



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO SOLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

KAIO GRÁCULO VIEIRA GARCIA

POTENCIAL DE LEGUMINOSAS COLONIZADAS POR MICORRIZAS
ARBUSCULARES PARA REVEGETAÇÃO DE ÁREAS DE MINERAÇÃO DE
MANGANÊS

FORTALEZA

2019

KAIO GRÁCULO VIEIRA GARCIA

POTENCIAL DE LEGUMINOSAS COLONIZADAS POR MICORRIZAS
ARBUSCULARES PARA REVEGETAÇÃO DE ÁREAS DE MINERAÇÃO DE
MANGANÊS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo. Área de concentração: Química, Fertilidade e Biologia do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G199p Garcia, Kaio Gráculo Vieira.
Potencial de leguminosas colonizadas por micorrizas arbusculares para revegetação de áreas de mineração de manganês / Kaio Gráculo Vieira Garcia. – 2019.
105 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho.
1. Biorremediação. 2. Metais. 3. Microscopia . 4. Raios-X. 5. Micro-organismos. I. Título.
- CDD 631.4
-

KAIO GRÁCULO VIEIRA GARCIA

POTENCIAL DE LEGUMINOSAS COLONIZADAS POR MICORRIZAS
ARBUSCULARES PARA REVEGETAÇÃO DE ÁREAS DE MINERAÇÃO DE
MANGANÊS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo. Área de concentração: Química, Fertilidade e Biologia do Solo.

Aprovada em: 30/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando Felipe Ferreyra Hernandez
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José de Souza Oliveira Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roseano Medeiros da Silva
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

A Deus.

Aos meus pais, Valdete Sinezio e Damiana
Vieira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, saúde, conquistas, oportunidades e força para alcançar meus objetivos.

Aos meus Pais Valdete Sinezio Garcia, Damiana Vieira de Almeida e meu irmão Gustavo Krause Vieira Garcia, por todo amor, carinho, incentivo e apoio durante todas as etapas da minha vida.

À minha tia Maria de Fátima e minha prima Lorena Fernandes, pelo amparo e carinho em toda minha trajetória acadêmica na Universidade, os quais foram fundamentais para chegar até aqui.

A toda minha família (tios, tias, primos, primas, avôs – *in memoriam* e avós).

À minha namorada Jesyka Guedes, pelo amor, confiança, carinho, apoio, compreensão, atenção e por estar sempre ao meu lado, dividindo comigo momentos importantes de minha vida.

A Universidade Federal do Ceará (UFC) e a programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS), pela oportunidade de concluir o curso de mestrado e doutorado.

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

À Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES, a qual foi fundamental para realização desta pesquisa.

À Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) e o programa de Pós-Graduação em Manejo de Solo e Água (PPGMSA), em especial ao pesquisador Dr. José Franciscimar, por disponibilizar a infraestrutura do laboratório para realização das análises químicas e ao meu colega de doutorado Gustavo Henrique, pelo apoio e ajuda nas determinações analíticas realizadas.

Ao Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho, pela orientação, apoio, compreensão, dedicação, incentivo, ensinamentos, amizade conquistada e confiança na realização desse trabalho.

À toda banca examinadora (Prof^ª. Dra. Claudia Miranda Martins, Prof. Dr. Fernando Felipe Ferreyra Hernandez, Prof. Dr. José de Souza Oliveira Filho e Prof. Dr. Roseano Medeiros da Silva), pela contribuição no enriquecimento desse trabalho.

À Prof^ª. Dra. Vânia Felipe Freire Gomes, pela orientação no curso de mestrado no PPGCS, pelo incentivo, pelos ensinamentos e amizade conquistada durante toda minha trajetória acadêmica na Universidade Federal do Ceará.

Ao geólogo Ismael, por facilitar a concessão da área de manganês estudada.

A todos os colegas de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pelo convívio e amizade conquistada.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, Israel Pinheiro, Ericka Paloma, Danilo, Juliette, Júnior Tupinambá, Aldênia e Marcos Giovane, foi muito gratificante trabalhar com todos vocês.

Aos laboratoristas, Antônio José, Tavares, Crisanto e Fátima.

Aos funcionários do Departamento de Ciências do Solo, em especial, ao Edilson, Marilene e a Dona Helena, sempre zelosa e dedicada no cumprimento das suas atividades.

Enfim, a todos que contribuíram direto ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

O excesso de manganês (Mn) no solo pode provocar toxidez às espécies vegetais. Estratégias que mitiguem esse tipo de impacto são fundamentais em um processo de revegetação. Diante disso, objetivou-se: i) testar a eficiência de diferentes fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na promoção do desenvolvimento e tolerância de espécies leguminosas em um solo com níveis crescentes de manganês e ii) utilizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para investigar a capacidade das estruturas dos FMA em acumular Mn. Para isso, foram conduzidos três ensaios experimentais utilizando-se as espécies: *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Leucaena leucocephala* e *Acacia mangium*. O delineamento experimental para cada ensaio foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x4, considerando-se: quatro doses de Mn (0; 100; 200 e 400 mg kg⁻¹) e quatro tratamentos de inoculação (controle - não inoculado; *Claroideoglomus etunicatum*; *Acaulospora scrobiculata*; *Diversispora* sp.). Determinou-se a massa da matéria seca da parte aérea e raiz, teor de P na parte aérea e Mn na parte aérea e raiz, pH do solo após cultivo, percentual foliar de toxidez por Mn, densidade de esporos de FMA no solo, colonização micorrízica e Mn na superfície dos esporos de FMA, através do MEV e EDS. Os ensaios mostraram comportamento diferenciado das espécies leguminosas em função do aumento das doses de Mn e inoculação com FMA. Pelos resultados obtidos, podemos concluir que, as concentrações excessivas de Mn no solo causam fitotoxidez e inibem o desenvolvimento das espécies leguminosas. A inoculação com FMA atenua a toxidez induzida por Mn e maximiza o desenvolvimento das espécies leguminosas. Os benefícios proporcionados pelos FMA dependem da planta hospedeira e da concentração de Mn no solo. Os esporos dos FMA acumulam Mn em sua superfície, funcionando como uma barreira biológica para diminuir a fitotoxidez e aumentar a tolerância das espécies leguminosas ao Mn. A eficiência desse mecanismo é dependente da espécie de FMA e da planta hospedeira. Ao se considerar a tolerância das espécies leguminosas com base em sua biomassa e no percentual foliar de toxidez por Mn, as espécies *A. mangium* e *M. caesalpiniaefolia*, associadas ao FMA *Diversispora* sp. e *C. etunicatum*, respectivamente, apresentam maior tolerância a concentrações elevadas de Mn no solo, tornando-as, nesse estudo, as mais indicadas para futuras práticas de revegetação de áreas de mineração com excesso de Mn.

Palavras-chave: Biorremediação. Metais. Microscopia. Raios-X. Micro-organismos.

ABSTRACT

Excess manganese (Mn) in the soil can cause toxicity to plant species. Strategies that mitigate this type of impact are fundamental in a revegetation process. The objective of this study was to: i) test the efficiency of different arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in promoting the development and tolerance of legume species in a soil with increasing levels of manganese and ii) use scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS) to investigate the capacity of AMF structures to accumulate Mn. For this, three experimental tests were conducted using the species: *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Leucaena leucocephala* and *Acacia mangium*. The experimental design for each trial was completely randomized in a 4x4 factorial arrangement, considering: four doses of Mn (0; 100; 200 and 400 mg kg⁻¹) and four inoculation treatments (Control – not inoculated; *Claroideoglossum etunicatum*; *Acaulospora scrobiculata*; *Diversispora* sp.). It was determined the shoot and root dry matter mass, content of phosphorus in the shoot and Mn in the shoot and root, soil pH after cultivation, leaf toxicity percentage by Mn, AMF spore density in soil, mycorrhizal colonization and Mn on the surface of AMF spores, through SEM and EDS. The assays showed different behavior of the leguminous species as a function of the increase of Mn doses and inoculation with AMF. From the results obtained, we can conclude that, excessive concentrations of Mn in the soil cause phytotoxicity and inhibit the development of legume species. AMF inoculation attenuates the Mn-induced toxicity and maximizes the development of legume species. The benefits provided by AMF depend on the host plant and the concentration of Mn in the soil. AMF spores accumulate Mn on its surface, acting as a biological barrier to decrease phytotoxicity and increase tolerance of leguminous species to Mn. The efficiency of this mechanism is dependent on the AMF species and the host plant. When considering the tolerance of legume species based on their biomass and the percentage of Mn toxicity, the *A. mangium* and *M. caesalpiniaefolia* species, associated to the AMF *Diversispora* sp. and *C. etunicatum*, respectively, present a higher tolerance to high concentrations of Mn in the soil, making them, in this study, the most suitable for future revegetation practices of mining areas with excess Mn.

Keywords: Biorremediation. Metals. Microscopy. X Ray. Microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da área experimental. Fonte: Google Earth (2016); Morais (2014)	32
Figura 2 – Mapa da área de coleta de solo em Maracanaú-CE	33
Figura 3 – Esporos dos FMA utilizados nos experimentos (A - <i>C. etunicatum</i> ; B - <i>A. scrobiculata</i> e C - <i>Diversispora</i> sp.)	34
Figura 4 – Bandejas de plástico com capacidade para 128 células contendo substrato)....	36
Figura 5 – Esquema experimental dos ensaios realizados em casa de vegetação com sabiá, leucena e acácia	37
Figura 6 – Montagem do material para microscopia eletrônica de varredura (A – esporos em placa de Petri sobre papel de filtro; B - fixação dos esporos em <i>Stubs</i> com auxílio de fita condutora dupla face de carbono; C – microscópio eletrônico de varredura (modelo 450 FEG-FEI; D – obtenção de imagem e EDS no MEV.....	40
Figura 7 – MMSPA (A) e MMSR (B) de <i>M. caesalpiniaefolia</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições	42
Figura 8 – Comportamento do pH do solo após cultivo com <i>M. caesalpiniaefolia</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores representam a media de quatro repetições.....	43
Figura 9 – DESP de FMA no solo (A) e CM (B) de <i>M. caesalpiniaefolia</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.	46
Figura 10 – Teor de P na parte aérea de <i>M. caesalpiniaefolia</i> em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)	48
Figura 11 – Teor de Mn na parte aérea (A) e raiz (B) de <i>M. caesalpiniaefolia</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da	

figura representam a média de quatro repetições	50
Figura 12 – Mn na superfície dos esporos de FMA (Wt %) obtido pela técnica de EDS. Os valores são referentes aos esporos de FMA extraídos do solo com 400 mg kg ⁻¹ de Mn cultivado com <i>M. caesalpiniaefolia</i>)	52
Figura 13 – Micrografia eletrônica de varredura (MEV) e resultados da espectroscopia por dispersão de energia (EDS) em esporos de FMA (A- <i>C. etunicatum</i> ; B - <i>A. scrobiculata</i> ; C – <i>Diversispora</i> sp.) extraídos de solo com 400 mg kg ⁻¹ de Mn e cultivado com <i>M. caesalpiniaefolia</i>	54
Figura 14 – PFT de <i>M. caesalpiniaefolia</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.....	55
Figura 15 – Aspecto dos sintomas de toxidez foliar por manganês em plantas de <i>M. caesalpiniaefolia</i> aos 60 dias após o transplântio (A – 0 mg kg ⁻¹ de Mn, B – 100 mg kg ⁻¹ de Mn, C – 300 mg kg ⁻¹ de Mn e D – 400 mg kg ⁻¹ de Mn).....	56
Figura 16 – MMSPA de <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições	59
Figura 17 – MMSR de <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letra iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)	60
Figura 18 – Comportamento do pH do solo após cultivo com <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.....	61
Figura 19 – DESP de FMA na rizosfera de <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).....	63
Figura 20 – CM de <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro	

repetições	64
Figura 21 – Teor de P na parte aérea de <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letra iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).....	66
Figura 22 – Teores de Mn na parte aérea (A) e raiz (B) de <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.....	67
Figura 23 – Micrografia eletrônica de varredura de raiz de <i>L. leucocephala</i> corada e colonizada por <i>Diversispora</i> sp. em tratamento com 400 mg kg ⁻¹ de Mn. V = vesícula)	69
Figura 24 – Mn na superfície dos esporos de FMA (Wt %) obtido pela técnica de EDS. Os valores são referentes aos esporos de FMA extraídos do solo com 400 mg kg ⁻¹ de Mn cultivado com <i>L. leucocephala</i>	70
Figura 25 – Micrografia eletrônica de varredura (MEV) e resultados da espectroscopia por dispersão de energia (EDS) em esporos de FMA (A- <i>C. etunicatum</i> ; B - <i>A. scrobiculata</i> ; C - <i>Diversispora</i> sp.) extraídos de solo com 400 mg kg ⁻¹ de Mn e cultivado com <i>L. leucocephala</i>	72
Figura 26 – PFT de <i>L. leucocephala</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições	73
Figura 27 – Aspecto dos sintomas de toxidez foliar por Mn em plantas de <i>L. leucocephala</i> aos 60 dias após transplante (A – 0 mg kg ⁻¹ de Mn, B – 100 mg kg ⁻¹ de Mn, C – 300 mg kg ⁻¹ de Mn e D – 400 mg kg ⁻¹ de Mn).	74
Figura 28 – MMSPA (A) e MMSR (B) de <i>A. mangium</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições	77
Figura 29 – Comportamento do pH do solo após cultivo com <i>A. mangium</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores representam	

