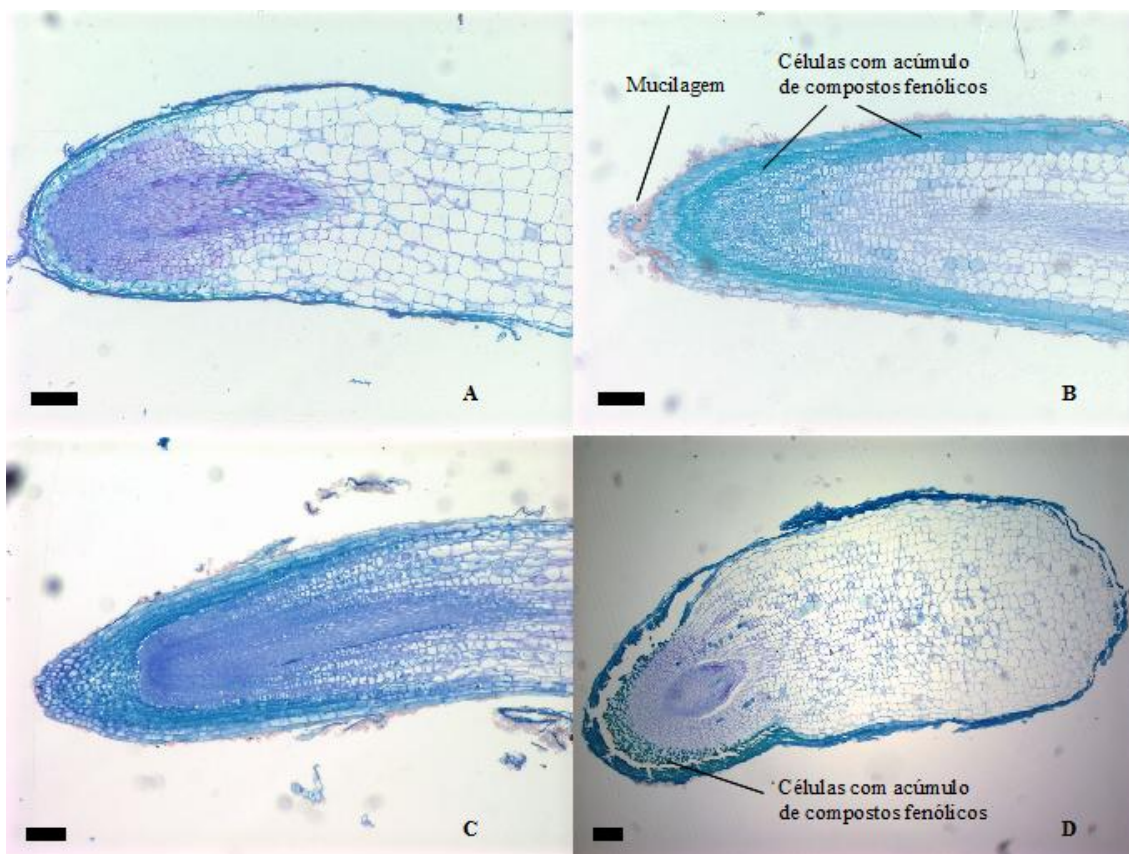


**Figura 2.** Aspecto de plantas de *Mimosa caesalpiniaefolia* com seis semanas de cultivo. A: Planta submetida a  $0 \text{ mg kg}^{-1}$  As. B: Planta submetida a  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  As.

Somente uma das plantas submetidas à dose mais alta de As morreu antes da coleta, sendo uma planta de *M. caesalpiniaefolia*. As folhas cloróticas das plantas sobreviventes secaram e caíram ao longo do segundo mês de cultivo, dando lugar a folhas aparentemente normais ao final do terceiro mês. Mesmo assim, elas não conseguiram acompanhar o ritmo de crescimento das plantas submetidas a doses menores de As. Não foi observada clorose nem queda precoce de folhas nas plantas de *Acacia mangium*.

### 4.3 Anatomia radicular

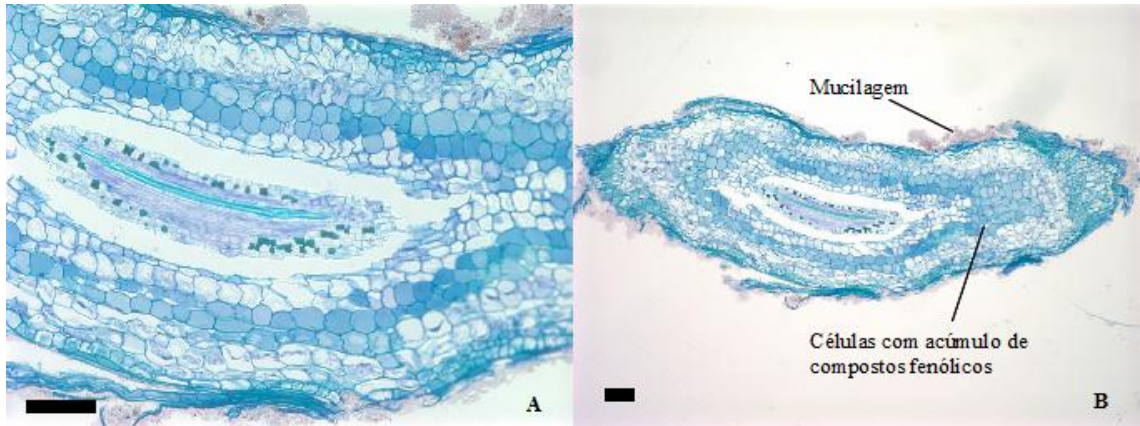
A anatomia radicular de ambas as espécies foi afetada pela aplicação de As no substrato, especialmente na maior dose, indo além da redução de raízes laterais, com o mencionado anteriormente. Cortes longitudinais de ápices radiculares de *Acacia mangium* (Figura 3A e B) revelam alterações na coifa, que ficou mais espessa na presença do As. Além disso, houve maior acúmulo de compostos fenólicos, caracterizado pelo aumento do número de células com preenchimento azul claro. Pôde-se observar também maior secreção de mucilagem sob toxidez de As (Figura 3B).



**Figura 3.** Cortes longitudinais de ápices radiculares. A: *Acacia mangium*, 0 mg kg<sup>-1</sup> As. B: *A. mangium*, 400 mg kg<sup>-1</sup> As. C: *Mimosa caesalpiniaefolia*, 0 mg kg<sup>-1</sup> As. D: *M. caesalpiniaefolia*, 400 mg kg<sup>-1</sup> As. Barras = 1 μm.

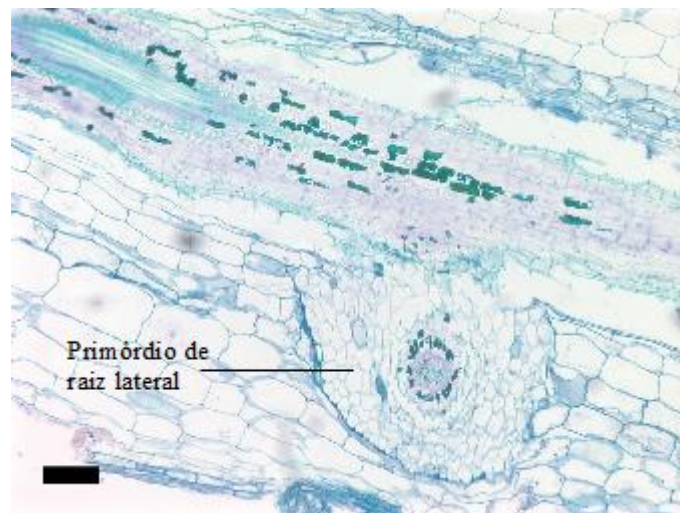
As alterações nos ápices radiculares de *Mimosa caesalpiniaefolia* foram mais expressivas (Figura 3C e D). Na maior dose de As, houve paralisação do crescimento dos brotos laterais, ficando curtos e espessos, com a coifa reduzida (Figura 3D). Aparentemente, também houve acúmulo de compostos fenólicos sob toxidez de As, especialmente na região onde a coifa se separou do meristema (Figura 3D).

De maneira geral, o formato das raízes foi bastante alterado na presença de As, que adquiriu aspecto “ondulado”. Tanto que impossibilitou a obtenção de cortes longitudinais não oblíquos de fragmentos coletados das regiões de alongamento e de maturação da raiz. Mesmo assim, foi possível observar acúmulo de compostos fenólicos e maior secreção de mucilagem nessas regiões, na maior dose de As (Figura 4).



**Figura 4.** Cortes longitudinais de raízes de *Mimosa caesalpiniaefolia* submetida a 400 mg kg<sup>-1</sup> As. Barras = 1 µm.

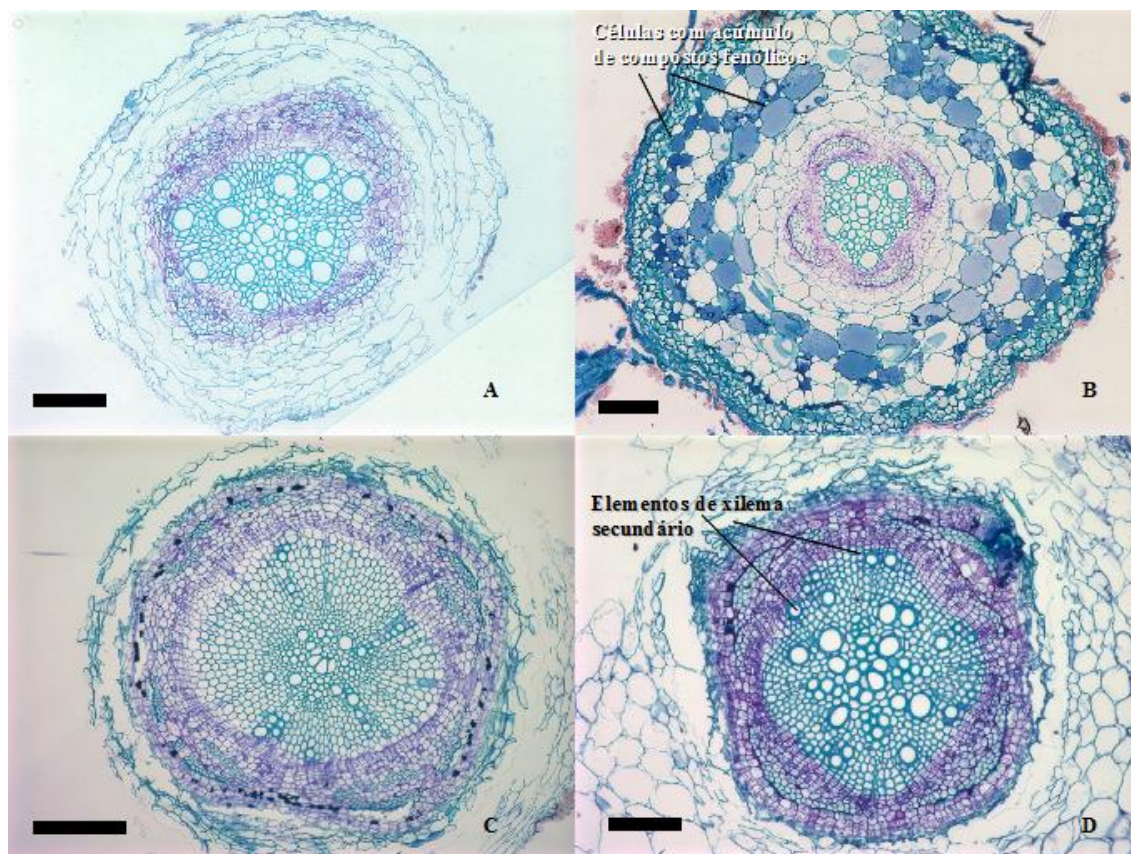
A deformação das raízes também impossibilitou a obtenção de cortes íntegros de fragmentos coletados na zona de ramificação das raízes. Contudo, na Figura 5, é possível observar como os primórdios das raízes laterais são deformados pela toxidez de As quando alcançam o exterior da raiz principal, fazendo com que se curvem ao invés de se alongarem normalmente.



**Figura 5.** Corte longitudinal de um fragmento de raiz de *Mimosa caesalpiniaefolia* mostrando um primórdio de raiz lateral crescendo em ângulo aproximadamente reto devido à toxidez de As. Barra = 1 µm.

Os cortes transversais de fragmentos da zona de alongamento das raízes evidenciaram, além da redução do crescimento das raízes, acúmulo de compostos fenólicos em células do parênquima cortical da acácia (Figura 6A e B). Na *M. caesalpiniaefolia*, um sintoma digno de nota foi a alteração na distribuição dos

elementos de vaso em comparação com a raiz sadia. Além disso, houve formação de elementos de vaso secundários onde, na dose zero de As, não havia (Figura 6C e D).



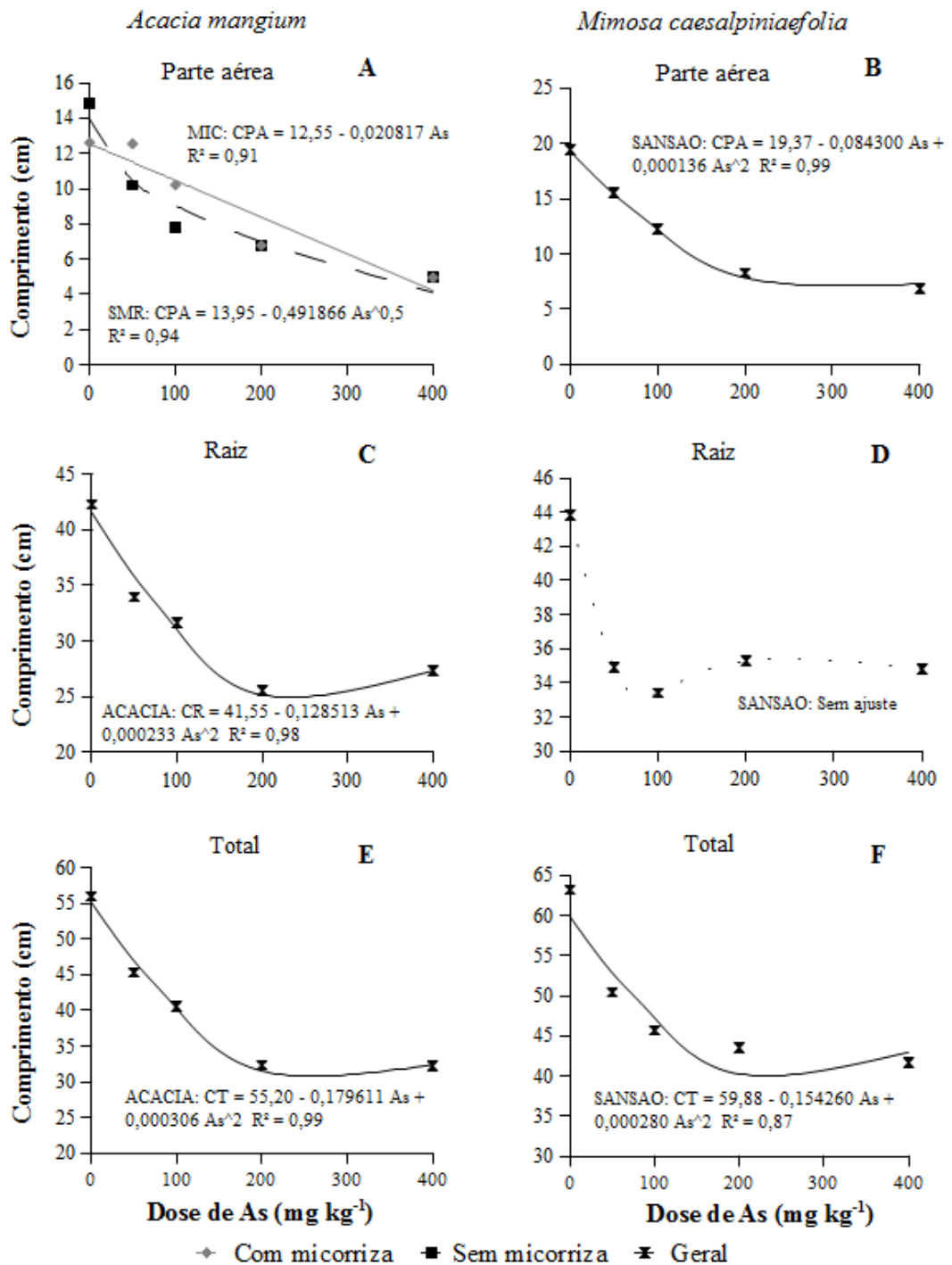
**Figura 6.** Cortes transversais de raízes. A: *Acacia mangium*, 0 mg kg<sup>-1</sup> As. B: *A. mangium*, 400 mg kg<sup>-1</sup> As. C: *Mimosa caesalpiniaefolia*, 0 mg kg<sup>-1</sup> As. D: *M. caesalpiniaefolia*, 400 mg kg<sup>-1</sup> As. Barras = 1 μm.

#### 4.4 Crescimento

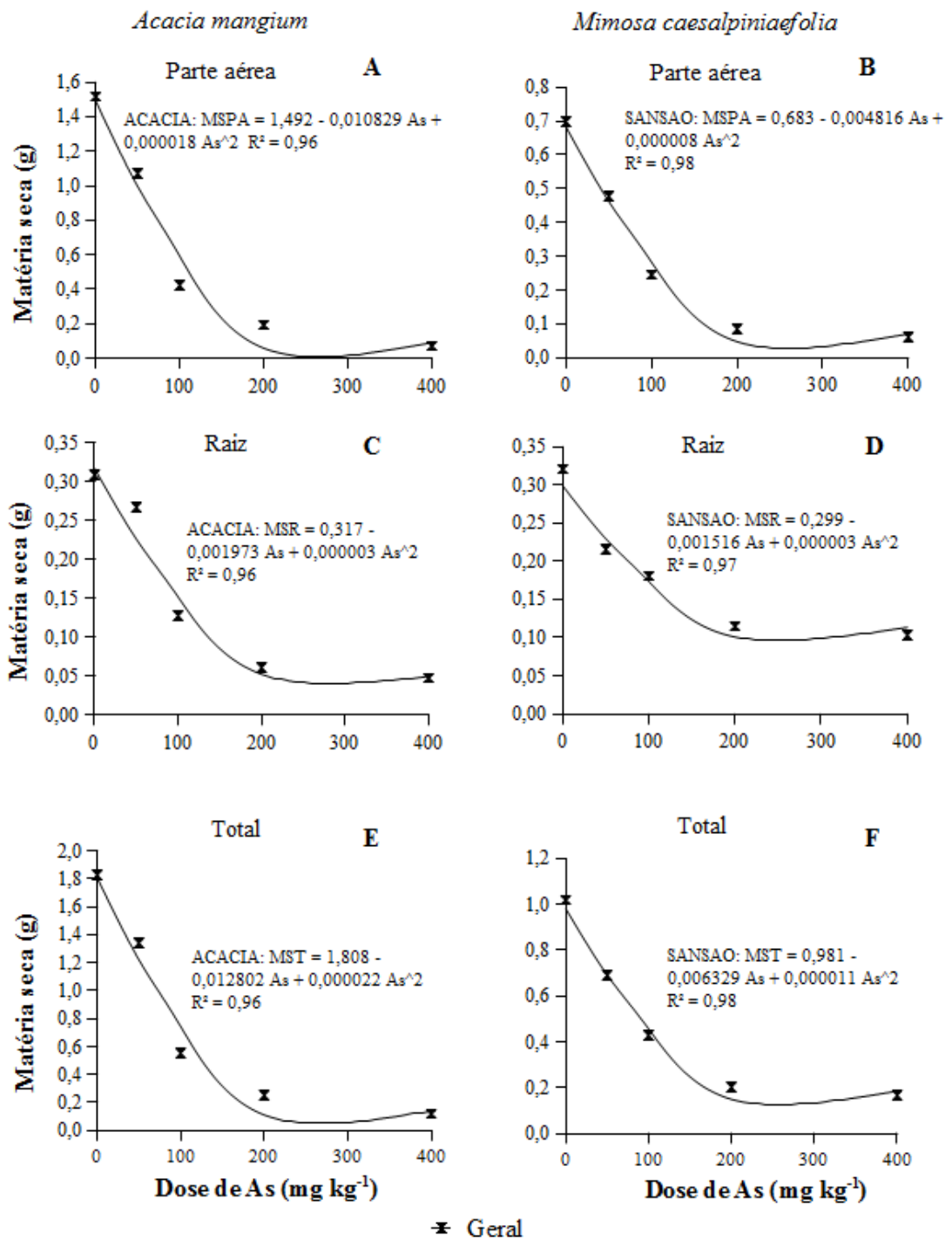
O As teve efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) sobre todas as variáveis de crescimento analisadas (Tabela 4). Em todos os casos, a tendência foi de redução do crescimento com o aumento da dose de As (Figuras 7 e 8). Mesmo a menor dose foi suficiente para reduzir a matéria seca total (MST) da *Acacia mangium* em 20 % e a da *Mimosa caesalpiniaefolia* em 30 %. Na maior dose, a diminuição na MST passou de 90 % para a *A. mangium* e de 80 % para a *M. caesalpiniaefolia*, sendo significativa ( $p < 0,05$ ) essa diferença entre as espécies.

**Tabela 4.** Valores de F para comprimento relativo de raiz (CRR), de parte aérea (CPAR) e total (CTR), matéria seca relativa de raiz (MSRR), de parte aérea (MSPAR) e total (MSTR) e relação raiz/parte aérea (RRPA). \* e \*\*: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.

<b>FV</b>	<b>CRR</b>	<b>CPAR</b>	<b>CTR</b>	<b>MSRR</b>	<b>MSPAR</b>	<b>MSTR</b>	<b>RRPA</b>
	-----Pr>Fc-----						
Bloco	0,739	0,039*	0,515	0,010*	0,006**	0,005**	0,032*
Esp	0,124	0,167	0,527	0,152	0,117	0,012*	0,000**
Mic	0,325	0,083	0,795	0,205	0,812	0,882	0,424
As	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
Esp x Mic	0,061	0,014*	0,060	0,183	0,289	0,089	0,597
Esp x As	0,280	0,727	0,610	0,249	0,148	0,186	0,068
Mic x As	0,483	0,549	0,498	0,515	0,702	0,224	0,211
Esp x Mic x As	0,878	0,411	0,899	0,700	0,985	0,741	0,851
CV (%)	20,25	20,72	19,16	51,74	45,81	45,46	35,48



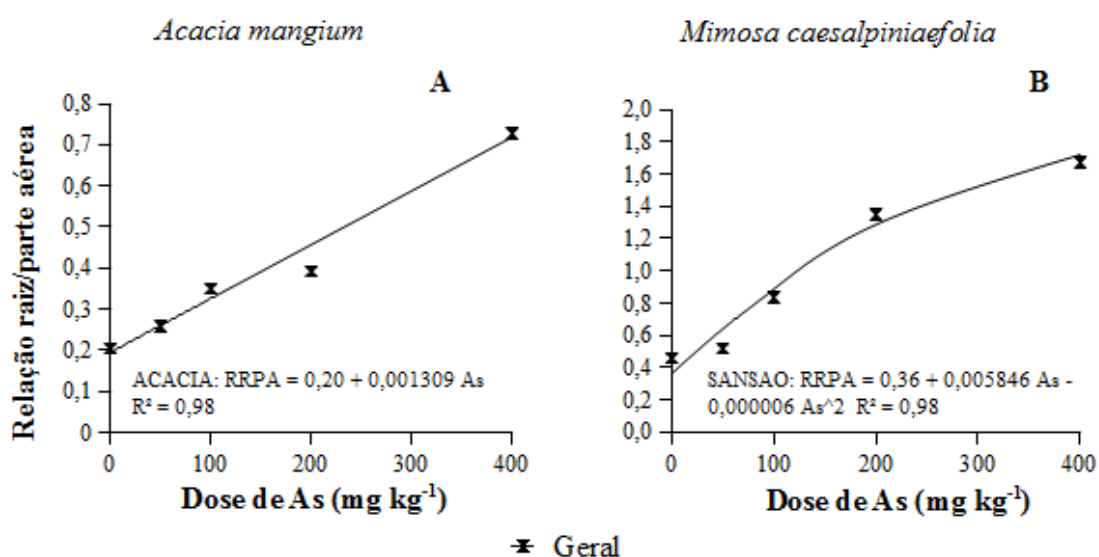
**Figura 7.** Comprimento de parte aérea (CPA), de raiz (CR) e total (CT) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As (média de duas plantas). MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.



**Figura 8.** Matéria seca de parte aérea (MSPA), de raiz (MSR) e total (MST) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As (média de duas plantas).

O efeito da micorriza foi observado somente no comprimento da parte aérea (CPA) da *A. mangium* (Figura 7A). Na ausência de micorriza, o melhor modelo para o comportamento da CPA foi o raiz-quadrático, enquanto, na presença de micorriza, o melhor modelo foi o linear simples. Esse efeito, contudo, não foi suficiente para alterar significativamente a matéria seca da parte aérea (Figura 8A).

A relação raiz/parte aérea (RRPA) foi a única variável de crescimento que aumentou com as doses de As (Figura 9). De fato, a RRPA praticamente quadruplicou da dose zero para a dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> As, para ambas as espécies. Neste caso, houve diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre as espécies, sendo que a RRPA da *M. caesalpiniaefolia* foi superior à da *A. mangium* em todos os tratamentos.