a media de quatro repetições	78
Figura 30 – DESP de FMA no solo (A) e CM (B) de <i>A. mangium</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.....	80
Figura 31 – Teor de P na parte aérea de <i>A. mangium</i> em função dos tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letra iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).....	82
Figura 32 – Crescimento das plantas de <i>A. mangium</i> sob inoculação com FMA no tratamento com adição de 400 mg kg ⁻¹ de Mn no solo.....	83
Figura 33 – Teor de Mn na parte aérea (A) e raiz (B) de <i>A. mangium</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições	84
Figura 34 – Mn na superfície dos esporos de FMA (Wt %) obtido pela técnica de EDS. Os valores são referentes aos esporos de FMA extraídos do solo com 400 mg kg ⁻¹ de Mn cultivado com <i>A. mangium</i>	85
Figura 35 – Micrografia eletrônica de varredura (MEV) e resultados da espectroscopia de por dispersão de energia (EDS) em esporos de FMA (A- <i>C. etunicatum</i> ; B - <i>A. scrobiculata</i> ; C – <i>Diversispora</i> sp.) extraídos de solo com 400 mg kg ⁻¹ de Mn e cultivado com <i>A. mangium</i>	87
Figura 36 – PFT de <i>A. mangium</i> em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições	88
Figura 37 – Aspecto dos sintomas de toxidez foliar por Mn em plantas de <i>A. mangium</i> aos 90 dias após o transplantio (A – 0 mg kg ⁻¹ de Mn, B – 100 mg kg ⁻¹ de Mn, C – 300 mg kg ⁻¹ de Mn e D – 400 mg kg ⁻¹ de Mn)	89
Figura 38 – Aspecto das plantas de <i>A. mangium</i> cultivadas na presença (200 mg kg ⁻¹) e ausência (0 mg kg ⁻¹) de Mn (A, B e C – plantas do tratamento controle apresentando distúrbios em sua fisiologia na presença de Mn e D - planta inoculada com FMA na ausência de Mn e sem a presença de distúrbios em	

sua fisiologia) 90

Figura 39 – Efeito no crescimento das plantas de *A. mangium* sob inoculação com FMA
no tratamento com adição de 400 mg kg⁻¹ de Mn no solo 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características químicas do solo coletado na Fazenda Raposa, Maracanaú-CE	33
Tabela 2 – Espécies de FMA e número de esporos que constituíram o inóculo	36
Tabela 3 – Resumo da análise de variância para os parâmetros massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR) de <i>M. caesalpinieafolia</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn.....	41
Tabela 4 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de densidade de esporos de FMA no solo (DESP FMA) e colonização micorrízica (CM) de <i>M. caesalpinieafolia</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn.....	44
Tabela 5 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R) de <i>M. caesalpinieafolia</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn.....	48
Tabela 6 – Resumo da análise de variância para o percentual foliar de toxidez (PFT) de <i>M. caesalpinieafolia</i> . sob inoculação com FMA e doses de Mn.	55
Tabela 7 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR) de <i>L. leucocephala</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn.....	58
Tabela 8 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de densidade de esporos de FMA no solo (DESP FMA) e colonização micorrízica (CM) de <i>L. leucocephala</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn	62
Tabela 9 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R) de <i>L. leucocephala</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn.....	65
Tabela 10 – Resumo da análise de variância para o percentual foliar de toxidez (PFT) de <i>L. leucocephala</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn	73
Tabela 11 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de massa da matéria	

seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR) de <i>A. mangium</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn	76
Tabela 12 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de densidade de esporos de FMA no solo (DESP FMA) e colonização micorrízica (CM) de <i>A. mangium</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn	79
Tabela 13 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R) de <i>A. mangium</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn.....	82
Tabela 14 – Resumo da análise de variância para o percentual foliar de toxidez (PFT) de <i>A. mangium</i> sob inoculação com FMA e doses de Mn.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMMRF	Australian Microscopy e Microanalysis Research Facility
C/N	Relação carbono / nitrogênio
CV	Coeficiente de Variação
DAS	Dias após a semedura
DAT	Dias após o transplante
DCS	Departamento de Ciências do Solo
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mn	Manganês
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFC	Universidade Federal do Ceará
Wt%	Weight %

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	HIPÓTESES	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	Áreas degradadas pela atividade de extração mineral	22
3.2	Revegetação em áreas de mineração	24
3.3	Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)	26
3.4	Estudos com microscopia eletrônica e microanálise de raios-X x FMA	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Localização e clima da área experimental	32
4.2	Solo	32
4.3	Espécies leguminosas cultivadas	34
4.4	Fungos micorrízicos arbusculares	34
4.5	Instalação, condução e delineamento experimental	35
4.6	Variáveis analisadas	38
4.6.1	<i>Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR)</i>	38
4.6.2	<i>Teor de fósforo (P) na parte aérea e manganês (Mn) na parte aérea e raiz</i>	38
4.6.3	<i>pH do solo após cultivo</i>	38
4.6.4	<i>Percentual foliar de toxidez (PFT)</i>	39
4.6.5	<i>Colonização micorrízica (CM)</i>	39
4.6.6	<i>Densidade de esporos de FMA no solo (DESP)</i>	39
4.6.7	<i>Manganês na superfície dos esporos de FMA através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)</i>	40
4.7	Análise estatística	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Experimento com <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.	41
5.2	Experimento com <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.	58
5.3	Experimento com <i>Acacia mangium</i> Willd.	76
6	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A exploração mineral é uma atividade de importância econômica mundial, entretanto, tem sido responsável por causar uma série de impactos ambientais, entre eles, a degradação dos ecossistemas e a perda da biodiversidade.

Na maioria dos casos, os baixos níveis de matéria orgânica, fertilidade do solo, pH ácido, má estruturação física e principalmente concentrações elevadas de metais pesados no solo, como o manganês (Mn), são os principais fatores que limitam o estabelecimento e desenvolvimento das espécies vegetais em áreas de mineração.

O Mn é um micronutriente considerado essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois participa de vários processos metabólicos e atua como cofator de uma variedade de enzimas consideradas de grande importância. Por outro lado, o excesso desse elemento no solo pode resultar em graves problemas de toxidez nas plantas. Várias são as formas pelas quais esse elemento pode atingir concentrações excessivas, dentre elas a atividade de mineração, principalmente, através da deposição de rejeitos.

A restauração natural em áreas sob essas condições é um processo considerado lento e que pode demandar uma grande quantidade de tempo. Assim, estratégias que mitiguem esse tipo de impacto tornam-se fundamentais na inicialização de um processo de revegetação.

Espécies de leguminosas que apresentam rápido crescimento usualmente têm sido consideradas estratégicas nesse tipo de prática, principalmente, por apresentarem características como elevada produção de biomassa com baixa relação C/N, formação de sistema radicular profundo e capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e de se associarem com fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Os FMA são capazes de melhorar o incremento de água e nutrientes, em especial os de baixa mobilidade no solo, como o fósforo (P). Além disso, frequentemente, tem sido relatado que os FMA atuam também na atenuação da toxidez proporcionada pelo excesso de metais no solo, como o Mn, em espécies vegetais, aumentando significativamente o sucesso em práticas de revegetação sob essas condições. Apesar disso, os mecanismos pelos quais os FMA conferem proteção às plantas contra a toxidez causada pelo excesso de metais pesados ainda não são totalmente esclarecidos.

Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho: i) testar a eficiência de diferentes FMA na promoção do desenvolvimento e tolerância de espécies de leguminosas em um solo com níveis crescentes de manganês e ii) utilizar a microscopia eletrônica de

varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para investigar a capacidade das estruturas dos FMA em acumular Mn, o que pode se constituir num dos mecanismos para conferir tolerância à planta ao excesso de Mn.

2 HIPÓTESES

A colonização por FMA proveniente de uma área de mineração de Mn é mais eficiente na promoção do desenvolvimento e tolerância de espécies leguminosas na presença de variadas concentrações desse metal no solo.

As estruturas dos FMA acumulam excessos de Mn do solo, reduzindo sua translocação para a parte aérea da planta colonizada.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Áreas degradadas pela atividade de extração mineral

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2008), área degradada é aquela que sofreu, em algum grau, perturbações em sua integridade, sejam elas de natureza física, química ou biológica. Já de acordo com o Manual de Diretrizes para Recuperação de Áreas Degradadas (IBAMA, 1990), a degradação de uma área ocorre quando a vegetação nativa e a fauna forem destruídas, removidas ou expulsas; a camada fértil do solo for perdida, removida ou enterrada, e a qualidade e regime de vazão do sistema hídrico alterado, juntamente com a inviabilização sócio-econômica da área.

Entre as principais consequências de um solo degradado, pode-se citar a redução da fertilidade, matéria orgânica, acidez, contaminação por metais pesados e compactação, refletindo assim de forma significativa na perda de habitat biológico, diminuição da capacidade de suporte da biomassa vegetal e conseqüentemente perda da biodiversidade (BATTY, 2005; ARAÚJO; MONTEIRO, 2007; TOKTAR *et al.*, 2016).

O setor de atividade mineral é considerado de grande importância na economia brasileira (BRIGIDA, 2014), tendo em vista a grande capacidade de geração de empregos, bem como o fornecimento de uma série de matérias-primas e bens de consumo. No caso do Mn, o Brasil destaca-se como o sexto maior produtor deste minério, com cerca de 2,95 milhões de toneladas em 2011. As principais reservas deste minério no Brasil estão concentradas nos estados de Minas Gerais (87%), Mato Grosso do Sul (6,5%), Pará (4,3%) e outros estados (2,2%) (IBRAM, 2012).

Sua principal utilização está relacionada com os processos de produção de aço, como elemento de liga, da qual cerca de 90% é destinado às siderúrgicas. No entanto, é também bastante utilizado no mercado de baterias, bem como na indústria química e na fabricação de algumas vitaminas. Apesar de sua grande importância, a atividade de mineração ainda é um dos setores da economia responsável por uma série de impactos ambientais, entre eles, a degradação do solo (LI, 2006).

Para iniciar o processo de exploração mineral de uma área é realizado um conjunto de operações que visa a retirada do minério do depósito mineral, sendo este conjunto denominado de “lavra” (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006). A abertura das minas a céu aberto, bem como a retirada da vegetação, escavações, movimentação das terras e a produção e deposição de pilhas de rejeito após o processo de beneficiamento são considerados os

principais fatores que causam a degradação no solo e conseqüentemente a mudança na paisagem local em uma área de mineração (KAPUSTA; SOBCZYK, 2015; CABRAL *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013).

Entre as principais conseqüências do processo de degradação nestas áreas estão as perdas de terras cultiváveis, florestas e pastagens, bem como a redução global de produtividade. Entre os efeitos indiretos podem ser citados a erosão do solo, a poluição do ar, da água e do solo, desastres geoambientais, perda de biodiversidade e conseqüente perda da riqueza econômica (JUÁREZ-SANTILLAN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013; TOKTAR *et al.*, 2016)

No Brasil, a extração de vários minerais, inclusive o Mn, tem contribuído com a liberação de rejeito e outros resíduos, os quais podem ser considerados como uma das principais fontes de contaminação do solo e da água (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006; HUANG *et al.*, 2014).

O Mn é um micronutriente considerado essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois participa de vários processos metabólicos e atua como cofator de uma variedade de enzimas consideradas de grande importância (MILLALEO *et al.*, 2010). Por outro lado, o excesso de Mn no solo pode resultar em graves problemas de toxidez nas plantas (GARCIA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2019). Além disso, concentrações excessivas de Mn nos tecidos vegetais, podem ainda, alterar vários processos, como a atividade enzimática, absorção, redistribuição e uso de outros nutrientes (SANTOS *et al.*, 2017).

De acordo com Li *et al.* (2007), áreas onde ocorrem a exploração de Mn frequentemente são acompanhadas de outros elementos metálicos, entre eles o Pb, Zn, Cd, Ni, Co e Fe, os quais podem ser liberados ao ambiente e dessa forma causar prejuízos ao crescimento das plantas.

Geralmente os resíduos que são liberados após o processo de beneficiamento da mineração de Mn são caracterizados por má estruturação física, deficiência de nutrientes e matéria orgânica, bem como uma baixa densidade de esporos de FMA (RIVERA-BECERRIL *et al.*, 2013).

Dessa mesma forma Garcia (2015), ao estudar o desenvolvimento de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. em uma área degradada pela mineração de Mn no município de Ocara-CE, constatou que no material proveniente do rejeito havia uma elevada concentração de Mn, bem como outras características químicas que podem tornar o ambiente desfavorável ao desenvolvimento de espécies vegetais.

Nesse aspecto, um ponto chave para revegetação bem sucedida nestes locais é a

seleção de espécies vegetais adequadas, especialmente aquelas endêmicas para área de mineração, que podem se constituir na melhor escolha (MADEJÓN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2008). Outro fator bastante relevante e que ainda tem sido dada pouca atenção é a aplicação de micro-organismos de forma complementar, ou seja, em conjunto com as espécies vegetais, com a função não só de melhorar as propriedades biológicas como também as condições de fertilidade, promovendo a imobilização de elementos metálicos nas estruturas dos FMA, diminuindo assim a translocação desses elementos para a parte aérea (LEYVAL *et al.*, 1997; CARNEIRO *et al.*, 2001; ROMÁN-DAÑOBEYTIA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015).

3.2 Revegetação em áreas de mineração

A mineração é uma atividade que já data de longos períodos e que tem contribuído para economia mundial. Por outro lado, é marcada por causar sérios danos ambientais ao longo do tempo.

De forma geral, áreas afetadas pela atividade de mineração são caracterizadas muitas vezes por uma ausência de vegetação, principalmente em função da falta de nutrientes, baixa estruturação do solo, acidez e toxicidade por metais pesados (BATTY, 2005).

Almeida e Sánchez (2005) definem a revegetação como uma prática que visa estabelecer ou restabelecer a cobertura vegetal em áreas degradadas. Nesta prática, a identificação, bem como a utilização de espécies vegetais tolerantes e adaptadas em áreas de mineração, mais especificamente contaminadas por metais, são de extrema importância (BATTY, 2005; ILUNGA *et al.*, 2015). Um outro aspecto relevante que deve ser considerado em programas dessa natureza é que tanto espécies vegetais nativas quanto não nativas podem ser utilizadas (MENDES FILHO, 2004). Apesar de ser reconhecido que a revegetação com espécies nativas possa aproveitar polinizadores e dispersores naturais para uma auto-regeneração, o uso de espécies não nativas é aceito quando puderem funcionar como condicionadoras do substrato em locais com baixa produtividade (FARIA; CHADA, 2016).