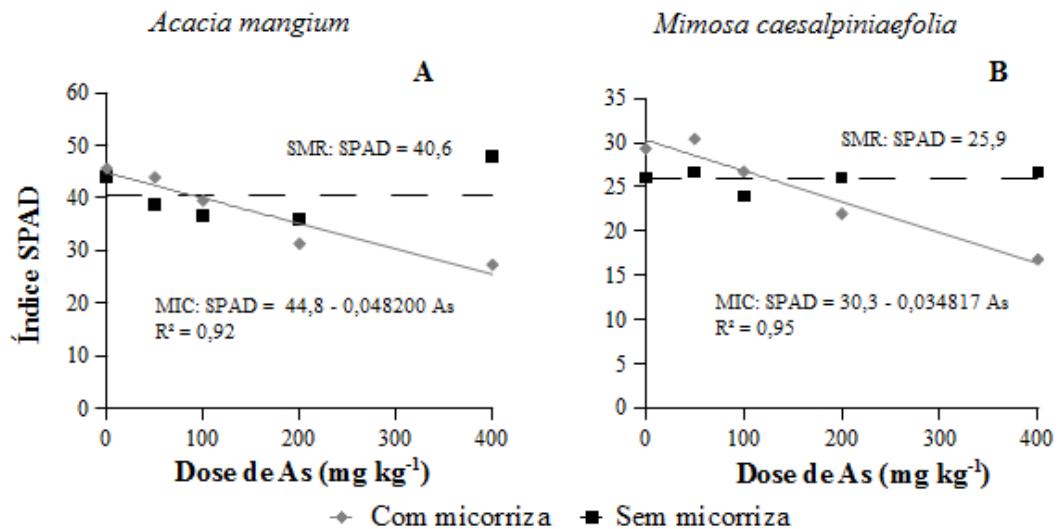
**Figura 9.** Relação raiz/parte aérea (RRPA) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As (média de duas plantas).

#### 4.5 Índice SPAD

O índice de SPAD diferiu significativamente entre as espécies ( $p < 0,01$ ) e foi influenciado pelas doses de As na presença de micorriza ( $p < 0,05$ ; Tabela 5). Os valores de *Acacia mangium*, de maneira geral, foram bem superiores aos de *Mimosa caesalpiniaefolia* (Figura 10). Na ausência de micorriza, o índice SPAD médio foi de 40,6 para a acácia e 25,9 para o sansão-do-campo. Contudo, nos tratamentos com micorriza, o índice SPAD diminuiu linearmente com o aumento da dose de arsênio, apresentando redução superior a 50 % na dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 10).

**Tabela 5.** Significância dos tratamentos para o índice SPAD. \* e \*\*: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.

FV	Bloco	Esp	Mic	As	Esp x Mic	Esp x As	Mic x As	Esp x Mic x As	CV (%)
Pr>Fc	0,040*	0,000**	0,057	0,016*	0,733	0,812	0,011*	0,998	20,41



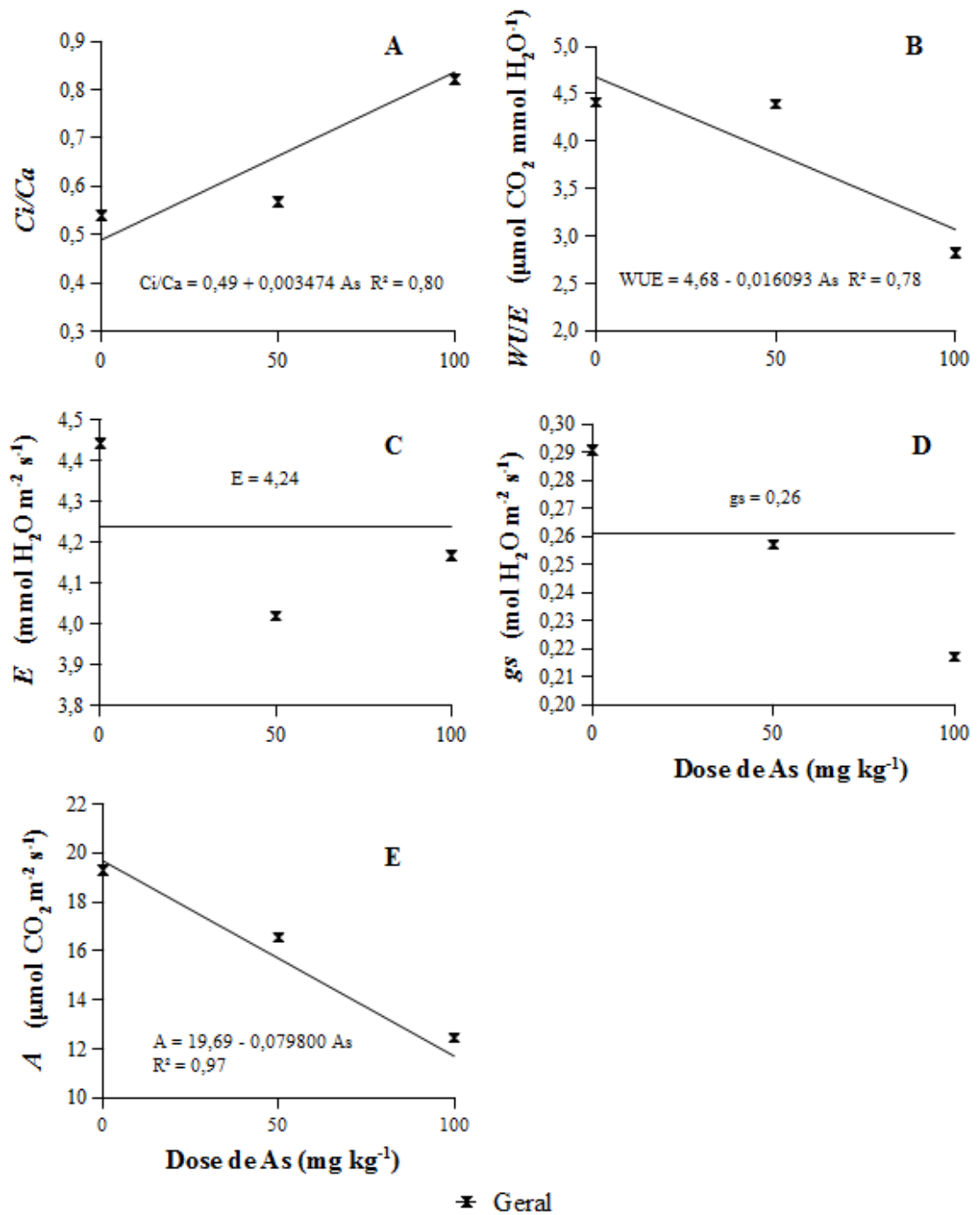
**Figura 10.** Índice SPAD de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia*, para os tratamentos com (MIC) e sem micorriza (SMR), em função da dose de As.

#### 4.6 Trocas gasosas

Três das cinco variáveis associadas às trocas gasosas de *Acacia mangium* foram significativamente afetadas pelo As ( $p < 0,01$ ; Tabela 6). A relação  $\text{CO}_2$  interno/externo ( $C_i/C_a$ ) aumentou em com as doses de As, com variação de mais de 70 %, comparando-se a dose 0 com a dose de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura 11). Já a eficiência instantânea do uso da água ( $WUE$ ) e a taxa fotossintética ( $A$ ) caíram mais de 30 % nas plantas submetidas à dose de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de As. O efeito do As, contudo, não se refletiu em alterações na condutância estomática ( $g_s$ ) e na taxa transpiratória ( $E$ ), cujas médias foram de  $0,26 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $4,24 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 6.** Significância dos tratamentos para as variáveis de trocas gasosas. *Ci/Ca*: relação gás carbônico interno/externo. *E*: taxa transpiratória. *gs*: condutância estomática. *A*: taxa fotossintética. *WUE*: eficiência instantânea do uso da água (*A/E*). \* e \*\*: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.

<b>FV</b>	<b><i>Ci/Ca</i></b>	<b><i>E</i></b>	<b><i>gs</i></b>	<b><i>A</i></b>	<b><i>WUE</i></b>
-----Pr>F <sub>c</sub> -----					
Bloco	0,238	0,012*	0,002**	0,867	0,009**
Mic	0,704	0,558	0,870	0,954	0,962
As	0,001**	0,116	0,171	0,000**	0,001**
Mic x As	0,790	0,381	0,973	0,995	0,953
CV (%)	24,99	13,22	19,12	13,84	13,01



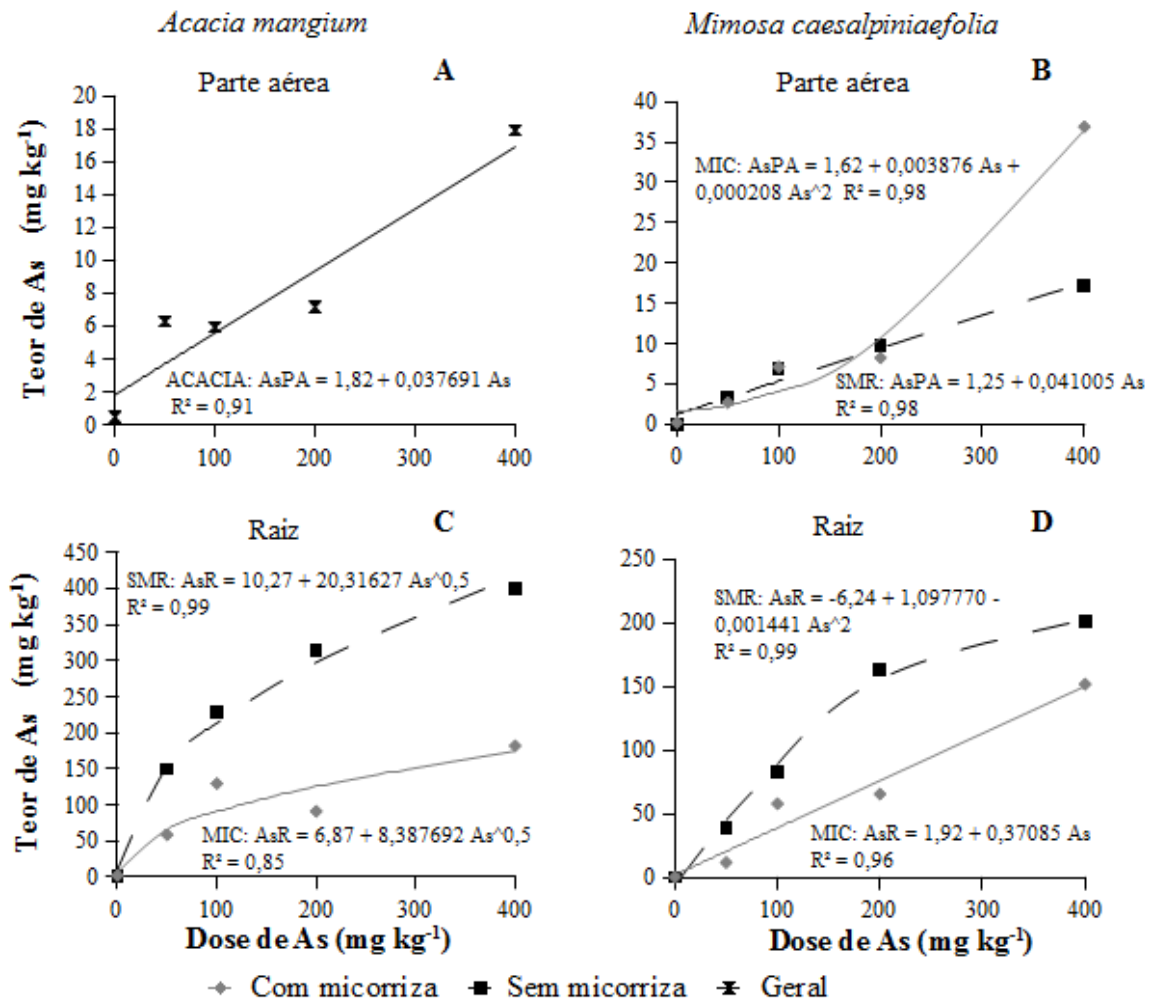
**Figura 11.** Relação carbono interno/externo ( $Ci/Ca$ ), eficiência instantânea do uso da água ( $WUE$ ), taxa transpiratória ( $E$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e taxa fotossintética ( $A$ ) de *Acacia mangium* em função da dose de As.