Além disso, o sucesso na prática de revegetação em áreas de mineração pode ser potencializado com o auxílio de algumas técnicas, entre elas a fitoestabilização (ILUNGA *et al.*, 2015). Essa técnica consiste na utilização de plantas com a capacidade de imobilizar um determinado contaminante no solo, geralmente metais, através da absorção e acumulação pelas raízes (VASCONCELLOS *et al.*, 2012), reduzindo dessa forma os riscos de lixiviação, mobilidade e entrada na cadeia alimentar.

Conesa *et al.* (2007) ressaltaram que a seleção de espécies vegetais com esse fim deve ser realizada em local específico, ou seja, na área em que se deseja recuperar, tendo em vista a tolerância e adaptação das espécies a estes locais. No entanto, caso a área não apresente recolonização natural, deve-se então dar preferência às espécies locais, aclimatadas à região (ANDRADE *et al.*, 2007). De acordo com Accioly e Siqueira (2000), plantas utilizadas nessa prática devem apresentar como características um sistema radicular profundo, rápido crescimento e uma boa produção de biomassa mesmo na presença de elevadas concentrações de metais, o que geralmente ocorre em áreas de mineração. Nesse sentido, o uso de espécies de leguminosas, principalmente aquelas que apresentam rápido crescimento, torna-se uma importante estratégia em práticas de revegetação em áreas degradadas pela mineração.

Longo *et al.* (2011), com objetivo de avaliarem as alterações em substratos degradados pela mineração de cassiterita após o plantio de espécies de leguminosas (*Crotalaria juncea*, *Cajanus cajan* e *Mucuna aterrima*) de forma conjunta, verificaram que o cultivo dessas espécies e sua posterior incorporação vem promovendo alterações graduais na atividade biológica dos solos. Os mesmos autores ressaltaram ainda a importância dessas espécies, principalmente em função de sua versatilidade de usos e ao seu papel na dinâmica dos ecossistemas, especialmente no que diz respeito ao suprimento e ciclagem do nitrogênio, razão pela qual vêm sendo utilizadas em práticas dessa natureza.

Araújo e Costa (2013), estudando o uso de leguminosas arbóreas visando a recuperação de áreas degradadas pela mineração de ferro, observaram que as espécies *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. e *Mimosa hostilis* Benth. apresentaram um maior potencial no acúmulo de massa da matéria seca da parte aérea, estimulando dessa forma a ciclagem de nutrientes.

Plantas leguminosas geralmente são caracterizadas por possuírem uma elevada produção de biomassa com baixa relação C/N e um sistema radicular profundo (SABADIN, 1984; MENEZES; LEANDRO, 2004). Além disso, a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em associação com bactérias do solo, bem como a de se associarem a FMA, fazem com que estas plantas sejam as mais indicadas em práticas de revegetação.

Mendes Filho *et al.* (2009), ao avaliarem o potencial de algumas espécies de leguminosas na recuperação de áreas degradadas pela mineração de cassiterita, observaram que as espécies nodulíferas *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. e *Schinus terebinthifolia* mostraram uma resposta positiva a adubação com composto orgânico na

presença de termofosfato e inoculação com micorríza arbuscular, caracterizada pelo aumento da altura das plantas e da massa da matéria seca da parte aérea.

Um dos principais objetivos da estabilização da cobertura vegetal em áreas degradadas pela atividade de mineração está relacionado com acúmulo de matéria orgânica, uma vez que essas áreas apresentam uma baixa quantidade de nutrientes. Nesse sentido, os resultados citados anteriormente por Mendes Filho *et al.* (2009) demonstraram a importância da escolha correta das espécies vegetais e do manejo de inoculação com os FMA, reforçando assim o importante papel na prática de revegetação.

Por outro lado, outra grande dificuldade na revegetação dessas áreas está relacionada com a toxicidade por metais pesados, entre eles o manganês (Mn). O Mn é um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, no entanto, sua acumulação em plantas ao exceder entre os níveis de 20-500 mg kg⁻¹ de peso de matéria seca, pode torná-lo fitotóxico (LI *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2013), produzindo, conseqüentemente, sintomas de toxidez tais como manchas de coloração marrom nas folhas mais velhas, clorose e necrose, deformação das folhas jovens e atraso no crescimento da planta (BALDISSEROTO *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2019).

Ao estudar o desenvolvimento de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. colonizada com micorrizas arbusculares em uma área degradada pela mineração de Mn, Garcia *et al.* (2017) verificaram que a inoculação com FMA proporcionou maior produção de massa da matéria seca da parte aérea e raiz e ausência de toxidez, em comparação com as plantas não colonizadas. Outro resultado de grande importância relatado por esses autores foi a caracterização dessa espécie vegetal como tolerante ao Mn em função do fator de translocação < 1, demonstrando, assim, o potencial desta espécie vegetal para uso em programas de fitoestabilização.

3.3 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Micorrizas arbusculares formam um grupo de fungos do solo pertencente ao filo Glomeromycota capazes de formar associações simbióticas com a maioria das plantas terrestres (SMITH; READ, 2008; BAUM *et al.*, 2015; KÖHL; VAN DER HEIJDEN, 2016). Esta simbiose é caracterizada pela formação de estrutura simbiótica nas raízes com colonização intracelular do córtex, formação de hifas enroladas e outras profusamente ramificadas (denominadas arbúsculos) e micélio extra-radicular que se estende além da rizosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CABRAL *et al.* 2010).

Estes fungos são conhecidos por melhorar a nutrição mineral, especialmente os elementos de baixa mobilidade no solo como é o caso do fósforo, cobre e zinco. No entanto, também possuem a capacidade de absorver outros nutrientes, como N, K, Ca e Mg, além de favorecer um melhor fornecimento de água, resultando conseqüentemente em um melhor crescimento e sobrevivência das plantas (SOLÍS-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2011; LENOIR *et al.*, 2016). Em retorno, até 20% do carbono fixado pela planta é transferido para o fungo (PARNISKE, 2008; LENOIR *et al.*, 2016).

Além disso, os fungos micorrízicos arbusculares são também um componente significativo nos ecossistemas por sua grande influência no crescimento e na adaptação de plantas a estresses bióticos e abióticos do solo (SMITH; READ, 2008; RAMOS *et al.*, 2011; COLODETE *et al.* 2014).

Diversos trabalhos científicos (CHEN *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2014; HASHEM *et al.*, 2016) têm demonstrado que os FMA atuam como um regulador importante no desenvolvimento de diversas espécies vegetais em áreas de mineração, inclusive as de metais pesados. De acordo com Hashem *et al.* (2016) a colonização com FMA pode resultar em alterações morfo-fisiológicas e nutricionais e conseqüentemente aumentar a resistência das plantas a estas condições.

Gomes *et al.* (2014), investigando a tolerância de *Anadenanthera peregrina*, uma leguminosa de porte arbóreo comumente chamada de “angico”, associada a FMA e matéria orgânica em solos contaminados com arsênio, constataram que a colonização micorrízica das raízes e a adubação com matéria orgânica pode reduzir a fitotoxicidade em função do aumento da concentração de arsênio na raiz colonizada, diminuindo sua translocação para a parte aérea. Lin *et al.* (2007), estudando a tolerância de três espécies leguminosas colonizadas com micorrizas arbusculares em um solo contaminado com metais pesados, observaram que as plantas micorrizadas aumentaram o acúmulo de P e de N, além de melhorar também a tolerância destas aos metais pesados, em decorrência de mecanismos como o efeito de diluição e a diminuição na absorção e translocação do metal da raiz para a parte aérea. Chen *et al.* (2007), pesquisando o efeito do FMA *Glomus mosseae* no crescimento e absorção de metal por quatro espécies de plantas em uma área de mineração de cobre, concluíram que a associação com FMA pode auxiliar no crescimento e sobrevivência das plantas, facilitando assim a nutrição mineral em rejeitos da mineração de cobre.

Outro aspecto relevante que esses autores destacaram é o fato desta associação simbiótica poder beneficiar o crescimento e colonização de plantas sensíveis a toxicidade por metais, o que conseqüentemente pode enriquecer a biodiversidade e a estabilização desses

ecossistemas. Chang *et al.* (2018), avaliando o efeito da simbiose micorrízica arbuscular no crescimento e absorção de metais em plantas de milho em solo enriquecido com lantânio e cádmio, demonstraram que a inoculação com FMA atenuaram a fitotoxidez combinada desses elementos às plantas de milho, o que sugere que esses micro-organismos podem ser eficientes em aumentar a tolerância das plantas em solos contaminados por metais. Resultados semelhantes foram obtidos por Garcia *et al.* (2018), ao trabalharem com *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. inoculada com FMA e cultivada em solo proveniente de área degradada pela mineração de Mn. Sugerem os autores que as plantas colonizadas por FMA apresentaram menor translocação de Mn da raiz para a parte aérea, o que resultou em maior tolerância ao excesso desse elemento.

Apesar de todos esses resultados, os mecanismos pelos quais os FMA conferem proteção às plantas contra a toxidez causada pelos metais pesados ainda não foram bem elucidados.

Vários mecanismos de desintoxicação de metais pesados envolvendo plantas e FMA são descritos na literatura (CABRAL *et al.*, 2015). Entre os mais citados estão: diluição em tecidos vegetais devido ao crescimento das plantas (CHRISTIE *et al.*, 2004; SCHNEIDER *et al.*, 2013); redução na absorção devido a retenção e imobilização em certas estruturas fúngicas e raízes micorrizadas (GONZALEZ-CHAVEZ *et al.*, 2002); quelação dos metais por compostos secretados pelos FMA, como por exemplo a glomalina (VODNIK *et al.*, 2008; LEUNG *et al.*, 2013); agentes quelantes no citossol incluindo o uso de metalotioneínas (plantas e fungos), que são proteínas de ligação a metais sintetizadas em ampla gama de organismos sob exposição a concentração tóxicas de metais (KUMAR *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2015); apreensão nos vacúolos de plantas e células fúngicas (BERTOLAZI *et al.*, 2010) e imobilização temporária em função do transporte através das hifas (CARNEIRO *et al.*, 2001).

Além destes, existem relatos de que os FMA podem interagir com diferentes grupos de bactérias no solo e modificar a comunidade microbiana na rizosfera (SOLÍS-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2011), atuando em alguns casos na disponibilidade de metais pesados, como por exemplo o Mn (NOGUEIRA; CARDOSO, 2002). Nesse mesmo contexto Kothari *et al.* (1991) observaram uma diminuição de bactérias redutores de Mn na rizosfera de plantas micorrizadas, o que coincidiu com uma diminuição da concentração de Mn nas plantas.

É interessante também ressaltar que o acúmulo de metais pesados ao longo do tempo pode resultar em uma pressão de seleção nos FMA tornando-os mais resistentes (MIRANSARI *et al.*, 2011). Nesse sentido, tendo em vista a resistência, a inoculação de FMA

nativos isolados a partir de ambientes contaminados, pode apresentar um maior potencial no desempenho das plantas em termos de crescimento e na tolerância em ambientes com excesso de metais (CARRASCO *et al.*, 2011; MIRANSARI *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura científica sobre micorrizas arbusculares e tolerância a metais pesados, Hildebrandt *et al.* (2007) relataram resultados em que um isolado de FMA *Glomus intraradices* Br1, proveniente de um solo contaminado com metais pesados, conferiu maior tolerância a uma variedade de plantas quando comparado a outro isolado originário de solo não contaminado. Em um estudo realizado por Leyval *et al.* (1997), investigando a ocorrência e infectividade de FMA em alguns solos influenciados por metais pesados, constataram que esporos isolados a partir de uma área contaminada com zinco apresentaram maior percentual de germinação em solo contaminado por metais pesados em comparação com esporos de uma área não contaminada.

Outros autores como Gaur e Adholeya (2004) e Schneider *et al.* (2013) sugeriram que FMA nativos isolados de áreas impactadas tornam-se uma estratégia de grande importância em programas de fitorremediação, tendo em vista que estes isolados podem ser mais eficazes na promoção do crescimento das plantas e atenuação de toxidez. Orłowska *et al.* (2013) observaram diferenças entre FMA nativos, adaptados a maiores concentrações metálicas, e não nativos de solos não contaminados, confirmando-se o fato de que os FMA nativos isolados de áreas contaminadas apresentaram maior eficiência na acumulação de elementos metálicos quando comparado aos de áreas não contaminadas.

Dessa forma, é de suma importância os estudos com FMA nativos ou introduzidos, uma vez que podem vir a se constituir numa potencial ferramenta biotecnológica para inoculação de plantas em ecossistemas alterados como, por exemplo, em áreas de mineração as quais muitas vezes são caracterizadas pela escassez de nutrientes, acidez elevada e alta concentração de metais pesados.

3.4 Estudos com microscopia eletrônica e microanálise de raio-X x FMA

Recentemente a utilização de FMA com intuito de conferir proteção às plantas em ambientes sob condições de estresse, como por exemplo em áreas de mineração de metais pesados, tem recebido muita atenção. Como citado no tópico anterior, vários são os mecanismos pelos quais os FMA podem atuar nessa proteção as plantas em ambientes com metais pesados. No entanto, vários autores (SIQUEIRA *et al.*, 1999; SUDOVA; VOSÁTKA, 2007; CABRAL *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2016) destacaram que

apesar de já existir inúmeras pesquisas tais mecanismos ainda não estão bem esclarecidos. Neste sentido, a busca por novas ferramentas que possam ajudar a elucidar esses mecanismos torna-se prioritária.