#### 4.7 Absorção de As

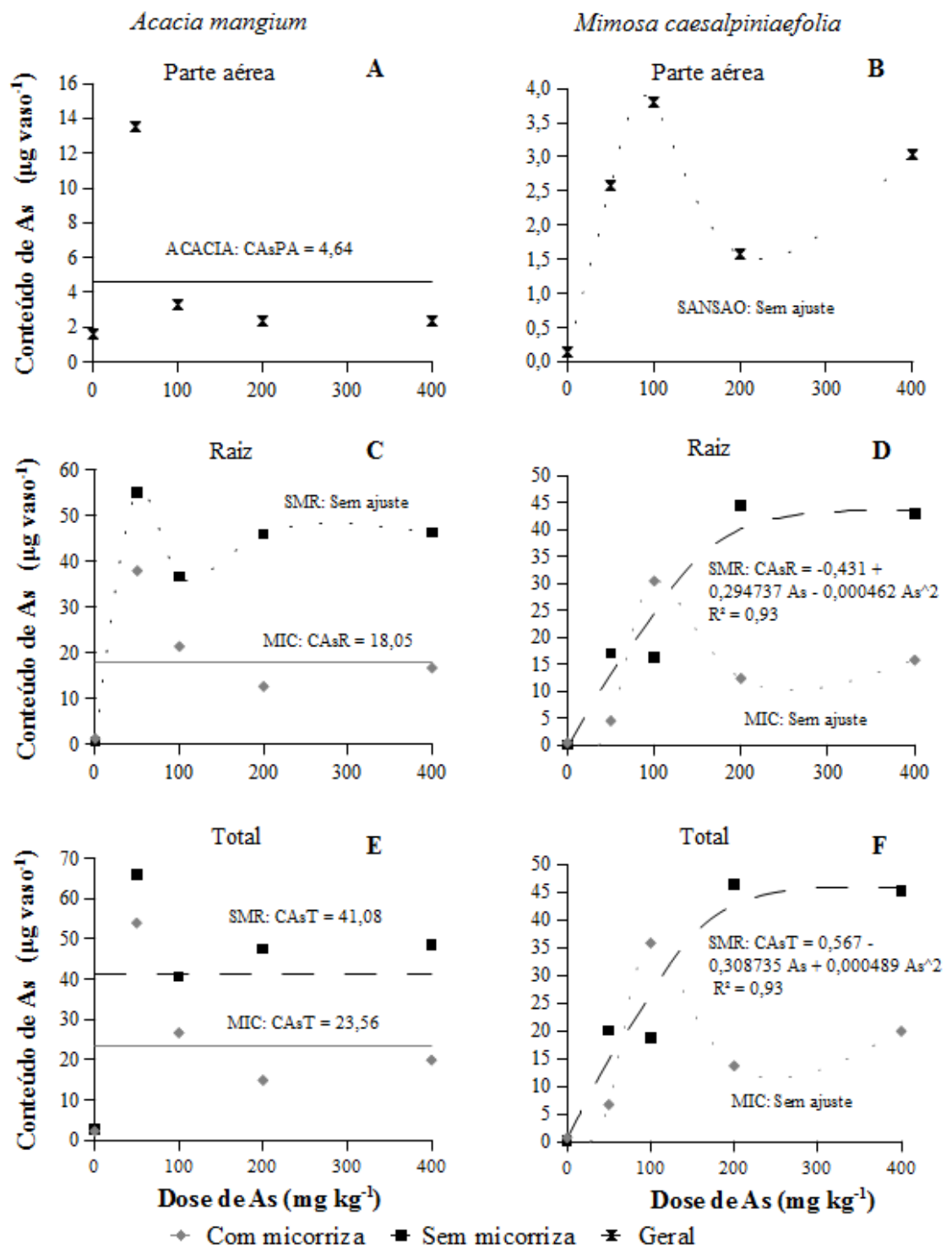
Houve variação ( $p < 0,01$ ) na absorção e no acúmulo de As pelas plantas de ambas as espécies com a dose de As aplicada (Tabela 7). Embora os teores de As na parte aérea (AsPA) e na raiz (AsR) de ambas as espécies tenham aumentado com a dose de As (Figura 12), isso não resultou, necessariamente, em maior conteúdo ou translocação de As (Figuras 13 e 14). Não houve diferença estatística entre os teores de As na parte aérea de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* (Tabela 9), contudo, o AsR da *A. mangium* foi superior ao da *M. caesalpiniaefolia* (Figura 13C e D). Em questão de conteúdo, de maneira geral, a *A. mangium* superou a *M. caesalpiniaefolia*, com variações em função da micorrização e da dose de As (Figura 14).

**Tabela 7.** Significância dos tratamentos para os teores de As na raiz (AsR) e na parte aérea (AsPA), para o conteúdo de As na raiz (CAsR), na parte aérea (CAsPA) e total (CAsT), e para o índice de translocação de As (ITAs). \* e \*\*: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.

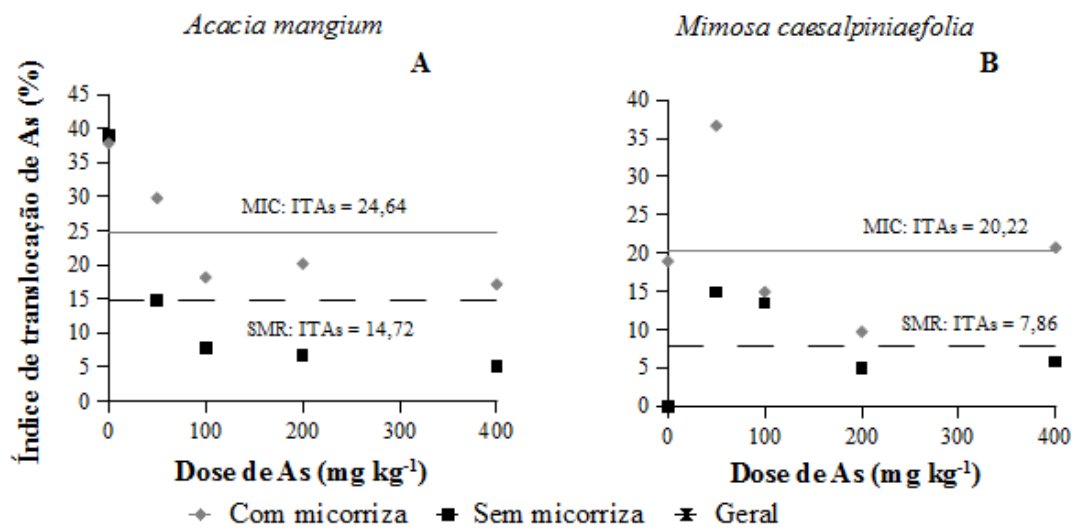
FV	AsR	AsPA	CAsR	CAsPA	CAsT	ITAs
	-----Pr>Fc-----					
Bloco	0,832	0,408	0,095	0,006**	0,074	0,097
Esp	0,000**	0,617	0,014*	0,120	0,008**	0,457
Mic	0,000**	0,643	0,001**	0,584	0,002**	0,002**
As	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,053
Esp x Mic	0,004**	0,262	0,306	0,485	0,248	0,741
Esp x As	0,003**	0,020*	0,005**	0,013*	0,001**	0,219
Mic x As	0,000**	0,029*	0,003**	0,482	0,014*	0,918
Esp x Mic x As	0,234	0,513	0,732	0,443	0,733	0,615
CV (%)	29,39	39,69	55,66	72,57	57,15	108,02



**Figura 12.** Teor de As na parte aérea (AsPA) e na raiz (AsR) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.



**Figura 13.** Conteúdo de As na parte aérea (CA<sub>s</sub>PA), na raiz (CA<sub>s</sub>R) e total (CA<sub>s</sub>T) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.



**Figura 14.** Índice de translocação de As de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.

O efeito da micorriza na absorção e no acúmulo de As somente não foi observado no teor de As da parte aérea da *A. mangium* (Figura 12A) e no conteúdo de As na parte aérea de ambas as espécies (Figura 13A e B). Considerando-se as outras variáveis, de maneira geral, a micorrização contribuiu para a redução dos teores e conteúdos de As e para o aumento do índice de translocação de As (Figura 14).

#### 4.8 Absorção de P e S

As doses de As influenciaram diversas variáveis de absorção e acúmulo de P e S (Tabelas 8 e 9). De fato, somente o teor de enxofre na parte aérea (SPA) de ambas as espécies, o teor de P nas raízes (PR) de *Mimosa caesalpiniaefolia* sem micorriza (SMR) e o conteúdo de S nas raízes (CSR) de *M. caesalpiniaefolia* sem micorriza não apresentaram variações significativas com o aumento da dose de As.

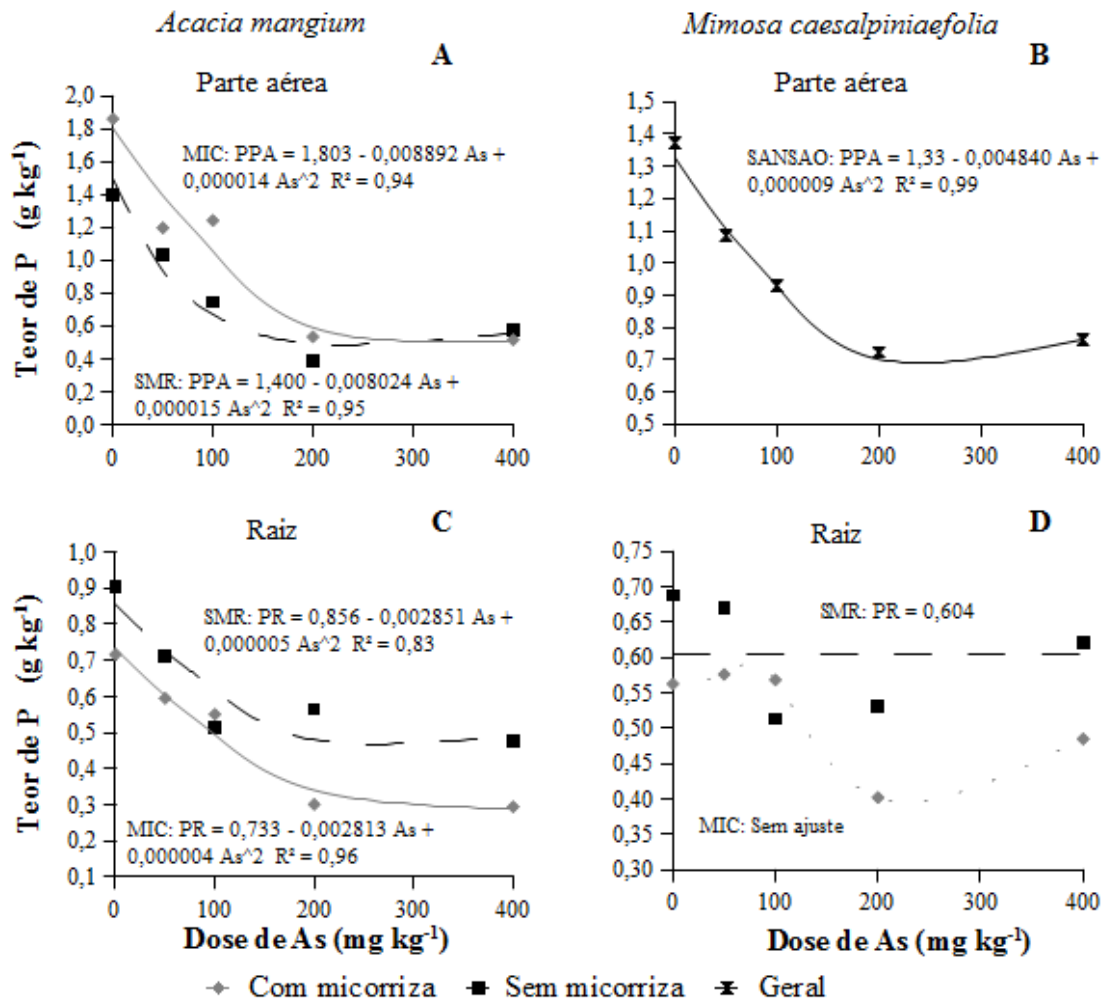
**Tabela 8.** Significância dos tratamentos para os teores de P e S na raiz (PR e SR) e na parte aérea (PPA e SPA). \* e \*\*: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.

FV	PR	SR	PPA	SPA
	-----Pr>Fc-----			
Bloco	0,286	0,342	0,335	0,452
Esp	0,983	0,000**	0,051	0,000**
Mic	0,000**	0,000**	0,013*	0,375
As	0,000**	0,000**	0,000**	0,525
Esp x Mic	0,264	0,037*	0,217	0,381
Esp x As	0,004**	0,468	0,009**	0,149
Mic x As	0,032*	0,152	0,185	0,994
Esp x Mic x As	0,949	0,459	0,465	0,731
CV (%)	15,97	13,71	20,20	13,67

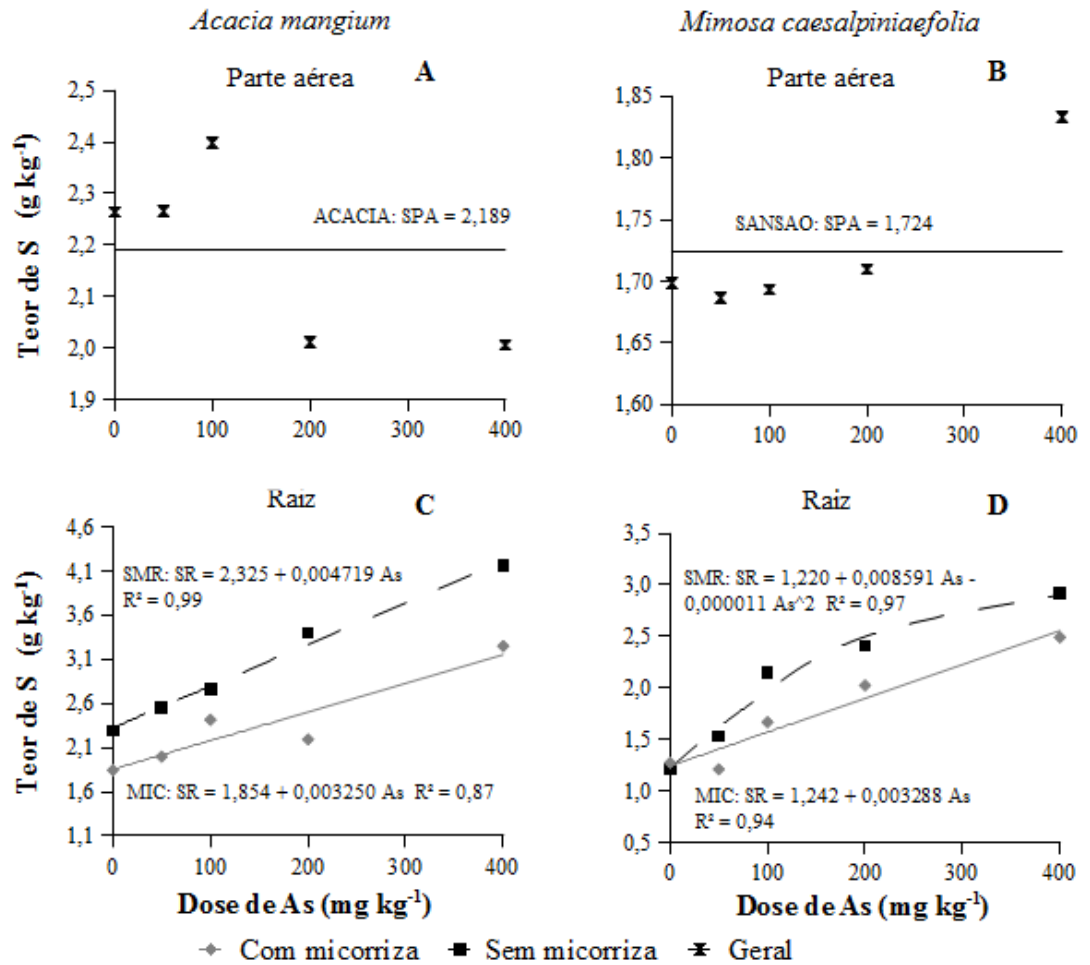
**Tabela 9.** Significância dos tratamentos para o conteúdo de P e S na raiz (CPR e CSR), na parte aérea (CPPA e CSPA), total (CPT e CST) e para os índices de translocação de P e S (ITP e ITS). \* e \*\*: significativo a 5 e a 1 % pelo teste F, respectivamente.

FV	CPR	CSR	CPPA	CSPA	CPT	CST	ITP	ITS
	-----Pr>Fc-----							
Bloco	0,064	0,325	0,001**	0,000**	0,001**	0,007**	0,033*	0,108
Esp	0,072	0,513	0,124	0,000**	0,301	0,023*	0,000**	0,000**
Mic	0,443	0,491	0,599	0,597	0,831	0,734	0,000**	0,005**
As	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
Esp x Mic	0,498	0,888	0,969	0,817	0,744	0,994	0,013*	0,953
Esp x As	0,066	0,034*	0,004**	0,083	0,002**	0,074	0,176	0,184
Mic x As	0,014*	0,014*	0,022*	0,033*	0,015*	0,012*	0,901	0,091
Esp x Mic x As	0,457	0,428	0,450	0,557	0,527	0,561	0,099	0,629
CV (%)	52,82	48,89	51,64	54,45	36,85	53,26	12,22	11,24

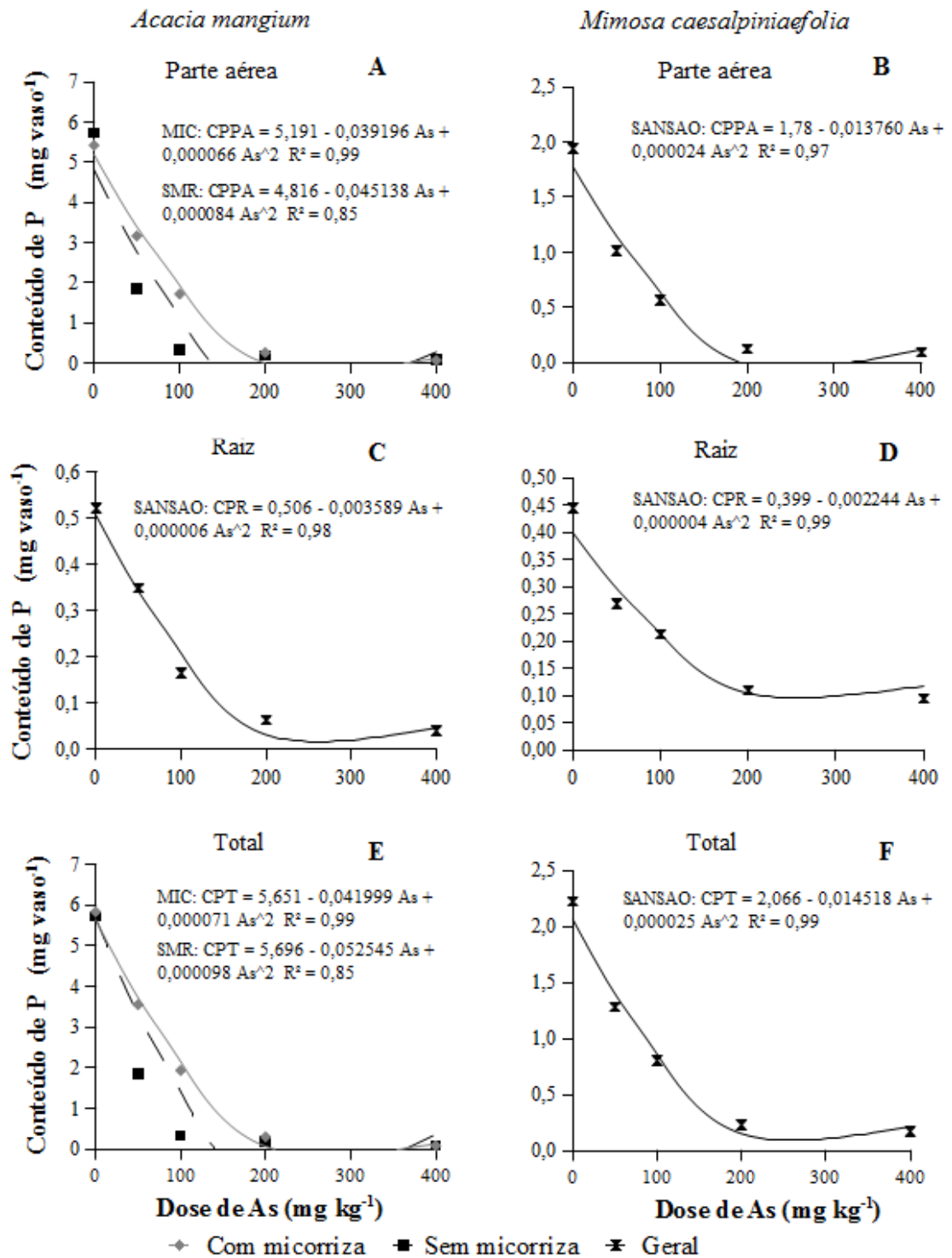
De todas as variáveis influenciadas pela dose de As, somente os teores de S na raiz apresentaram tendência de aumento à medida que se elevaram as doses de As (Figuras 15 a 20). De maneira geral, os três modelos testados foram suficientes para descrever satisfatoriamente o comportamento das variáveis em função da dose de As, à exceção do CSR de *M. caesalpiniaefolia* inoculada com micorriza (Figura 18D).



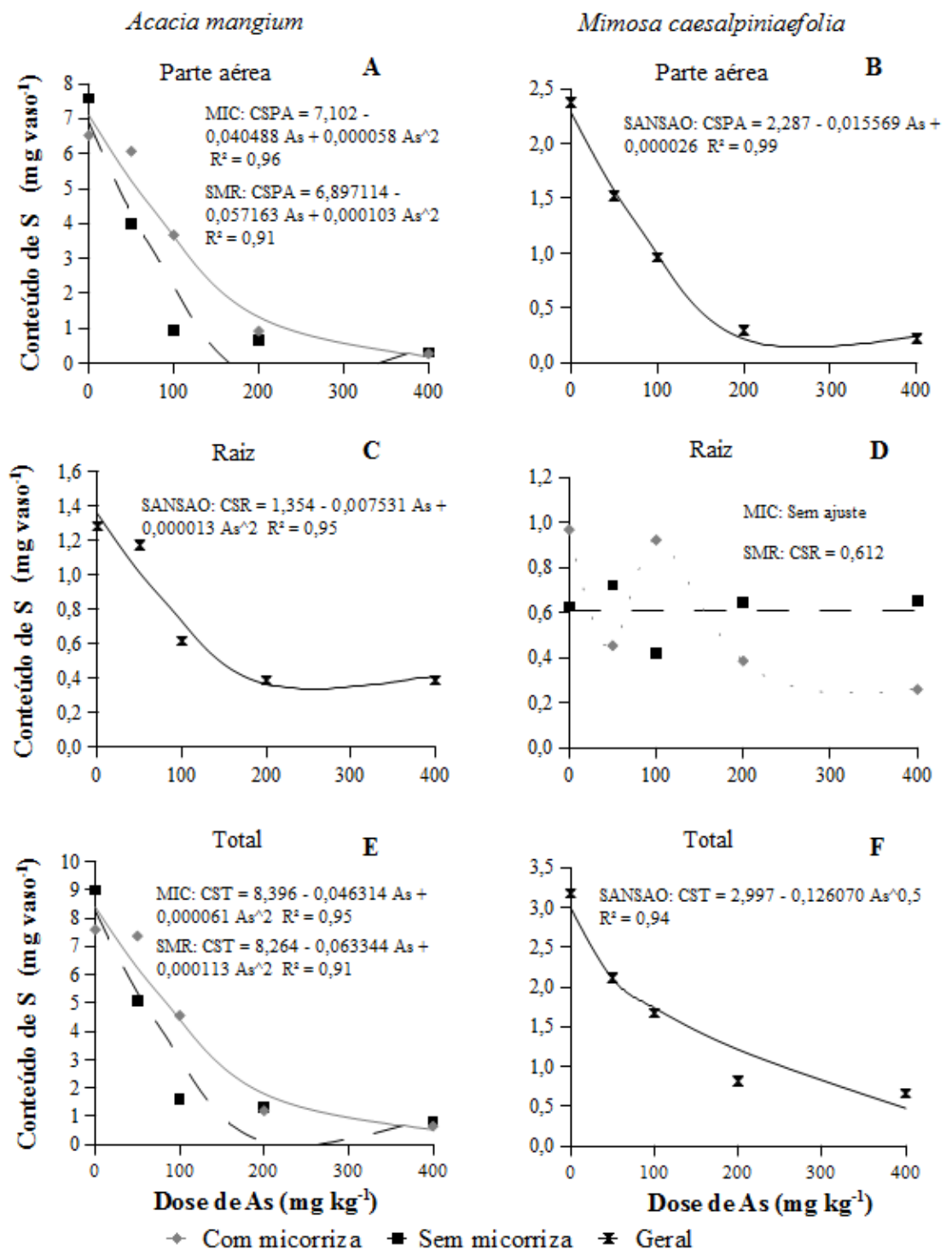
**Figura 15.** Teor de P na parte aérea (PPA) e na raiz (PR) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: Sem micorriza.



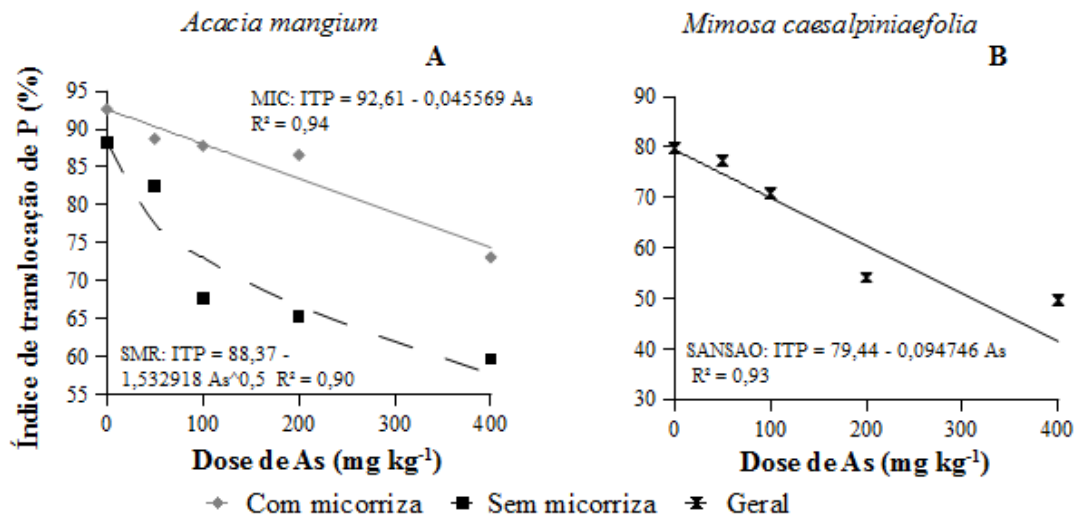
**Figura 16.** Teor de S na parte aérea (SPA) e na raiz (SR) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.