Nos últimos anos o aprimoramento de lentes de aumento, bem como dos próprios microscópios, e do desenvolvimento de novas técnicas para o preparo de amostras microbiológicas, disponibilizaram excelentes ferramentas para o aprofundamento de pesquisas nas diversas áreas das ciências, principalmente na área biológica (LEMP, 2007).

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi introduzido como um instrumento de pesquisa por volta de 1957 e sua utilização é responsável por várias contribuições no mundo científico. Esta ferramenta utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID, 2007), revelando assim maiores níveis de detalhes e complexidade do que a microscopia de luz transmitida (AMMRF, 2016).

Além disso, a microscopia eletrônica pode contar com um sistema de microanálise de raio-X, uma técnica capaz de analisar de forma qualitativa e quantitativa a composição química de uma determinada amostra (AMMRF, 2016).

Weiersbye *et al.* (1999), estudando a utilização da microscopia eletrônica e microanálise de emissão de raios-X induzida por partícula (PIXE), visando mensurar e mapear a concentração de elementos químicos em esporos de FMA isolados de uma área de rejeito da mineração de ouro e urânio, observaram uma concentração mais elevada de Cr, Fe, Ni, Cu, Y, Th e U em esporos isolados da área do rejeito do que os esporos de um solo natural adjacente. Esses mesmos autores relataram ainda que o sequestro desses metais nas estruturas dos FMA pode limitar a disponibilidade e conseqüentemente a toxidez para a planta hospedeira.

González-Guerrero *et al.* (2008) ao pesquisarem a localização ultra-estrutural dos metais pesados no micélio extrarradicar e esporos do FMA *Glomus intraradices*, utilizando a microscopia eletrônica associado a microanálise de espectroscopia de raios-X por dispersão de energia, concluíram que houve um acúmulo de metais pesados principalmente na parede celular e nos vacúolos, enquanto que pequenas alterações na concentração de metais foram detectadas no citoplasma, sugerindo assim que a ligação dos metais com a parede celular e compartimentalização em vacúolos podem ser mecanismos essenciais para desintoxicação dos metais no solo.

Orlowska *et al.* (2013), investigando a influência da colonização micorrízica na

distribuição de elementos metálicos em raízes de uma hiperacumuladora de Níquel e fazendo uso também de microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios-X, observaram que na região das raízes onde estava localizada as estruturas micorrízicas ocorreram as maiores concentrações de Zn.

Neste sentido, a utilização da microscopia eletrônica de varredura associada a microanálise de raios-X tem demonstrado ser uma ferramenta fundamental na análise de amostras biológicas, bem como para investigação de alguns mecanismos inerentes aos FMA na proteção contra toxidez por metais pesados, inclusive o Mn, em plantas. Todavia, no Brasil, estudos com essa finalidade ainda são bastante escassos, necessitando assim de mais pesquisas voltadas para este fim.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização e clima da área experimental

Os três experimentos realizados (*Mimosa caesalpiniaefolia*, *Leucaena leucocephala* e *Acacia mangium*) foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Ciências do Solo (DCS) da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizada no Campus do Pici, Fortaleza, Ceará (3°45'47" de latitude sul e 38°31'23" de longitude oeste, altitude média de 47m) (Figura 1). O clima da região é classificado como tropical, quente com temperatura e precipitação média anual de 27 °C e 1600 mm respectivamente, sendo caracterizado por Köeppen como do tipo Aw'.

Figura 1 – Localização da área experimental. Fonte: Google Earth (2016); Morais (2014).

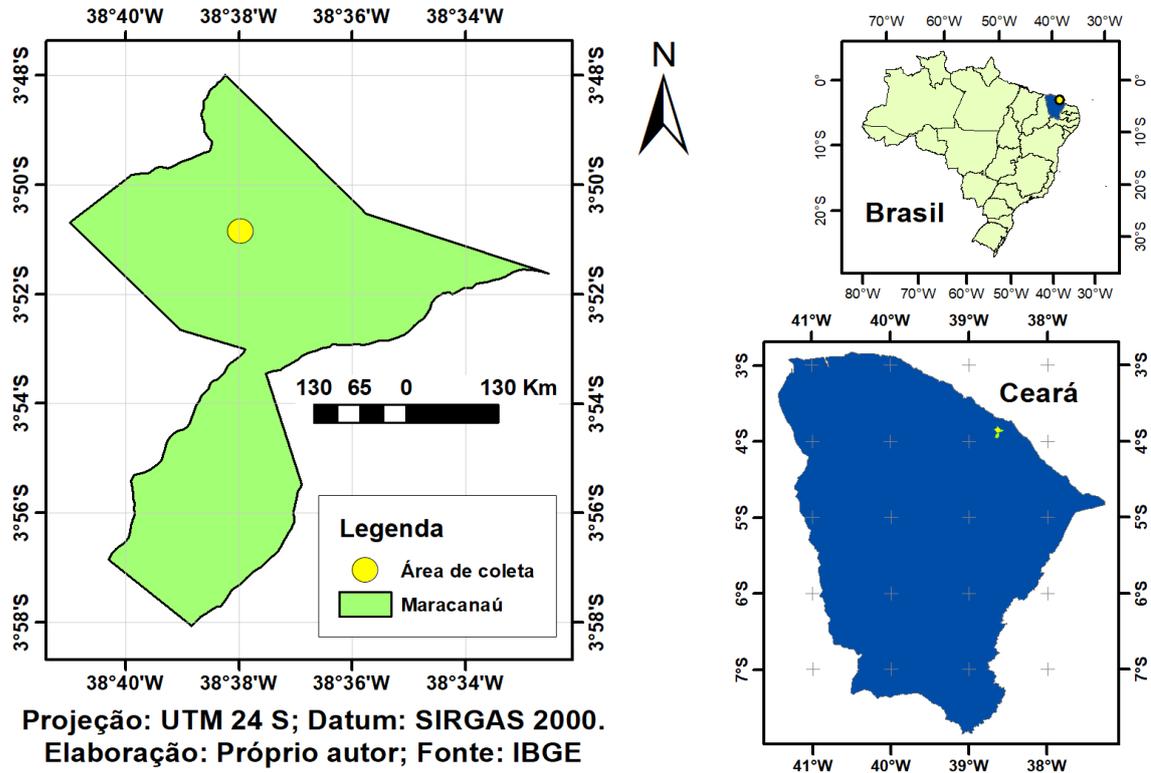


Fonte: o autor

4.2 Solo

O solo utilizado no experimento para o crescimento das plantas foi classificado como ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO e foi coletado de uma camada superficial (0-20 cm) em uma área de mata nativa, pertencente a Fazenda Experimental Raposa, de propriedade da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizada no município de Maracanaú, Ceará, Brasil (3°50'66" S e 38°38'38" W) (Figura 2).

Figura 2 – Mapa da área de coleta de solo em Maracanaú-CE.



Fonte: o autor

A escolha por tal solo foi fundamentada em função da baixa quantidade de Mn disponível, o que permitiu avaliar as respostas a adição de doses crescentes de Mn na forma de cloreto.

Após a coleta, foi realizado um peneiramento do solo em malha de 2 mm, visando a retirada de partículas grosseiras. Posteriormente o solo foi autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão por duas horas, para eliminação da microbiota nativa. As características químicas (Tabela 1) do solo foram obtidas em Laboratório de Solo, Água e Planta da UFC, seguindo os referenciais metodológicos de Silva (2009).

Tabela 1 - Características químicas do solo coletado na Fazenda Raposa, Maracanaú-CE.

pH	Al	Ca	Mg	Na	K	H+Al	P	N	Mn	Fe	Cu	Zn
(H ₂ O)	----- (cmolc/kg) -----						(mg/kg)	(g/kg)	----- (mg/kg) -----			
5,0	0,4	0,8	0,5	0,11	0,16	4,1	1,3	0,1	8,8	54,8	0,2	3,5

Fonte: o autor

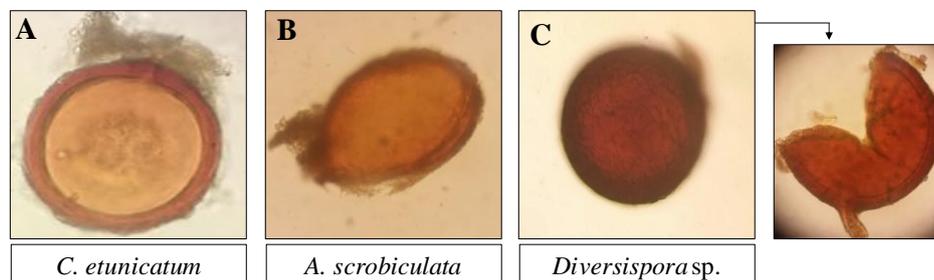
4.3 Espécies leguminosas cultivadas

As espécies utilizadas neste estudo foram: *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. (Sabiá), *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leucena) e *Acacia mangium* Willd. (Acácia). Essas espécies foram escolhidas por terem apresentado resultados promissores na revegetação de áreas degradadas pelo processo de mineração (SOARES *et al.*, 2001; LINS *et al.*, 2007; MENDES FILHO *et al.*, 2009; GARCIA, 2015) e contaminadas com metais pesados (MARQUES *et al.*, 2000; CIPRIANI *et al.*, 2013).

4.4 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Foram utilizados três isolados de FMA: i) *Claroideoglobus etunicatum*; ii) *Acaulospora scrobiculata* e iii) isolado de FMA nativo de solo com excesso de Mn, identificado como *Diversispora* sp. (Figura 3).

Figura 3 – Esporos dos FMA utilizados nos experimentos (A - *C. etunicatum*; B - *A. scrobiculata* e C - *Diversispora* sp.)



Fonte: o autor

O FMA nativo (*Diversispora* sp.) foi isolado de uma área de mata nativa, pertencente a uma mina de Mn, com alta concentração desse elemento, localizada no município de Ocara-CE. Os outros dois isolados utilizados (*C. etunicatum* e *A. scrobiculata*) são provenientes de solo não contaminados por metais pesados. A escolha destes ocorreu em função dos bons resultados observados por Garcia *et al.* (2017) em solo com elevada concentração de Mn e por Klauberg-Filho *et al.* (2002) em solo contaminado com Zn, Cu, Cd e Pb.

Todos os FMA foram propagados utilizando-se plantas de milho (*Zea mays* L.) como cultura armadilha, cultivadas em areia esterilizada em autoclave (121°C e 1 atm de pressão por duas horas) e mantidos em casa de vegetação até a utilização no experimento.

4.5 Instalação, condução e delineamento experimental

O solo foi distribuído em vasos com capacidade para 1,5 kg para cultivo das espécies sabiá, leucena e acácia, sendo utilizado 1,2 kg de solo por vaso, respectivamente.

A adubação de correção foi realizada com base nos resultados da análise química obtida no laboratório, conforme adaptação da recomendação do Manual de Adubação e Calagem para Estado do Ceará (AQUINO *et al.*, 1993). A calagem foi realizada conforme procedimento descrito por Raij *et al.* (1996), calculando a quantidade de calcário a ser adicionada através do método de saturação por bases, visando um V% final de 50, para que o aumento de pH não tornasse indisponível o Mn adicionado. Para isso, foi adicionado 0,67 g/vaso de calcário dolomítico PRNT 95%. Após 10 dias de incubação foi feita a adubação com 55 mg kg⁻¹ de N (NH₂CONH₂), 12 mg kg⁻¹ de P (Ca(H₂PO₄)₂.H₂O) e 100 mg kg⁻¹ K (KCl), misturados ao solo. Após a adubação, foram adicionadas ao solo doses crescentes de Mn visando simular situações variando de baixa a alta disponibilidade deste elemento. As doses de Mn utilizadas foram: 0; 100; 200; 400 mg kg⁻¹, fornecidas na forma de cloreto de Mn (MnCl₂.H₂O).

As sementes de sabiá foram adquiridas na empresa Biosementes[®] e as de acácia na empresa Caiçara Sementes[®]. As sementes de leucena foram doadas pelo setor de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Todas as sementes foram desinfectadas pela imersão em uma solução aquosa de hipoclorito de sódio (5% durante 5 minutos). Após a desinfecção as sementes foram lavadas por cinco vezes em água destilada estéril para remoção de resíduos de hipoclorito.

Posteriormente, realizou-se a quebra de dormência das sementes utilizadas. Para isso, as sementes de sabiá passaram por processo de escarificação mecânica, realizado pela própria empresa que forneceu o material. As sementes de leucena foram imersas em água a 80 °C por 5 min, enquanto que as de acácia foram imersas em água a 100 °C por 1 min e colocadas em água a temperatura ambiente por 24 h.

O preparo das mudas foi realizado em bandejas de plástico com capacidade de 128 células, colocando-se duas sementes por célula na profundidade de 2 cm. O substrato utilizado para produção das mudas em bandeja foi areia lavada e vermiculita autoclavada (121°C e 1 atm de pressão por duas horas) (Figura 4). Com 11 dias após a semeadura (DAS), foi realizado o desbaste em cada célula, selecionando-se a planta mais vigorosa. Esse procedimento foi adotado para as três espécies vegetais em estudo.

Figura 4 – Bandejas de plástico com capacidade para 128 células contendo substrato.



Fonte: o autor

Após o estabelecimento da germinação, os FMA foram inoculados nas mudas pela adição de 40 g de solo-inóculo, contendo esporos e fragmentos de raízes de milho (*Zea mays* L.) colonizadas pela espécie *Claroideoglopus etunicatum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Diversispora* sp.. A inoculação foi realizada no momento do transplante das mudas para os vasos plásticos de acordo com cada tratamento proposto no experimento, sendo depositado a aproximadamente 4 cm abaixo da superfície do solo contido no recipiente. De modo prévio, foi realizado uma contagem dos esporos que constituíram o solo inóculo (Tabela 2).