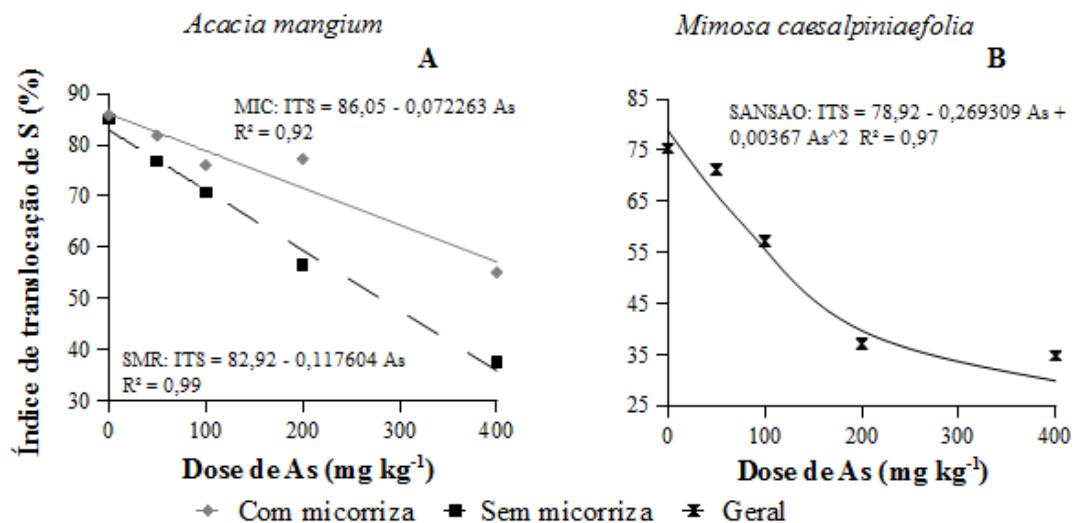
**Figura 17.** Conteúdo de P na parte aérea (CPPA), na raiz (CPR) e total (CPT) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.



**Figura 18.** Conteúdo de S na parte aérea (CSPA), na raiz (CSR) e total (CST) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.



**Figura 19.** Índice de translocação de P (ITP) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.



**Figura 20.** Índice de translocação de S (ITS) de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia* em função da dose de As. MIC: com micorriza. SMR: sem micorriza.

O efeito da micorrização também foi observado na absorção e acúmulo de P e S. Na *Acacia mangium* sob micorrização os teores de P na parte aérea (PPA) e o conteúdo de P e S na parte aérea e total foram, em geral, superiores aos do tratamento SMR (Figuras 15, 17 e 18). Contudo, os teores de S e P nas raízes do tratamento SMR foram, em média, inferiores aos do tratamento com micorriza (MIC; Figuras 15C e 16C). Isso se refletiu no aumento dos índices de translocação de P (ITP) e S (ITS) no tratamento MIC, em comparação ao SMR (Figuras 19A e 20A).

Com relação à *M. caesalpiniaefolia*, os efeitos da micorrização foram observados nos teores de P e S das raízes (Figuras 15D e 16D) e no conteúdo de S das raízes (Figura 18D). De maneira geral, o PR e o SR dos tratamentos com micorriza foram inferiores ao do tratamento SMR. Já o CSR variou em função da dose de A, porém, como mencionado anteriormente, nenhum dos três modelos testados se ajustou satisfatoriamente ao comportamento dessa variável.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o As afetou a morfologia e o metabolismo da *Acacia mangium* e da *Mimosa caesalpiniaefolia* de diversas maneiras, culminando em expressiva redução do crescimento, sendo que ambas as espécies apresentaram redução de crescimento superior a 80 % sob 400 mg kg<sup>-1</sup> As. De maneira geral, a *A. mangium* foi mais sensível à toxidez que a *M.caesalpiniaefolia*, como mostra a inclinação das curvas de matéria seca total em função da doses de As (Figura 9).

Dias et al. (2010), avaliaram o crescimento de *Cajanus cajan*, *Sesbania virgata* e *Leucena leucocephala* sob contaminação por As, utilizando doses de 50, 100 e 200 mg kg<sup>-1</sup> As em solo argiloso. Comparando-se as espécies arbustivas daquele trabalho (*S. virgata* e *L. leucocephala*) com a *M. caesalpiniaefolia*, verifica-se que a *M. caesalpiniaefolia* foi bem menos tolerante, especialmente nas doses superiores a 50 mg kg<sup>-1</sup> As, sendo o desempenho da *A. mangium* e de *C. cajan* ainda mais fraco. A *A. mangium* apresentou crescimento bastante inferior até mesmo em comparação a outras espécies arbóreas, como *Eucalyptus grandis* e *E. cloeziana* (Melo et al., 2010).

O arsênio disponível no substrato utilizado por Dias et al. (2010) e Melo et al. (2010) era bem superior ao do presente experimento, o que pode ser explicado pelo menor teor de argila daquele (41 %) em comparação a este (56 %), pois sabe-se que pequena variação no teores de argila e de óxidos se reflete em grande alteração na capacidade de adsorção de As do solo (Assis, 2010). Poder-se-ia esperar, portanto, melhor desempenho das espécies utilizadas neste experimento, visto que o solo poderia estar atuando como dreno de As, contribuindo para reduzir sua disponibilidade para as plantas.

Entretanto, comparar valores absolutos da disponibilidade de um elemento, especialmente os obtidos por meio de extratores ácidos, entre solos de diferentes granulometrias e mineralogias, não é adequado para classificar seu teor como “alto” ou “baixo”. Por exemplo, 10 mg dm<sup>-3</sup> de P disponível (Mehlich-1) pode ser considerado baixo para um solo arenoso porém alto para um solo argiloso, pois esse extrator é sensível ao poder tampão do solo (Novais et al., 2007). O mesmo pode ocorrer com o As ou algum metal pesado. A determinação de valores de referência para classificar o nível de contaminação dos solos, portanto, deve levar esse fato em consideração.

Dessa forma, mesmo o valor de As disponível sendo mais baixo para o substrato do presente estudo, em comparação com o de Dias et al. (2010) e Melo et al. (2010), o nível de contaminação pode ser similar. Com efeito, as doses de As aplicadas foram

similares. Assim, possivelmente, o pior desempenho da *A. mangium* e da *M. caesalpiniaefolia* é devido à maior sensibilidade dessas espécies à contaminação por As.

De fato, os efeitos negativos do As puderam ser verificados nos aspectos fisiológicos, nutricionais e anatômicos das plantas. Os sintomas de toxidez foram nítidos, especialmente a redução do crescimento (Figura 2). É importante observar o aumento da relação raiz/parte aérea (Figura 11), por mostrar que o crescimento da parte aérea é relativamente mais prejudicado que o da raiz.

A grande maioria das espécies, apresentam o mesmo comportamento da *Acacia mangium* e da *Mimosa caesalpiniaefolia* (Costa, 2007; Nascimento, 2007; Silva, 2008; Melo et al., 2009, 2010; Dias et al., 2010). Espécies mais resistentes, como a hiperacumuladora *Pteris vittata*, mostram comportamento inverso, ou seja, maior produção de parte aérea em detrimento das raízes (Liu et al., 2009). Espécies de tolerância intermediária, como *Psidium guineense*, *Schinus terebinthifolius* e *Borreria verticillata* podem apresentar ambos os comportamentos, porém, quando há aumento da RRPA, normalmente é menos expressivo que o verificado em espécies menos tolerantes (Costa, 2007; Silva, 2008).

O principal mecanismo de defesa das espécies não hiperacumuladoras à toxidez por As envolve o sequestro do elemento nos vacúolos das células radiculares, com participação de fitoquelatinas (Zhao et al., 2009). Dois fortes indícios indicam que isso ocorre para *A. mangium* e *M. caesalpiniaefolia*: 1) maior concentração de As nas raízes em relação à parte aérea (Figura 12) e 2) aumento do teor de S nas raízes (Figura 16) e, por conseguinte, menor translocação deste nutriente (Figura 20), que é constituinte fundamental das fitoquelatinas. Destarte, pode ser que a maior produção de raiz em relação à parte aérea seja uma resposta de defesa, garantindo maior sequestro de As e menor translocação para as folhas, o que evitaria maiores danos ao seu aparato fotossintetizante.

Já as plantas hiperacumuladoras possuem um mecanismo de defesa, que ainda não é completamente elucidado, mas envolve maior translocação do As para a parte aérea (Zhao et al., 2009). Consequentemente, a RRPA em função da concentração de As no meio para as plantas hiperacumuladoras não poderia ser igual ao das demais espécies. Ainda menos se sabe sobre as espécies de tolerância intermediária, que translocam boa parte do As para a parte aérea sem grande prejuízo de crescimento. Estudos nessa linha certamente contribuiriam para o entendimento dos processos envolvidos na fitorremediação de áreas contaminadas por As e para a seleção de espécies adequadas.

Neste trabalho, foi possível verificar algumas interações entre o As e o P em ambas as espécies. Primeiramente, o As reduziu a absorção de fósforo, visto que o teor de P diminuiu com o aumento da dose de As tanto na raiz como na parte aérea (Figura 15). Embora parte do efeito possa ser atribuída aos danos nas raízes, pode ter ocorrido competição entre o As e o P por sítios de absorção nas raízes, dado o teor de P disponível do solo ( $12,2 \text{ mg dm}^{-3}$ ) ser comparável ao de As em algumas doses.

Costa (2007), pelo contrário, observou aumento da absorção de P por *M. caesalpiniaefolia* sob concentrações de As de até  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  em solução nutritiva. Neste caso, é importante observar como os efeitos do As variam com as condições experimentais e estágio de desenvolvimento da planta. Por isso é necessária cautela ao se compararem resultados de diferentes experimentos. Além da interação entre os nutrientes e o As com o solo, que não ocorre em solução nutritiva, a presença de microrganismos e de outros elementos são alguns dos motivos que levam as plantas a responderem diferentemente à presença de As em hidroponia, em comparação com o solo (Zabludowska et al., 2009).

Citando outro exemplo, Ang et al. (2007) avaliaram o crescimento e a extração de As e alguns metais pesados por quatro espécies arbóreas, dentre elas *A. mangium*, em rejeito de mineração de ouro. Os pesquisadores verificaram que a *A. mangium* foi a espécie que apresentou maior crescimento e acúmulo de arsênio. No caso, além do substrato e do manejo serem diferentes, as avaliações foram feitas em árvores adultas. Talvez um melhor desempenho da *A. mangium* fosse obtido com maior adubação fosfatada, com o cultivo da espécie em época de maior insolação e com prolongação do período experimental.

Ainda com relação ao P, pôde-se observar redução do índice de translocação do nutriente com o aumento das doses de As. Pouco se sabe sobre o mecanismo de translocação do As, mas não há tanta afinidade entre ele e o mecanismo de translocação de P, como ocorre na absorção pelas raízes (Zhao et al., 2009). É provável que a menor translocação de P faça parte do mecanismo de defesa das plantas à toxidez por As, pois isso permitiria mitigar os danos às raízes (Singh & Ma, 2006) e obter melhor controle sobre o influxo de As (Santos et al., 2010).

De fato, os danos às raízes foram bastante severos, com redução de tamanho e de raízes laterais (Figura 2). As alterações anatômicas observadas nas raízes também são reflexo do efeito tóxico do arsênio. O colapso celular observado em raízes de plantas intoxicadas por As é resultado de estresse oxidativo, que está relacionado com a

peroxidação de lipídios (Singh et al., 2007). Assim, o acúmulo de compostos fenólicos e a excreção de mucilagem, podem ser formas de defesa das plantas ao estresse provocado pela contaminação por As, pois essas substâncias podem se ligar a intermediários de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao próprio As, reduzindo seus danos às células (Vaughn & Duke, 1984; Michalak, 2006).

Os sintomas descritos acima também foram observados em *Cajanus cajan* (Silva, 2008; Barbosa, 2009), *Borreria verticillata* e *Schinus terebinthifolius* (Silva, 2008), que apresentaram outros sintomas em comum aos da *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Acacia mangium*. Dentre eles, a morte de primórdios de raízes laterais (Figura 5) e a desorganização dos elementos de vaso (Figura 6). Não se conhecem as causas da desorganização das células do córtex, mas ela pode estar, assim como a morte de primórdios de raízes laterais, relacionada à interferência do As na divisão e na diferenciação celular. Dentre os efeitos do As na mitose, podem ser citados o aumento de aberrações cromossômicas (Mumthas et al., 2010) e do índice de c-mitose (Dho et al., 2010). Essas são, também, causas do menor crescimento radicular.

Um dos principais processos metabólicos, a fotossíntese, também é negativamente influenciado pelo As, como pôde ser observado na *A. mangium* (Figura 12). Nesse sentido, é de se esperar que o crescimento da plantas seja severamente prejudicado. Os efeitos do As na taxa fotossintética ( $A$ ) podem ser diretos, como o desaparecimento do aparato fotossintetizante e da cadeia transportadora de elétrons (Costa, 2007), ou indiretos, como a redução da síntese de ATP e da absorção de fósforo, entre outros. Em situações de estresse por metais, é possível ocorrer queda da taxa fotossintética por imparidade bioquímica, o que se refletiu no aumento da relação  $C_i/C_a$ , pois houve menor consumo de  $CO_2$ , e na queda da eficiência instantânea do uso da água ( $WUE$ ).

Do ponto de vista produtivo, para compensar a queda na  $WUE$ , a planta deveria ser capaz de aumentar sua taxa transpiratória, o que demandaria mais água no solo ou maior condutância estomática. Caso a planta não seja capaz de contornar esse efeito, como foi o caso da *A. mangium*, invariavelmente haverá queda de produtividade, da capacidade de fixação de carbono e sua aptidão para revegetação de áreas contaminadas por As será restrita.

Embora as trocas gasosas de *Mimosa caesalpiniaefolia* não tenham sido avaliadas neste trabalho, Costa (2007) observou, para essa espécie, redução na taxa fotossintética ( $A$ ), na condutância estomática ( $g_s$ ), na taxa transpiratória ( $E$ ) e na relação  $C_i/C_a$  em resposta ao As. Assim, percebe-se que o As também exerce efeitos negativos na

fisiologia de *M. caesalpiniaefolia*. Esse efeito negativo na fotossíntese tem grande influência sobre o processo de recuperação da área degradada. Menor taxa fotossintética significa menor capacidade para sequestrar carbono e diminuir a energia livre do ecossistema, ou seja, a produtividade primária potencial diminui. Isso reforça a necessidade de se desenvolverem métodos para remover ou, pelo menos, reduzir a disponibilidade do contaminante do solo.

A diminuição da taxa fotossintética também pode estar relacionada com a queda no teor de clorofila das folhas, o que foi observado para ambas as espécies na presença de micorriza, pela queda no índice SPAD (Figura 10). A clorose observada em *M. caesalpiniaefolia* (Figura 2) também é um forte indício desse efeito. O As pode inibir a síntese de clorofila, pois limita a disponibilidade de ácido  $\delta$ -aminolevulínico, um precursor do pigmento, dentre outros efeitos (Jain & Gadre, 1997). Além disso, a elevada concentração de As no citoplasma e conseqüente produção de ROS também pode contribuir para a redução do índice SPAD e o aparecimento de clorose, pois provoca degradação de clorofila, desestruturação do cloroplasto e desorganização dos tilacoides (Choudhury & Panda, 2004).

Como visto, o As foi extremamente prejudicial ao crescimento da *A. mangium* e da *M. caesalpiniaefolia*, por diversas causas. Embora não tenham influenciado sobremaneira o crescimento das plantas (Tabela 4), no aspecto nutricional e na absorção de As pôde-se observar influência da colonização micorrízica (Tabelas 7, 8 e 9).

Além da diminuição dos teores de As nas raízes de ambas as espécies, os fungos micorrízicos arbusculares contribuíram para aumentar a concentração de P na parte aérea da *A. mangium*, elevando os índices de translocação de P e As para essa espécie. Esses resultados são coerentes com os obtidos por Liu et al. (2005) em tomate e Liu et al. (2009) em *Pteris vittata*, entre outros (Smith et al., 2010). Essa maior translocação de As para a parte aérea se refletiu em maior queda do índice SPAD com o aumento da dose de As para os tratamentos com micorriza (Figura 10).

Além dos efeitos citados acima, a diminuição de acúmulo de As pelas plantas de ambas as espécies (Figura 13D e E) mostra que os fungos micorrízicos arbusculares podem interferir significativamente nos efeitos fitotóxicos do As e na capacidade de fitoestabilização de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia*. Todavia, resultados mais aprofundados no crescimento das plantas somente seriam obtidos com a prorrogação do tempo de cultivo.

## 6. CONCLUSÕES

- O As provoca danos morfofisiológicos em plantas de *Acacia mangium* e *Mimosa caesalpiniaefolia*, incluindo:
  - Morte do meristema apical e de primórdios de raízes, além de mudanças no desenvolvimento das células do sistema vascular, com consequente prejuízo do desenvolvimento radicular;
  - Redução do teor de clorofila, evidenciada pelo aparecimento de clorose e redução do índice SPAD;
  - Redução da taxa fotossintética e da eficiência instantânea do uso da água, com consequente redução da capacidade de fixação de carbono;
  - Redução de crescimento em ambas as espécies, comprometendo a capacidade de estabelecimento em sítios com níveis elevados de contaminação por As.
- Os teores elevados de As nas raízes de ambas as espécies indicam que elas podem ser eficazes no processo de fitoestabilização de áreas contaminadas com As, especialmente se forem encontradas formas de promover seu crescimento.
- Os fungos micorrízicos arbusculares por, reduzirem a absorção e acúmulo de As pelas plantas de ambas as espécies, podem reduzir a capacidade de sequestro de As. Contudo, isso poderia aliviar a toxicidade do elemento, permitindo maior crescimento. Estudos de longa duração são necessários para verificar essa hipótese.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H. Eficiência da absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 22, n. 1, p. 21-26, 1998.

APOSHIAN, H. Biochemical toxicology of arsenic. **Rev. Biochem. Toxicol.**, v. 10, p. 265, 1989.

ARRIAGADA, C. et al. Contribution of the saprobic fungi *Trametes versicolor* and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of Eucalyptus globulus. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6250-6257, 2009.

ASHER, C. J.; REAY, P. F. Arsenic uptake by barley seedlings. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 6, p. 459-466, 1979.

ASSIS, I. R. de. **Adsorção e disponibilidade de arsênio em solos com diferentes composições mineralógicas**. 2010. 73 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ATKINS, P.; JONES, L. **Chemistry: Molecules, Matter and Change**. 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Co., 1997. 886 p.

BAGYARAJ, D. J.; SREELAMULU, K. R. Preinoculation with VA mycorrhiza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizer. **Plant Soil**, v. 69, n. 3, p. 375-381, 1982.

BALL, A. S. Bioremediation. In: AHMAD, I.; HAYAT, S.; PICHTEL, J. **Heavy Metal Contamination of Soil: Problems and Remedies**. Enfield, UK: SP, 2005, p. 157-170.

BAÑUELOS, G. S. et al. Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. **J. Environ. Qual.**, v. 26, p. 639-646, 1997.

BARBOSA, A. P. **Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae)**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p. 53-88.

BUNDSCHUH, J. et al. Distribución de arsénico en la región sudamericana. In: BUNDSCHUH, J.; CARRERA, A. P.; LITTER M. (Ed.). **Distribución del arsénico en las regiones ibérica e iberoamericana**. Buenos Aires: CYTED, 2008. p. 137-186.

BURKEN, J. G.; SCHNOOR, J. L. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. **Environ. Sci. Technol.**, v. 31, p. 1399-1406, 1997.

BURKEN, J. G.; SCHNOOR, J. L. Distribution and volatilisation of organic compounds following uptake by hybrid poplar trees. **Int. J. Phytoremed.**, v. 1, p. 139-151, 1999.

BURITY, H. A. et al. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, p. 801-807, 2000.

CAILLE, N. et al. Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic-contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilisation. **Environ. Pollut.**, v. 132, p. 113-120, 2004.

CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. de (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: SOBRAD/UFV, 1998. p. 183-196.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. et al. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.

CAO, X.; MA, L. Q.; SHIRALIPOUR, A. Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator, *Pteris vittata* L. **Environ. Pollut.**, v. 126, p. 157-167, 2003.

CAPITANI, E. Toxicologia. In: DESCHAMPS, E.; MATSCHULLAT, J. (Org.) **Arsênio antropogênico e natural**: um estudo em regiões do Quadrilátero Ferrífero. Belo Horizonte: FEAM, 2007. p. 38-50.

CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; BURLO, F.; MATAIX BENEYTO, J. Effect of arsenite on the concentrations of micronutrients in tomato plants grown in hydroponic culture. **J. Plant Nutrit.**, v. 17, p. 1887-1903, 1994.

CARRASCO, J. A. et al. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. **Soil Biol. Biochem.**, v. 37, p. 1131–1140, 2005.

CHOUDHURY, S.; PANDA, S. K. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and arsenic phytotoxicity. **Current Science**, v. 87, p. 342-348, 2004.

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

CHRISTOPHERSEN, H. M. et al. No evidence for competition between arsenate and phosphate for uptake from soil by medic or barley. **Env. Int.**, v. 35, p. 485–490, 2009.

COSTA, A. C. **Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado**. 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CRUZ, A. F.; MARTINS, M. A. Transferência de nitrogênio entre plantas interconectadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). **R. Bras. Ci. Solo**, v. 21, p. 559-565, 1997.

DEKOE, T. Arsenic resistance in submediterranean *Agrostis* species. 1994. Tese (Ph. D.) - Free University of Amsterdam, Amsterdam.

DEPARTMENT OF HUMAN SERVICES – DHS. **Arsenic**. Oregon: DHS, 2002, 5 p. (Technical Bulletin – Health Effects Information). Disponível em: <<http://www.oregon.gov/DHS/ph/dwp/docs/fact/arsenic.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2009.

DANIELS, B. A.; SKIPPER, H. D. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: SCHENCK, N. C. (Ed.). **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1982. p. 29-35.

DHO, S. et al. Arsenate toxicity on the apices of *Pisum sativum* L. seedling roots: Effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules. **Environ. Exp. Bot.**, v. 69, p. 17-23, 2010.

DIAS, L. E. et al. Growth of seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), wand riverhemp (*Sesbania virgata* (Cav.) Pers.), and lead tree (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) in an arsenic-contaminated soil. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 34, p. 975-983, 2010.

DODD, J. C. Recent advances in understanding the role of arbuscular mycorrhizas in plant production. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBSCS, 1999. p. 687-704.

DONG, Y. et al. Arbuscular mycorrhiza enhanced arsenic resistance of both white clover (*Tritifolium repens* Linn.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants in an arsenic-contaminated soil. **Environ. Pollut.**, v. 155, p. 174-181, 2008.

DOUDS, D. D.; JANKE, R. R.; PETERS, S. E. VAM fungus spore populations and colonization of roots of maize and soybean under conventional and low-input sustainable agriculture. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v. 43, p. 325-335, 1993.

DUSHENKOV, V. et al. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. **Environ. Sci. Technol.**, v. 29, p. 1239-1245, 1995.

EHRlich, H. L. **Geomicrobiology**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1990. 646 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212 p.

EZAWA, T.; SMITH, S. E.; SMITH, F. A. P metabolism and transport in AM fungi. **Plant Soil**, v. 244, p. 221-230, 2002.

FARIA, S. M. de et al. Nodulação em espécies florestais, especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, 1999. p. 667-686.

FRANCESCONI, K. et al. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: A potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **Sci. Total Environ.**, v. 284, p. 27-35, 2002.

FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. de C. Fixação biológica de nitrogênio: alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, 1999. p. 577-596.

FREITAS, A. D. S. et al. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. **J. Arid Environ.**, v. 74, p. 344-349, 2010.

FRENCH, C. J.; DICKINSON, N. M.; PUTWAIN, P. D. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. **Environ. Pollut.**, v. 141, p. 387-395, 2006.

GALLI, U.; SCHÜEPP, H.; BRUNHOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 364-368, 1994.

GALLOWAY, J. N. et al. Nitrogen cycles: past, present and future. **Biogeochemistry**, v. 70, p. 153-226, 2004.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytol.**, v. 84, p. 482-500, 1980.

GLEBA, D. et al. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 5973-5977, 1999.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. C. et al. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environ. Pollut.**, v. 130, p. 317-323, 2004.

GRAHAM, P. H. Biological dinitrogen fixation: symbiotic. In: SYLVIA, D. M. et al. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. 2nd ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. p. 405-432.

GROSSL, P. R.; MATTHEW, J. E.; GRAFE, M. Biogeochemistry of arsenic in iron oxide systems. In: SUPERSOIL, 3, 2004, Sydney. **Annals...** Sydney: University of Sydney, 2004. 1 CD-ROM.

GUNES, A.; PILBEAM, D. J.; INAL, A. Effect of arsenic-phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. **Plant Soil**, v. 314, p. 211–220, 2009.