Tabela 2 - Espécies de FMA e número de esporos que constituíram o inóculo.

Espécie FMA	Número de esporos (40 g de solo)
<i>Claroideoglopus etunicatum</i>	446
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	310
<i>Diversispora</i> sp.	560

Fonte: o autor

Com o objetivo de padronizar a comunidade microbiana no solo foi adicionado 10 mL de um “filtrado” proveniente do mesmo solo utilizado no experimento (não autoclavado), sem a presença de propágulos de FMA.

Cada vaso recebeu duas mudas (Figura 5), sendo realizado o desbaste 8 dias após a semeadura, deixando-se uma planta por vaso.

Figura 5 – Esquema experimental dos ensaios realizados em casa de vegetação com sabiá, leucena e acácia.



Fonte: o autor

As plantas foram irrigadas diariamente com água da Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE) durante todo o período do experimento que foram de 60 dias após o transplântio (DAT) para o sabiá e leucena e, 90 DAT para acácia.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x4, considerando-se: i) quatro doses de manganês (0; 100; 200; 400 mg kg⁻¹); ii) quatro tratamentos de inoculação (controle - não inoculado; *Claroideoglomus etunicatum*, *Acaulospora scrobiculata*; *Diversispora* sp.), com quatro repetições, constituindo 64 unidades experimentais para cada experimento. As variáveis colonização micorrízica e densidade de esporos de FMA foram analisadas como fatorial 4x3, visto que o controle (não inoculado) não foi considerado na análise.

4.6 Variáveis analisadas

Aos 60 DAT para as espécies sabiá e leucena e 90 DAT para a acácia foram determinados:

4.6.1 Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e da raiz (MMSR)

Após o período de condução do experimento as plantas foram seccionadas rente ao solo e separadas em parte aérea (folhas + caule) e sistema radicular. Em seguida as amostras de parte aérea e sistema radicular foram acondicionadas em sacos de papel identificados e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 65°C até atingir massa constante. Posteriormente, o material foi pesado em balança analítica com precisão de 0,0001g.

4.6.2 Teor de fósforo (P) na parte aérea e manganês (Mn) na parte aérea e raiz

Após a secagem em estufa, o material vegetal foi moído em moinho do tipo Wiley e em seguida as amostras foram encaminhadas para realização das análises químicas no laboratório de análises de solo e água do Departamento de Ciência do Solo. Foi determinado no tecido vegetal da parte aérea os teores de P, bem como o de Mn que foi analisado na parte aérea e raiz. Os teores de P e Mn foram obtidos através da digestão nitro-perclórica, seguindo os procedimentos descritos por Malavolta *et al.* (1997). Os teores de Mn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e os de P por colorimetria.

4.6.3 pH do solo após cultivo

O pH (H₂O) do solo após o cultivo foi determinado utilizando-se a relação solo/solução de 1:2,5. As amostras foram agitadas com bastão de vidro e deixadas em repouso por 30 minutos. A leitura do pH foi realizada pela imersão do eletrodo na suspensão homogeneizada, conforme procedimento descrito pela Silva (2009).

4.6.4 Percentual foliar de toxidez (PFT)

O percentual foliar de toxidez por Mn foi determinado calculando-se a porcentagem de folhas com sintomas, através da fórmula: $PFT = (n^\circ \text{ folhas com sintomas} / n^\circ \text{ total de folhas}) \times 100$ (SCHMIDT *et al.*, 2013). Os sintomas foram caracterizados pelo surgimento de manchas de coloração marrom, clorose e necrose foliar (MORONI *et al.*, 2003; BALDISSEROTO *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2013).

4.6.5 Colonização micorrízica (CM)

Após a coleta das plantas, as raízes foram encaminhadas para as análises no Laboratório de Microbiologia do Solo do departamento de Ciências do Solo da UFC, onde foram lavadas em água corrente e preservadas em uma solução alcoólica a 70%. A clarificação e coloração das raízes para análise da colonização foram realizadas de acordo com o método adaptado por Koske e Gemma (1989). Para isso, as raízes foram clareadas por imersão em uma solução de Hidróxido de Potássio a 10% (KOH) e levadas ao banho-maria (65°C) por 60 minutos. Ao final desse tempo as raízes foram lavadas em água corrente para remoção do excesso de KOH e, em seguida, foram imersas em uma solução de ácido clorídrico a 1% (HCl) por 10 minutos. O HCl foi descartado apropriadamente, colocando-se as raízes clarificadas em uma solução de glicerol acidificado contendo 0,05% de Azul de Trípano. Em seguida, as raízes foram submetidas a um tratamento térmico em banho-maria a 65° C por 60 minutos. Drenada a solução de glicerol, as raízes coradas foram lavadas em água corrente e preservadas em água destilada sob refrigeração a 4° C por sete dias antes de serem analisadas.

Para cada amostra 10 fragmentos de raízes de 1 cm foram distribuídos paralelamente em lâminas para microscopia. A avaliação da porcentagem de colonização das raízes pelos FMA foi realizada pela observação da presença de estruturas fúngicas na região do córtex radicular de acordo com McGonigle *et al.* (1990).

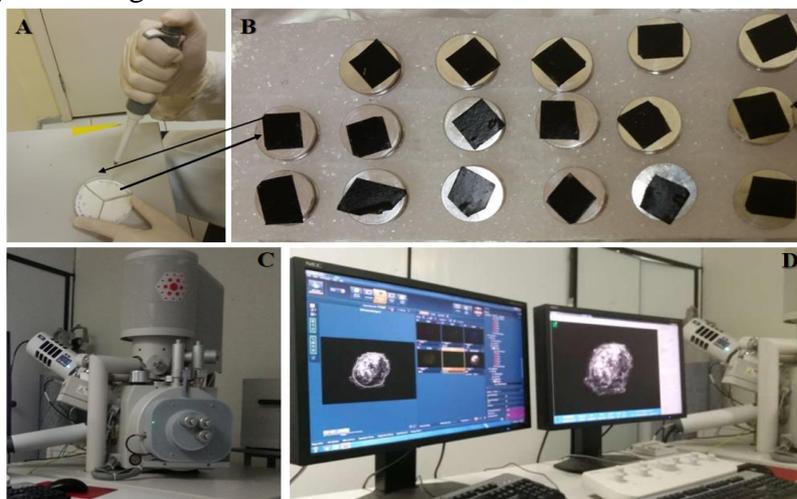
4.6.6 Densidade de esporos de FMA no solo (DESP)

A densidade de esporos de FMA no solo (DESP) foi determinada em uma amostra de 100 g de solo via peneiramento úmido de cada amostra dos tratamentos, seguindo-se os procedimentos descritos por Gerdemann e Nicolson (1963).

4.6.7 Manganês na superfície dos esporos de FMA através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

O Mn na superfície dos esporos de FMA foi determinado utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) com auxílio da técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Para isso, os esporos de FMA foram extraídos a partir de 100 g de solo, seguindo os mesmos procedimentos descritos por Gerdemann e Nicholson (1963). Em seguida, essas estruturas foram transferidas com auxílio de uma pipeta automática com capacidade de 20 μ L para uma placa de Petri contendo papel de filtro faixa azul JP42 (Quanty®) (Figura 6A). Para realização da análise as amostras foram montadas em suportes de alumínio “*Stubs*”, com auxílio de uma fita condutora dupla face de carbono (Figura 6B) e foram analisadas usando o MEV (modelo Quanta 450 FEG-FEI) com voltagem de aceleração de 20 kV na Central Analítica da UFC (Figura 6C e 6D). A composição elementar (Mn superfície dos esporos de FMA) foi determinada através da técnica de EDS, acessório do MEV.

Figura 6 – Montagem do material para microscopia eletrônica de varredura (A – esporos em placa de Petri sobre papel de filtro; B - fixação dos esporos em *Stubs* com auxílio de fita condutora dupla face de carbono; C – microscópio eletrônico de varredura (modelo 450 FEG-FEI); D – obtenção de imagem e EDS no MEV.



Fonte: o autor

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, por meio do teste F ($p \leq 0,05$). Mediante a constatação de diferença significativa, os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) e os quantitativos foram ajustados à análise de regressão, utilizando-se o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento com *Mimosa caesalpinieafolia* Benth.

5.1.1 Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR)

A análise de variância evidenciou diferença significativa entre as doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B) para MMSPA e MMSR (Tabela 3). Ao analisar o efeito da interação entre essas duas fontes de variação (AxB) verificou-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo (Tabela 3).

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para os parâmetros massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR) de *M. caesalpinieafolia* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios	
		MMSPA	MMSR
Doses de Mn (A)	3	3,19**	0,18**
FMA (B)	3	1,77**	0,02**
Interação (AxB)	9	0,57**	0,01**
Erro	48	0,01	0,002
Total	63	-	-
C.V.%		9,56	20,72

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

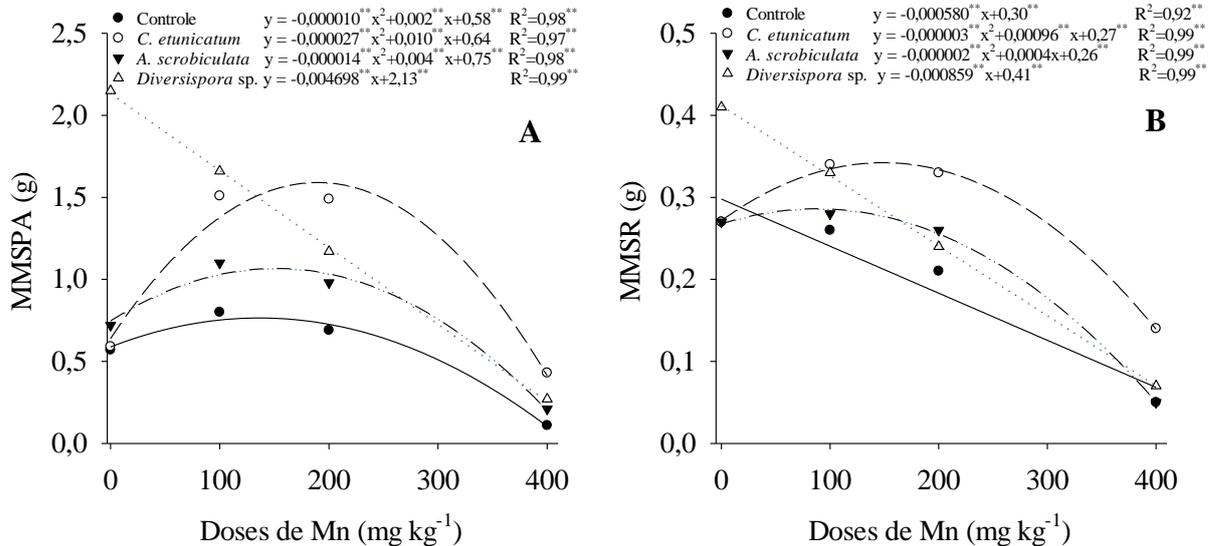
Fonte: o autor

A MMSPA inicialmente apresentou tendência de aumento e, à medida que as doses de Mn aumentaram, esta passou a diminuir, em todos os tratamentos, ajustando-se a modelos quadráticos de regressão, com exceção do tratamento com *Diversispora* sp., o qual obteve-se ajuste linear decrescente (Figura 7A). As plantas inoculadas com *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*, tiveram incrementos de 1,86g e 1,06g na MMSPA até as doses estimadas de 186,88 mg kg⁻¹ e 150 mg kg⁻¹ de Mn, respectivamente, com tendência de decréscimo a partir destes valores. Já o tratamento com *Diversispora* sp., mesmo apresentando ajuste linear decrescente, produziu MMSPA superior aos tratamentos controle e *A. scrobiculata* em todas as doses de Mn aplicadas no solo (Figura 7A).

A MMSR apresentou comportamento semelhante a MMSPA, com exceção do tratamento controle, o qual ajustou-se ao modelo linear decrescente (Figura 7B). As plantas inoculadas com *C. etunicatum* e *A. scrobiculata* apresentaram incrementos de 0,35g e 0,29g na MMSR até as doses estimadas de 160 mg kg⁻¹ e 108,7 mg kg⁻¹ de Mn, respectivamente, com tendência de redução a partir destes valores, os quais ajustaram-se ao modelo quadrático,

equanto que o tratamento com *Diversispora* sp., mesmo apresentando ajuste linear decrescente, também produziu MMSR superior ao tratamento controle (Figura 7B).

Figura 7 – MMSPA (A) e MMSR (B) de *M. caesalpinieafolia* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

Tem sido demonstrado que o Mn, quando em excesso, induz uma ampla gama de distúrbios bioquímicos e altera a fotossíntese e o metabolismo de proteínas das plantas, que por sua vez podem resultar na diminuição da biomassa vegetal (INOSTROZA-BLANCHETEAU *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017; MILLALEO *et al.*, 2010).

Conforme evidenciado, a MMSPA e MMSR das plantas foram diminuídas significativamente nas maiores doses de Mn aplicadas no solo. As plantas desse tratamento apresentaram os maiores teores de Mn na raiz e na parte aérea resultando em um maior percentual foliar de toxidez, principalmente nas plantas do tratamento controle, o que explica a diminuição de crescimento das plantas em termos de massa de matéria seca. Nas plantas colonizadas por FMA, os sintomas de toxidez por Mn foram bem menos expressivos, principalmente nos tratamentos com *C. etunicatum* e *Diversispora* sp., o que justifica a maior produção de MMSPA e MMSR quando comparadas às plantas do tratamento controle.

Vários estudos demonstram que os FMA apresentam influência significativa no crescimento e proteção das plantas sob estresse causado por metais pesados (GARCIA *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018). Entretanto, esses benefícios podem ser dependentes da espécie de FMA, da planta hospedeira e do metal contaminante (FERROL *et al.*, 2016).

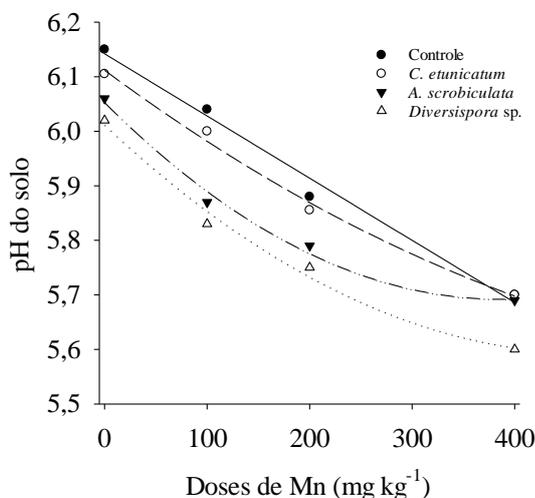
Os resultados obtidos nesse ensaio mostram ainda que a associação entre diferentes espécies de FMA com *M. caesalpiniaefolia*, em solo com excesso de Mn, proporcionam respostas diferenciadas do ponto de vista da produção de massa da matéria seca, sugestivo de que diferentes espécies de FMA podem apresentar graus de tolerância diferentes quanto ao Mn. Esse fato nos ajuda a explicar a variabilidade do efeito dos FMA em relação aos benefícios proporcionados a planta hospedeira.

Garcia *et al.* (2018), estudando a fitoestabilização associada a FMA em solo proveniente da mineração de Mn, também observaram incremento na MMSPA e MMSR de plantas de *M. caesalpiniaefolia*. Sugerem os autores que os FMA podem incrementar a nutrição e proteção das plantas contra a toxidez por Mn, refletindo em maior crescimento, em termos de massa da matéria seca. Resultados semelhantes em que os FMA incrementaram o crescimento de plantas em solos contaminados por outros metais pesados foram encontrados também por Amna *et al.* (2015) e Zhang *et al.* (2018).

5.1.2 pH do solo após cultivo

O pH do solo apresentou tendência de decréscimo à medida que se aumentou as doses de Mn aplicadas. Em geral, todos os tratamentos inoculados com FMA, principalmente com *Diversispora* sp., apresentaram menores valores de pH quando comparados à ausência de inoculação (Figura 8).

Figura 8 – Comportamento do pH do solo após cultivo com *M. caesalpiniaefolia* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

A acidificação do solo em função do aumento das doses de Mn pode ser explicada

pela aplicação em excesso desse elemento e, conseqüentemente, por suas relações de troca entre os íons H^+ que ocupam a superfície dos colóides do solo. Por possuir carga bivalente, o Mn^{2+} pode se ligar mais fortemente a superfície negativa dessas partículas, resultando em liberação de íons H^+ e, por conseguinte, diminuição do pH do solo.

Ainda nesse contexto, é importante ressaltar que as plantas micorrizadas possuem uma maior atividade metabólica, especialmente no que diz respeito a sua maior capacidade de absorção de nutrientes. Dessa forma, no substrato em que a planta micorrizada é cultivada, mais íons podem ser removidos e, quando esses íons são cátions, outros cátions como H^+ são exsudados pela raiz para que seja mantido o equilíbrio elétrico na planta, o que explica a diminuição do pH do solo em função dos tratamentos em que houve inoculação com FMA (MARSCHNER, 1995; NOGUEIRA, 2001).

5.1.3 Densidade de esporos de FMA no solo (DESP) e colonização micorrízica (CM)

Na tabela 4, observa-se que tanto a DESP de FMA no solo quanto a CM foram influenciadas significativamente pelos fatores doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B), assim como pela interação entre essas duas fontes de variação (AxB).

Tabela 4 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de densidade de esporos de FMA no solo (DESP FMA) e colonização micorrízica (CM) de *M. caesalpiniaefolia* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios	
		DESP FMA	CM
Doses de Mn (A)	3	738860,79**	1673,89**
FMA (B)	2	932171,83**	1662,74**
Interação (AxB)	6	39732,93*	131,79*
Erro	36	15966,04	45,86
Total	47	-	-
C.V.%	-	12,81	23,75

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

A DESP de FMA no solo variou em função dos tratamentos de inoculação com FMA e das doses de Mn aplicadas no solo (Figura 9A). O tratamento com *Diversispora* sp. ajustou-se ao modelo quadrático e apresentou a maior densidade de esporos de FMA no solo, com incremento máximo (1395,50 esp. / 100 g de solo) até a dose estimada de 151,5 mg kg^{-1} de Mn, com tendência de decréscimo a partir deste valor (Figura 9A). O tratamento com *A. scrobiculata* também foi representado por modelo quadrático e teve incremento máximo (997

esp. / 100 g de solo) até a dose estimada de 148,5 mg kg⁻¹ de Mn, a partir da qual apresentou decréscimo, enquanto que para o tratamento com *C. etunicatum* obteve-se o modelo de resposta linear decrescente, em função do aumento das doses de Mn aplicadas no solo (Figura 9A).

O aumento na esporulação de alguns tratamentos, como o *Diversispora* sp. e *A. scrobiculata*, foi estimulado, até certo limite, pela adição de Mn. No caso da espécie *C. etunicatum*, apesar de não haver esporulação estimulada pelo aumento de Mn, a mesma apresentou o número de esporos superior a espécie *A. scrobiculata*, na máxima dose de Mn aplicada no solo.

Esses resultados estão de acordo com Garcia *et al.* (2018), os quais relataram comportamento variável entre espécies de FMA no que concerne a densidade de esporos em um solo proveniente de uma área de mineração de Mn. De acordo com os autores, algumas espécies de FMA apresentaram maior incremento no número de esporos, como *C. etunicatum*, o que pode estar relacionado com a maior tolerância dessa espécie a níveis elevados deste metal.

Efeito semelhante na densidade de esporos de FMA no solo foi encontrado por Khade e Adholeya (2009) ao estudarem a associação micorrízica arbuscular em várias plantas cultivadas em solos com e sem contaminação por metais pesados. Esses autores sugerem que o maior número de esporos encontrados no solo contaminado pode ser atribuído ao maior potencial de adaptação e tolerância dos FMA a essas condições.

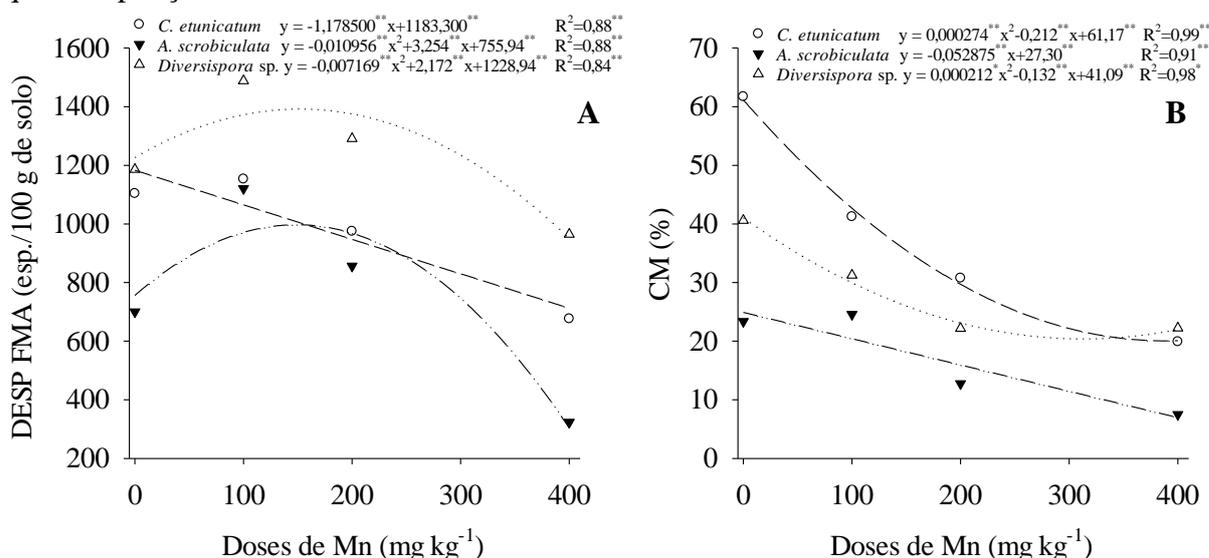
É importante ressaltar ainda que espécies nativas de FMA que foram expostas a contaminação por metais pesados por longo prazo, poderão sofrer uma pressão de seleção, tornando esses micro-organismos mais resistentes (MIRANSARI, 2011). Essa condição pode levar a um aumento na esporulação do FMA nativo (*Diversispora* sp.) nas maiores doses de Mn, assim como observado no presente estudo.

Conforme Helgason e Filter (2009) o incremento no número de esporos de algumas espécies de FMA pode também estar associado a algum mecanismo de adaptação desses micro-organismos a condições de estresse. No entanto, nem sempre a contaminação do solo por metais pesados tem remetido a esse tipo de resposta. Biró *et al.* (2010) reportaram que o número de esporos de FMA foi significativamente reduzido em solo contaminado com chumbo e cádmio. Resultados semelhantes foram observados por Leal *et al.* (2016) em área não reabilitada e contaminada com vários metais pesados, inclusive com Mn. Esses autores observaram variação de 5 a 2718 esporos em 50 mL de suspensão de solo, para o maior e o menor teor, respectivamente, de contaminação pelos metais.

Em nosso estudo, na máxima dose de Mn aplicada no solo (400 mg kg^{-1}) foi observado uma variação de 323 a 965 esporos de FMA em 100 g de solo. Esses valores são considerados de médio a alto quando comparados a outros trabalhos envolvendo solos contaminados por metais pesados (YANG *et al.* 2015; LEAL *et al.* 2016; RIVERA-BECERRIL *et al.* 2013).

Essas informações reforçam mais uma vez que os efeitos dos metais pesados sobre os FMA no solo podem depender de uma série de fatores, como a espécie de FMA, a planta hospedeira e o tipo e quantidade do metal contaminante (PANDE; TARAFDAR, 2004; FERROL *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2018).

Figura 9 – DESP de FMA no solo (A) e CM (B) de *M. caesalpiniaefolia* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

A CM apresentou decréscimo em todos os tratamentos com FMA em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo, conforme o modelo de ajuste quadrático (*C. etunicatum* e *Diversispora* sp.) e linear decrescente (*A. scrobiculata*) (Figura 9B). Os maiores percentuais de CM foram observados no tratamento em que não foi adicionado Mn. Esses percentuais foram de 61,7%, 40,6% e 27,37% para os tratamentos com *C. etunicatum*, *Diversispora* sp. e *A. scrobiculata*, respectivamente (Figura 9B).

Níveis de CM baixos são frequentemente observados em solos com alta concentração metálica (AMIR *et al.*, 2014). Em nosso estudo, a disponibilidade de Mn parece ter sido fator determinante para redução na CM das plantas de *M. caesalpiniaefolia* em todos os tratamentos de inoculação com FMA, visto que o aumento das doses de Mn causou

diminuição significativa desta variável. Apesar disso, observou-se que a simbiose com os FMA foi eficiente e não limitou o desenvolvimento das plantas.

Resultados semelhantes ao do presente estudo têm sido observados também em solos contaminados por outros metais pesados. Li *et al.* (2018) relataram que o aumento nos níveis de arsênio no solo reduziu significativamente a CM em plantas de *Medicago sativa* de 38,18% para 9,81%. Ainda assim, foi demonstrado que mesmo sob baixa CM as plantas inoculadas com FMA não tiveram seu desenvolvimento limitado e apresentaram concentrações mais altas de fósforo e mais baixa de arsênio na parte aérea, quando comparadas às do tratamento controle (sem colonização). Efeito similar foi observado também por Amna *et al.* (2015), os quais relataram que o aumento da concentração de cromo diminuiu significativamente a CM de *Linum usitatissimum* de 67% para 48%.

Além disso, em nosso estudo, foi observado que o percentual foliar de toxidez por Mn não aumentou com a redução da CM verificando-se, pelo contrário, redução significativa desta variável nas plantas inoculadas com FMA, quando comparadas às do controle, no tratamento em que foi adicionado as maiores doses de Mn. Isso indica que nem sempre os benefícios proporcionados pelos FMA estão relacionados com o percentual de CM, assim como observado também por Rabie (2005) e Kanwal *et al.* (2016).

É importante ressaltar ainda que a CM apresentou comportamento inverso a densidade de esporos de FMA no solo, que foi estimulada até certo limite pela adição de Mn. Esse fato pode estar relacionado com a concepção de que nem sempre a densidade de esporos reflete no potencial de CM e que isso pode ser influenciado também pelo tipo de hospedeiro e sua tolerância ao estresse ambiental (KLAUBERG-FILHO *et al.*, 2002).

Nas condições mais extremas de Mn, o baixo percentual de CM foi uma estratégia vantajosa para *M. caesalpiniaefolia*, tendo em vista a melhoria no seu desenvolvimento e atenuação da toxidez de Mn. Entretanto, os fatores que controlam a CM em solos contaminados por metais pesados, como o Mn, atuam de maneira muito complexa, o que carece ainda de estudos mais aprofundados.