HARLEY, J. L.; HARLEY, E. L. A check-list of mycorrhiza in the British flora. **New Phytol. (Suppl.)**, v. 105, p. 1-102, 1987.

HARRINGTON, J. M. et al. A survey of a population exposed to high concentrations of arsenic in well water in Fairbanks, Alaska. **Am. J. Epidemiol.**, v. 108, p. 377-385, 1978.

HASEGAWA, H. The behavior of trivalent and pentavalent methylarsenicals in Lake Biwa. **Appl. Organomet. Chem.**, v. 11, p. 305-311, 1997.

IKE, A. et al. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes. **Chemosphere**, v. 66, p. 1670-1676, 2007.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY – IUPAC.  
“Heavy metals” - A meaningless term?. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

JAIN, M.; GADRE, M. (P.). Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymic activities in greening maize tissues. **Water Air Soil Pollut.**, v. 93, p. 109-115, 1997.

JANKONG, P.; VISOOTTIVISETH, P. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic-contaminated soil. **Chemosphere**, v. 72, p. 1092-1097, 2008.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. CRC Press: Boca Raton, FL, 1984. 315 p.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KERTULIS-TARTAR, G. M. et al. Phytoremediation of an Arsenic-Contaminated Site Using *Pteris vittata* L.: A Two-Year Study. **Int. J. Phytoremed.**, v. 8, p. 311-322, 2006.

KHAN, A. G. Mycorrhizoremediation - an enhanced form of phytoremediation. **J. Zhejiang Univ. SCIENCE B**, v. 7, p. 503-514, 2006.

KING, D. J. et al. Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four *Eucalyptus* species: Growth, arsenic uptake and availability after five years. **Sci. Total Environ.**, v. 406, p. 35-42, 2008.

KULPER, I. et al. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. **MPMI**, v. 17, n. 1, p. 6-15, 2004.

KUMAR, P. B. A. N. et al. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. **Environ. Sci. Technol.**, v. 29, p. 1232-1238, 1995.

LAMONT, B. Mechanisms for enhancing nutrient uptake in plants with particular reference to mediterranean South Africa and Western Australia. **Bot. Rev.**, v. 48, p. 597-689, 1982.

LEUNG, H. M.; YE, Z. H.; WONG, M. H. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils. **Environ. Poll.**, v. 139, p. 1-8, 2005.

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

LITTER, M. et al. Formas presentes de arsénico en agua y suelo. In: BUNDSCHUH, J.; CARRERA, A. P.; LITTER M. (Ed.). **Distribución del arsénico en las regiones ibérica e iberoamericana**. Buenos Aires: CYTED, 2008. p. 5-32.

LIU, Y. et al. Yield and arsenate uptake of arbuscular mycorrhizal tomato colonized by *Glomus mosseae*. **Environ. Int.**, v. 31, p. 867–873, 2005.

LIU, Y. et al. Growth and arsenic uptake by Chinese brake fern inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus. **Environ. Exp. Bot.**, v. 66, p. 435-441, 2009.

MA, L. Q. et al. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, v. 409, p. 579, 2001.

MACUR, R. E. et al. Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, p. 3676–3682, 2001.

MADEJÓN, P. et al. White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. **Environ. Pollut.**, v. 132, p. 145-155, 2004.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, v. 58, p. 201-235, 2002.

MANDAL, S. M. et al. Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: Isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic-contaminated field. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 54, p. 93-99, 2008.

MARTO, G. B. T. *Acacia mangium* (Acácia). 2007. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/acacia.mangium.asp>>. Acesso em: 19 jun. 2010.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995. 888 p.

MASSCHELEYN, P. H.; DELAUNE, R. D.; PATRICK, W. H. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. **Environ. Sci. Technol.**, v. 25, p. 1414-1419, 1991.

MEDINA, O. A.; KRETSCHMER, A. E.; SYLVIA, D. M. Growth response of field-grown Siratro (*Macroptilium atropurpureum* Urb.) and *Aeschynomene americana* L. To inoculation with selected vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Biol. Fertil. Soils**, v. 9, p. 54-60, 1990.

MEHARG, A. A. Variation in arsenic accumulation – hyperaccumulation in ferns and their allies. **New Phytol.**, v. 157, p. 25–31, 2003.

MEHARG, A. A.; CAIRNEY, J. W. G. Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. **Adv. Ecol. Res.**, v. 30, p. 69-112, 2000.

MEHARG, A. A.; MACNAIR, M. R. The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv and *Agrostis capillaris* L. **New Phytol.**, v. 119, p. 291-297, 1991.

MEHARG, A. A. et al. Biomass allocation, phosphorus nutrition and vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in clones of Yorkshire Fog, *Holcus lanatus* L (Poaceae) that differ in their phosphate uptake kinetics and tolerance to arsenate. **Plant Soil**, v. 160, p. 11-20, 1994.

MELLO, J. W. V. de; DIAS, L. E.; CORREA, M. L. T. Drenagem ácida: avaliação do potencial de ocorrência, mitigação e revegetação de substratos sulfetados. **Tópicos Ci. Solo**, v. 3, p. 401-430, 2003.

MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 33, p. 455-465, 2009.

MELO, R. F. et al. Behavior of *Eucalyptus grandis* e *E. cloeziana* seedlings grown in arsenic-contaminated soil. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 34, p. 985-992, 2010.

MENDES FILHO, P. F. et al. Evaluating the Potential of Forest Species Under “Microbial Management” for the Restoration of Degraded Mining Areas. **Water Air Soil Pollut.**, v. 208, p. 79-89, 2010.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Pol. J. Environ. Stud.**, v. 15, p. 523-530, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

MUMTHAS, S. et al. Effect of arsenic and manganese on cell division of green gram. **Int. J. Curr. Res.**, v. 2, p. 46-51, 2010.

NASCIMENTO, K. J. T. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio**. 2007. 36 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

NASCIMENTO, C. W. A. do; ACCIOLY, A. M. de A.; BIONDI, C. M. Fitoextração de metais pesados em solos contaminados: avanços e perspectivas. **Tópicos Ci. Solo**, v. 6, p. 461-497, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Arsenic in Drinking Water**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1999. 310 p.

NEWMAN, E. I. Mycorrhizal links between plants: Their functioning and ecological significance. **Adv. Ecol. Res.**, v. 18, p. 243-270, 1988.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.) **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p.471-537.

O'BRIAN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of structure principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi Pty LDT, 1981. 280 p.

PERYEA, F. J. Phosphate-induced release of arsenic from soils contaminated with lead arsenate. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 5, p. 1301-1306, 1991.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 55, p. 158-161, 1970.

PULFORD, I. D.; WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. **Environ. Int.**, Glasgow, v. 29, p. 529-540, 2003.

PULFORD, I. D.; DICKINSON, N. M. Phytoremediation technologies using trees. In: PRASAD, M. N. V.; SAJWAN, K. S.; NAIDU, R. (Ed.). **Trace Elements in the Environment: Biogeochemistry, Biotechnology, and Bioremediation**. CRC, 2005. p. 375-395.

REICHERT, F.; TRELLES, R. Yodo y arsénico en las aguas subterráneas. **Anal. Asoc. Quim. Argent.**, v. 9, p. 89–95, 1921.

REIS, V. M. et al. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p. 153-174.

RIBASKI, J. et al. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*)**: árvore de múltiplo uso no Brasil. Colombo, PR: EMBRAPA, 2003, 4 p. (Comunicado Técnico, 104).

RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A.; SALOMÃO, M. S. Uso de micorrizas e rizóbio em cultivos consorciados de eucalipto e sesbânia. I – Crescimento, absorção e transferência de N entre as plantas. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 4, p. 583-591, 2003.

SALIDO, A. et al. Phytoremediation of arsenic and lead in contaminated soil using Chinese brake ferns (*Pteris vittata*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). **Int. J. Phytoremed.**, v. 5, p. 89-103, 2003.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 643-668, 1998.

SALVAGIOTTI, F. et al. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, p. 1-13, 2008.

SANTOS, J. A. G.; GONZAGA, M. I. S.; MA, L. Q. Optimum P levels for arsenic removal from contaminated groundwater by *Pteris vittata* L. of different ages. **J. Haz. Mat.**, v. 180, p. 662-667, 2010.

SCHIPANSKI, M. E.; DRINKWATER, L. E.; RUSSELLE, M. P. Understanding the variability in soybean nitrogen fixation across agroecosystems. **Plant Soil**, v. 329, p. 379-397, 2010.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), 1991. 371 p.

SILVA, K. L. F. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. 2008. 109 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, S. da; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 12, 2006.

SINGH, N.; MA, L. Q. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. **Environ. Pollut.**, v. 141, p. 238-246, 2006.

SINGH, H. P. et al. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v. 53, p. 65-73, 2007.

SIQUEIRA, J. O.; POUYÚ ROJAS, E.; MOREIRA, F. M. S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solo com excesso de metais pesados. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 23, p. 569-580, 1999.

SMITH, R. A. H.; BRADSHAW, A. D. Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant populations. **Trans. Inst. Min. Metall.**, v. 81, p. 230-237, 1972.

SMITH, E.; NAIDU, R.; ALSTON, A. M. Arsenic in the soil environment: a review. **Advances in Agronomy**, v. 64, p. 149-195, 1998.

SMITH, S. E.; DICKSON, S.; SMITH, F. A. Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 28, p. 683-694, 2001.

SMITH, S. E. et al. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. **Plant Soil**, v. 327, p. 1-21, 2010.

SOARES, C. R. F. S. **Fosfato e micorriza arbuscular na toxicidade de metais pesados para a trema (*Trema micrantha* (L.) Blum.) e braquiária (*Brachiaria***

*decumbens* Stapf). 2004. 143 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SRIPRANG, R. et al. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. **J. Biotechnol.**, v. 99, p. 279-293, 2002.

SYLVIA, D. M. Mycorrhizal symbioses. In: SYLVIA, D. M. et al. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. 2nd ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. p. 263-282.

TARAFDAR, J. C.; MARSCHNER, H. Phosphatase activity in the rhizosphere of VA-mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. **Soil Biology Biochem.**, v. 26, p. 387-395, 1994.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.

TISDALL, J. M. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. **Plant Soil**, v. 159, p. 115-121, 1994.

TLUSTOŠ, P. et al. Variation in the uptake of arsenic, cadmium, lead, and zinc by different species of willows *Salix spp.* grown in contaminated soils. **Cent. Eur. J. Chem. Biol.**, v. 2, p. 254-275, 2007.

TROTTA, A. et al. Arbuscular mycorrhizae increase the arsenic translocation factor in the As hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. **Chemosphere**, v. 65, p. 74-81, 2006.

TU, C.; MA, L.Q. Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Plant Soil**, v. 249, p. 373-382, 2003.

VAHIDNIA, A.; VOET, G. B. van der; WOLFF, F. A. de. Arsenic neurotoxicity: a review. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 26, p. 823-832, 2007.

VANGRONSVELD, J.; ASSCHE, F. van; CLIJSTERS, H. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. **Environ. Pollut.**, v. 87, p. 51-59, 1995.

VAUGHN, K.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiol. Plantarum**, v. 60, p. 106-112, 1984.

VAZQUEZ, S. et al. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. **Water Air Soil Pollut.**, v. 177, p. 349-365, 2006.

VISOOTTIVISETH, P.; FRANCESCONI, K.; SRIDOKCHANA, W. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. **Environ. Pollut.**, v. 118, p. 453-461, 2002.

WANG, J. et al. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*: Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1552-1561, 2002.

WILCOX, H. E. Mycorrhizae. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **The plant root, the hidden half**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 731-765.

WOLFE-SIMON, F. et al. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. **Science**, 2 dez. 2010. No prelo. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/early/2010/12/01/science.1197258.full.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2010.

WOLFRAM ALPHA LLC. **Wolfram alpha computational knowledge engine**. Disponível em: <<http://www.wolframalpha.com/input/?i=heavy+metal>>. Acesso em: 25 ago. 2009.

WOOLSON, E. A. (Ed.). Arsenical Pesticides, **ACS Symposium Ser. 7**. American Chemical Society, Washington, D.C. 1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Arsenic and arsenic compounds**. 2nd ed. Environmental Health Criteria Series, n. 224, 2001. 187 p. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>>. Acesso em 5 ago. 2009.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v. 198, p. 97-107, 1998.

YANG, H. C. et al. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **J. Bact.**, v. 187, p. 6991–6997, 2005.

ZABŁUDOWSKA, E. et al. Search for a plant for phytoremediation – What can we learn from field and hydroponic studies? **Chemosphere**, v. 77, p. 301–307, 2009.

ZHAO, F. J., DUNHAM, S. J.; McGRATH, S. P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. **New Phytol.**, v. 156, p. 27-31, 2002.

ZHAO, F. J. et al. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytol.**, v. 181, p. 777-794, 2009.

ZUBERER, D. A. Biological dinitrogen fixation: introduction and nonsymbiotic. In: SYLVIA, D. M. et al. (Ed.). **Principles and applications of soil microbiology**. 2. ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. p. 373-404.