5.1.4 Fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R)

De acordo com a análise de variância (Tabela 5), observa-se que o teor de P foi influenciado significativamente apenas pelos fatores doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B). Ao analisar a interação entre essas duas fontes de variação (Ax B) verificou-se que apenas as variáveis Mn na parte aérea e Mn na raiz apresentaram efeito significativo.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R) de *M. caesalpinieafolia* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios		
		P	Mn PA	Mn R
Doses de Mn (A)	3	1,57**	16019448,32**	26283517,19**
FMA (B)	3	1,90**	2126319,14**	1905408,97**
Interação (Ax B)	9	0,33 ^{ns}	1443035,58**	861449,98**
Erro	48	0,16	91335,5	67759,88
Total	63	-	-	-
C.V.%	-	19,57	25,57	24,83

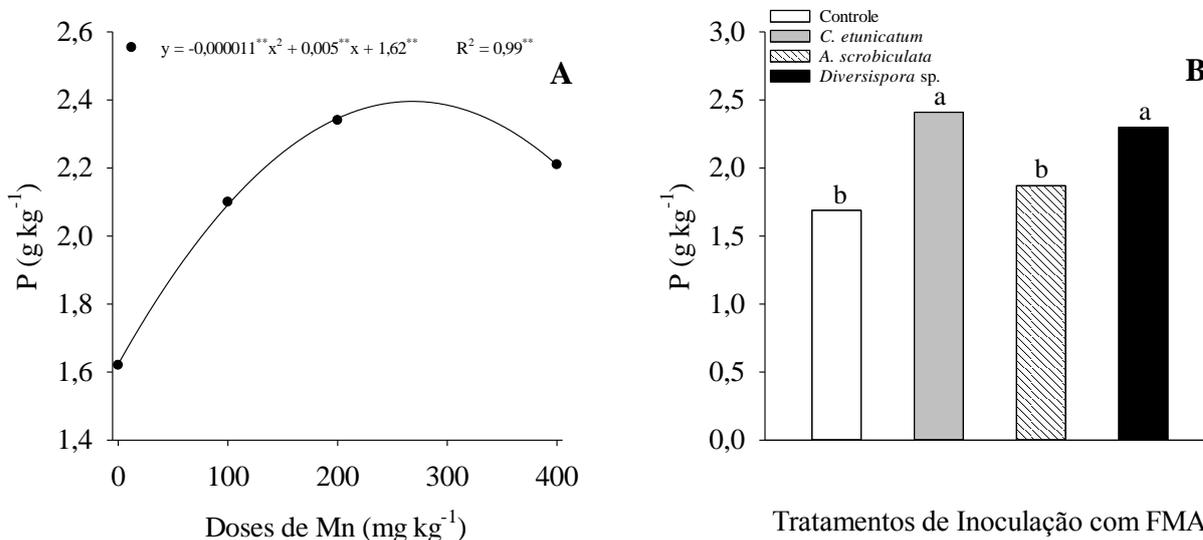
** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

O teor de P na parte aérea das plantas aumentou em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo, ajustando-se ao modelo de resposta quadrático, apresentando incremento máximo de $2,38 \text{ g kg}^{-1}$ até a dose estimada de $261,54 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn, com tendência de decréscimo a partir deste valor (Figura 10A).

Observando-se o efeito da inoculação com FMA, verificou-se que o teor de P na parte aérea foi significativamente superior quando as plantas foram inoculadas com *C. etunicatum* e *Diversispora* sp., representando incremento de 42,6% e 36%, respectivamente, quando comparadas às do tratamento controle, enquanto que *A. scrobiculata* apresentou resultados semelhantes a ausência de inoculação (Figura 10B).

Figura 10 - Teor de P na parte aérea de *M. caesalpinieafolia* em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: o autor

Conforme Fernando e Lynch (2015), o excesso de manganês pode competir e diminuir a absorção de alguns cátions metálicos, como o Fe e Al, podendo alterar suas concentrações na solução do solo. O Fe e Al são elementos capazes de estabelecer uma ligação de adsorção mais forte com o P. O aumento nos níveis de Mn na solução do solo pode ter provocado uma diminuição nos teores destes elementos por competição, o que pode ter refletido em um aumento na disponibilidade de P na solução do solo e conseqüentemente na parte aérea das plantas. Resultados semelhantes foram observados por Huang *et al.* (2017) em plantas de *Phragmites australis* sob estresse de cádmio.

O P é um elemento crucial para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas (WU *et al.*, 2016). No presente estudo foi observado que os tratamentos *C. etunicatum* e *Diversispora* sp. apresentaram maior teor de P na parte aérea quando comparado às plantas inoculadas com *A. scrobiculata* e controle, o que coincidiu com maior crescimento das plantas, em termos de massa de matéria seca da parte aérea, e maior redução no percentual foliar de toxidez por Mn. É importante ressaltar que diferentes espécies de FMA podem ter efeitos diferentes na aquisição de P (HU *et al.*, 2014) e isso pode explicar em parte o resultado observado com *A. scrobiculata*. Em plantas inoculadas com FMA, a melhoria no estado nutricional, principalmente em relação ao P, tem sido atribuída ao maior volume de solo explorado pelo micélio fúngico (LIU *et al.*, 2015).

Elhindi *et al.* (2018), trabalhando com a espécie vegetal *Tagetes erecta* L. em solo contaminado com metais pesados, demonstraram que a inoculação com FMA proporcionou maior teor de P na parte aérea, crescimento e tolerância quando comparado às plantas do tratamento controle. Esses resultados corroboram também com os encontrados por Ma *et al.* (2019) em plantas de *Triticum aestivum* L. em solo com concentrações elevadas de zinco.

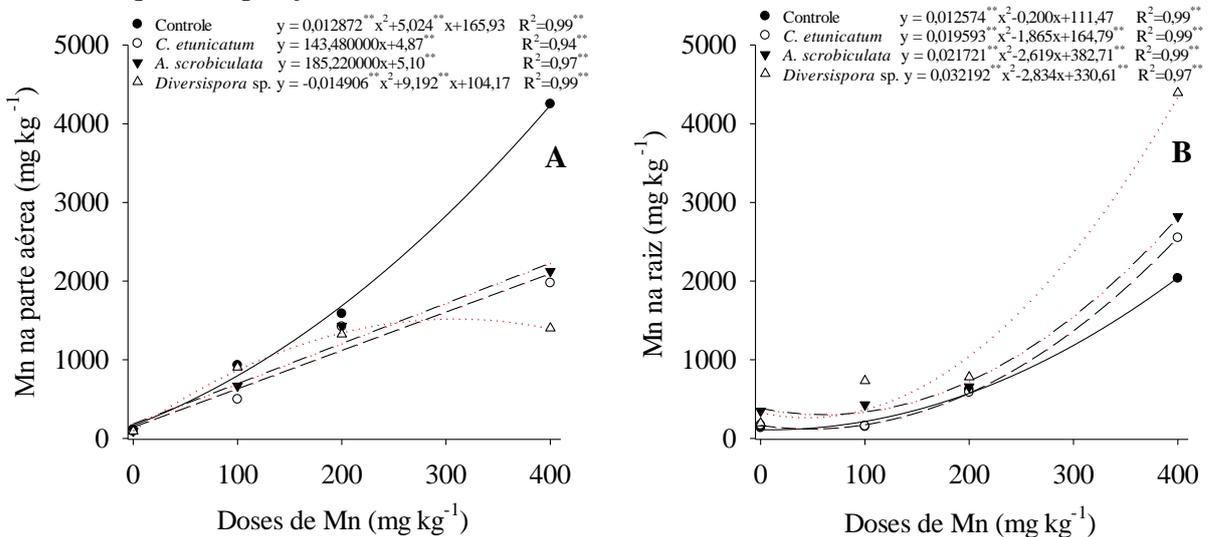
Vale ressaltar que o estabelecimento de muitas espécies vegetais em áreas de mineração tem sido dificultado muitas vezes pela baixa fertilidade e altas concentrações de metais tóxicos no solo (WANG, 2017). Dessa forma, a inoculação de plantas com FMA capazes de tolerar o excesso de metais no solo, como por exemplo o Mn, pode se constituir numa potencial ferramenta biotecnológica para ser utilizada nessas condições, visto que, além dos inúmeros outros benefícios, esses micro-organismos podem também contribuir no incremento de P, aumentando a competitividade da planta e auxiliando no processo de revegetação em áreas degradadas pela mineração.

Os teores de Mn na parte aérea das plantas aumentaram em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo em todos os tratamentos, demonstrado pelo modelo quadrático (controle e *Diversispora* sp.) e linear crescente (*C. etunicatum* e *A. scrobiculata*)

(Figura 11A). Entretanto, na parte aérea, todas as plantas inoculadas com FMA apresentaram diminuição no teor de Mn quando comparadas às do tratamento controle, com maior intensidade nos tratamentos com *Diversispora* sp. e *C. etunicatum*. Nesse caso, na máxima dose de Mn aplicada no solo as plantas do tratamento controle apresentaram teores superiores a 4000 mg kg⁻¹ de Mn, ao passo que, nas plantas inoculadas com FMA, como por exemplo no tratamento com *Diversispora* sp., esse teor foi diminuído em mais de 2800 mg kg⁻¹ de Mn (Figura 11A).

Nas raízes, o teor de Mn apresentou comportamento inverso ao da parte aérea, com maior teor desse elemento nas plantas inoculadas com FMA. Na máxima dose de Mn aplicada no solo, as plantas do tratamento controle apresentaram teores inferiores a 2100 mg kg⁻¹ de Mn, ao passo que nas plantas inoculadas com FMA, como por exemplo no tratamento com *Diversispora* sp., esse teor aumentou em mais de 2200 mg kg⁻¹. Nesse caso, os tratamentos com *Diversispora* sp., seguido de *A. scrobiculata* e *C. etunicatum*, induziram incrementos significativos nos teores de Mn na raiz das plantas de 115,86%, 38,67% e 25,38%, respectivamente, comparadas às do tratamento controle (Figura 11B).

Figura 11 – Teor de Mn na parte aérea (A) e raiz (B) de *M. caesalpiniaefolia* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

Nota-se nesse trabalho que todas as plantas inoculadas com FMA apresentaram menor teor de Mn na parte aérea quando comparadas às do tratamento controle. Entretanto, vale ressaltar que, independente da inoculação com FMA, todos os valores de Mn observados na parte aérea foram considerados elevados e acima do limite tóxico para maioria das espécies

vegetais, que é de 400 mg kg⁻¹ de Mn na massa da matéria seca da parte aérea (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Contudo, vale salientar que os teores de Mn absorvidos na parte aérea das plantas micorrizadas não refletiram em grandes prejuízos ao desenvolvimento de *M. caesalpiniaefolia*, quando comparado às do tratamento controle, o que demonstra o potencial dessa espécie, juntamente associada aos FMA, em tolerar o Mn.

De modo inverso ao que ocorreu na parte aérea, os teores de Mn nas raízes foram mais elevados nas plantas micorrizadas, quando comparado às do tratamento controle. Esse comportamento indica uma menor translocação do Mn da raiz para a parte aérea e pode explicar os menores teores desse elemento na parte aérea das plantas micorrizadas.

Garcia *et al.* (2018) também observaram resultados semelhantes com *M. caesalpiniaefolia* associada a *C. etunicatum* e um Mix de FMA e correlacionaram os mesmos ao maior teor de Mn na raiz em plantas colonizadas por FMA. Esses resultados corroboram também com os encontrados por Spagnoletti *et al.* (2017) em *Glycine max* L. associada a FMA em solo contaminado por arsênio. Por outro lado, Xia *et al.* (2007) observaram maior translocação e acúmulo de arsênio em plantas de *Zea mays* L. inoculada com *Glomus mosseae*. Os conflitos de alguns resultados podem ser atribuídos a espécie de planta, fungo e a concentração e tipo de metal tóxico no solo (CUI *et al.*, 2019).

Apesar das evidências de proteção dos FMA às plantas, os mecanismos induzidos por esses micro-organismos não são ainda bem esclarecidos. No presente estudo, através da técnica de MEV e EDS, foi possível detectar percentuais de Mn na superfície dos esporos de FMA. Esse fato pode ter resultado também na diminuição da translocação de Mn para a parte aérea, uma vez que os maiores valores de Mn encontrados na superfície dos esporos coincidiram com a redução de Mn na parte aérea de *M. caesalpiniaefolia*.

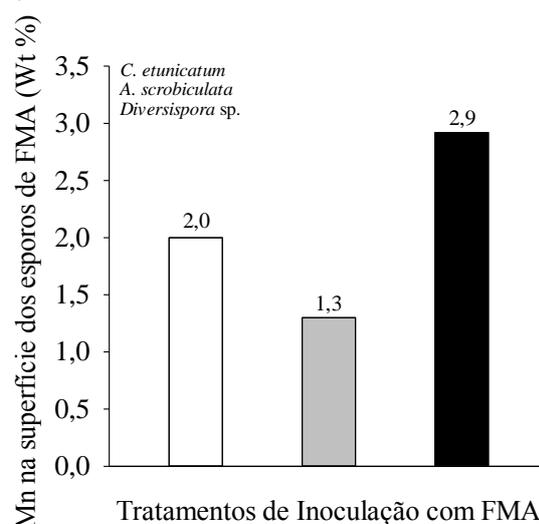
Vale ainda ressaltar que esses resultados foram mais expressivos no tratamento com *Diversispora* sp., isolado da área de mineração de Mn, o que sugere uma maior tolerância e potencial desse fungo para ser utilizado na revegetação de áreas com excesso desse elemento.

5.1.5 Manganês na superfície dos esporos de FMA através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A análise elementar utilizando MEV e EDS permitiu detectar percentuais de Mn, com base em peso desse elemento (Wt%), na superfície dos esporos de FMA extraídos do solo em que foi adicionado 400 mg kg⁻¹ de Mn e cultivado com *M. caesalpiniaefolia* (Figura 12).

Os percentuais de Mn na superfície dos esporos variaram com a espécie de FMA, correspondendo a 2,9%, 2,0% e 1,3%, respectivamente, para os tratamentos com *Diversispora* sp., *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*. Na ausência da adição de Mn no solo (0 mg kg⁻¹), os percentuais desse elemento na superfície dos esporos foram indetectáveis e por isso não foram plotados no gráfico (Figura 12).

Figura 12 – Mn na superfície dos esporos de FMA (Wt %) obtido pela técnica de EDS. Os valores são referentes aos esporos de FMA extraídos do solo com 400 mg kg⁻¹ de Mn cultivado com *M. caesalpiniaefolia*.



Fonte: o autor

A não detecção de Mn no solo sem adição do elemento pode estar relacionado com a baixa quantidade de Mn disponível no solo nesse tratamento. Os diferentes percentuais encontrados quando da aplicação de doses maiores sugerem que diferentes espécies de FMA podem induzir diferentes graus de tolerância quanto ao Mn.

Diversos resultados têm demonstrado efeito positivo dos FMA na proteção das plantas em solo com excesso de metais pesados (YANG *et al.*, 2015; HASHEM *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018; GARCIA *et al.*, 2018). Várias são as hipóteses de mecanismos pelos quais os FMA podem atuar na proteção das plantas em solos com metais pesados (CABRAL *et al.*,

2015). Entretanto, apesar de existir inúmeras pesquisas, tais mecanismos ainda não são bem esclarecidos.

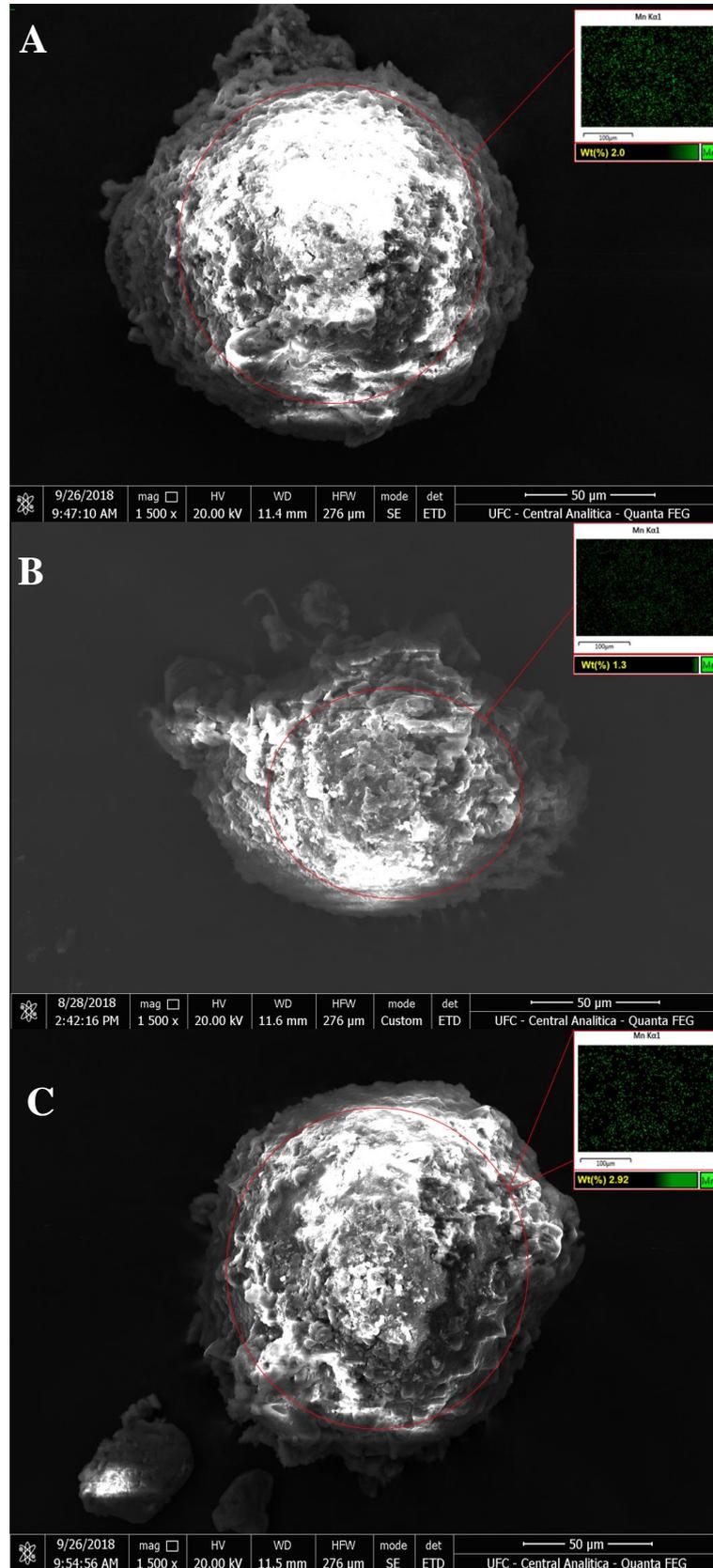
Acreditamos que o acúmulo de Mn na superfície dos esporos de FMA pode se constituir num dos mecanismos para conferir tolerância a *M. caesalpinieafolia*, visto que esse fato refletiu diretamente no melhor desenvolvimento das plantas, maior incremento de P, redução do Mn na parte aérea das plantas e do percentual foliar de toxidez.

É importante ressaltar ainda que os resultados para o acúmulo de metais pesados na superfície dos esporos de FMA é um assunto ainda pouco estudado e os resultados que foram publicados até o momento utilizam, na maioria das vezes, outros tipos de técnicas para tentar quantificar os metais pesados nas estruturas de propagação dos FMA (WEIERSBYE *et al.*, 1999; OLSSON *et al.*, 2011).

Dessa forma, a interpretação dos valores observados no presente estudo se torna difícil, principalmente em função da não existência de outros resultados comparativos na literatura utilizando essa mesma técnica para os esporos de FMA. Assim, até o presente momento, não há informações mais detalhadas quanto ao acúmulo de Mn na superfície dos esporos de FMA utilizando MEV associada a EDS, o que torna nosso estudo pioneiro nessa área de prospecção.

Além da detecção de Mn na superfície dos esporos de FMA, a análise de MEV permitiu a obtenção de imagens com um maior nível de detalhes (Figura 13). Na imagem, pontos mais claros são tidos como de maior densidade eletrônica, onde são encontrados elementos mais densos como os metais.

Figura 13 – Micrografia eletrônica de varredura (MEV) e resultados da espectroscopia por dispersão de energia (EDS) em esporos de FMA (A- *C. etunicatum*; B - *A. scrobiculata*; C – *Diversispora* sp.) extraídos de solo com 400 mg kg⁻¹ de Mn e cultivado com *M. caesalpiniaefolia*.



Fonte: o autor

5.1.6 Percentual foliar de toxidez (PFT)

O PFT foi influenciado significativamente pelas doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B), assim como pela interação entre as duas fontes de variação (AxB) (Tabela 6).

Tabela 6 – Resumo da análise de variância para o percentual foliar de toxidez (PFT) de *M. caesalpiniaefolia*. sob inoculação com FMA e doses de Mn.

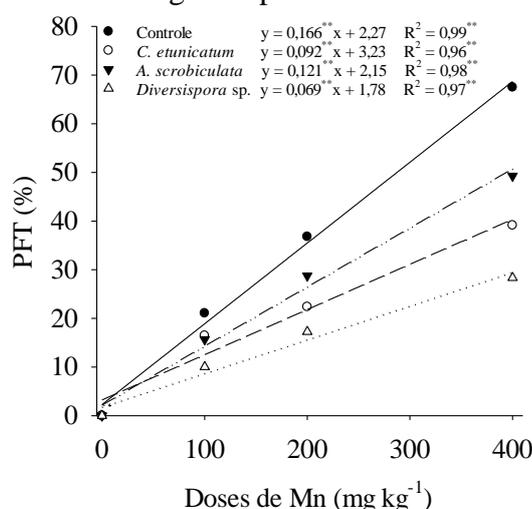
F. V.	G.L.	Quadrados Médios
		PFT
Doses de Mn (A)	3	5973,25**
FMA (B)	3	859,19**
Interação (AxB)	9	205,65**
Erro	48	16,31
Total	63	-
C.V.%		18,33

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

Todos os tratamentos de inoculação com FMA apresentaram um comportamento linear crescente para o PFT em função do aumento das doses de Mn aplicadas no solo (Figura 14). A inoculação com FMA reduziu de maneira significativa o PFT. Na máxima dose de Mn aplicada ao solo, apesar da maior intensidade de toxidez, os tratamentos com *Diversispora* sp., seguido de *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*, proporcionaram uma redução no PFT de 58,02 %, 42,02 % e 26,99 %, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle (Figura 14).

Figura 14 – PFT de *M. caesalpiniaefolia* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.

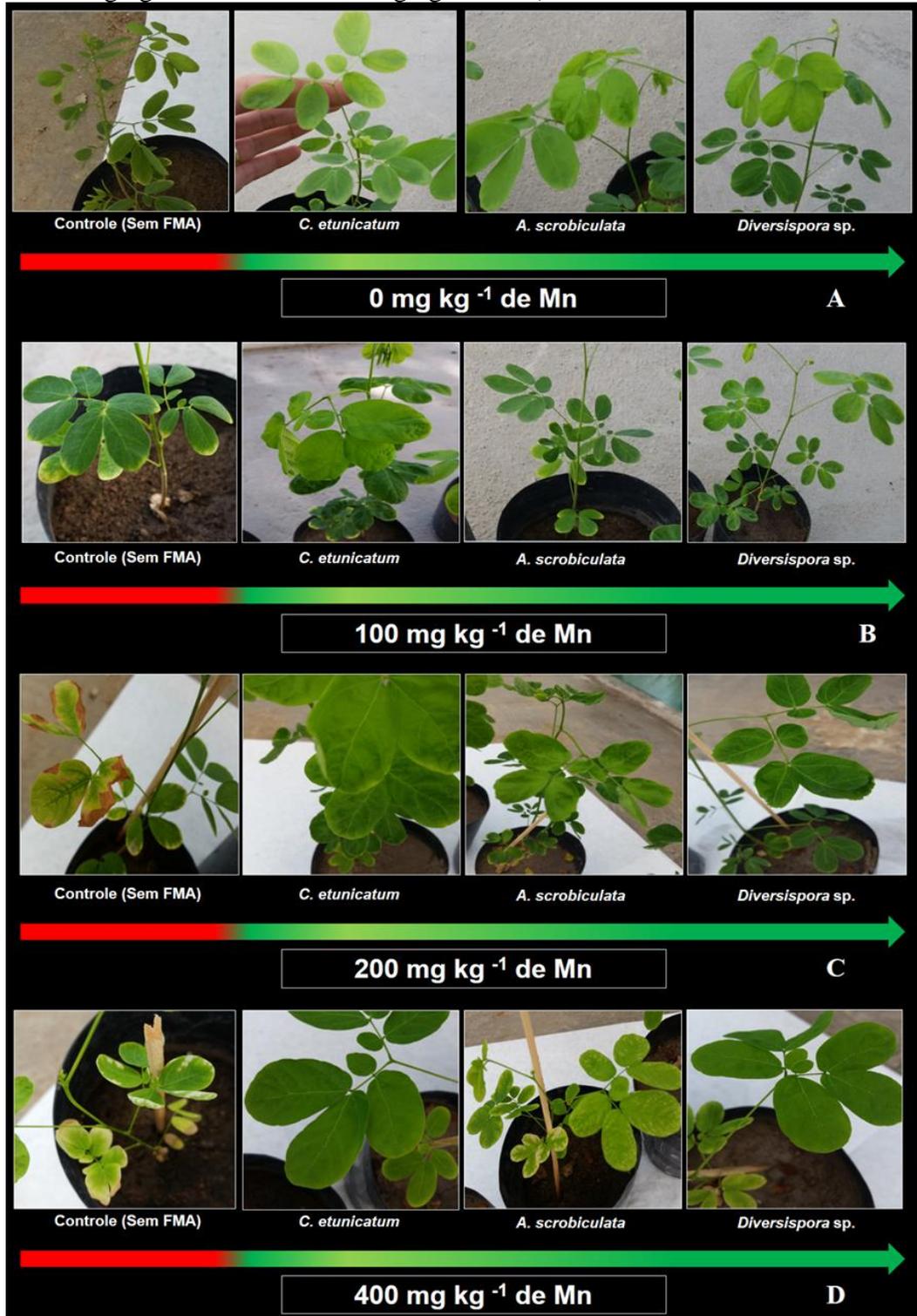


Fonte: o autor

Não foram observados sintomas de toxidez foliar por Mn na ausência da aplicação

desse elemento (0 mg kg^{-1}) (Figura 15A). A severidade da toxidez foliar por Mn se intensificou com aumento das doses adicionadas, principalmente, nas plantas não inoculadas com FMA, como podem ser observadas na figura 15B, 15C e 15D.

Figura 15 – Aspecto dos sintomas de toxidez foliar por manganês em plantas de *M. caesalpiniaefolia* aos 60 dias após o transplante (A – 0 mg kg^{-1} de Mn, B – 100 mg kg^{-1} de Mn, C – 300 mg kg^{-1} de Mn e D – 400 mg kg^{-1} de Mn).



Fonte: o autor

É notório também que os sintomas de toxidez foliar por Mn foram mais agressivos no tratamento com *A. scrobiculata*, em relação aos outros FMA avaliados mas, ainda assim, esses sintomas foram menos intensos do que nas plantas não inoculadas (Figura 15B, 15C, 15D). Tal fato pode estar associado com a menor eficiência de proteção de *A. scrobiculata* a planta hospedeira sob essas condições.

Esses resultados demonstram que a simbiose micorrízica arbuscular atenuou a toxidez por Mn em plantas de *M. caesalpiniaefolia* e que os mecanismos para essa resposta podem estar associados a melhor nutrição da planta em relação ao P, maior teor de Mn no sistema radicular e a capacidade dos esporos de FMA em promover o acúmulo de Mn em sua superfície.

5.2 Experimento com *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.

5.2.1 Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR)

De acordo com a análise de variância (Tabela 7), observa-se que a MMSPA e MMSR foram influenciadas significativamente pelas doses de Mn (A) e pela inoculação com FMA (B). Ao analisar a interação entre doses de Mn x inoculação com FMA (AxB) verificou-se que somente a MMSPA apresentou efeito significativo.

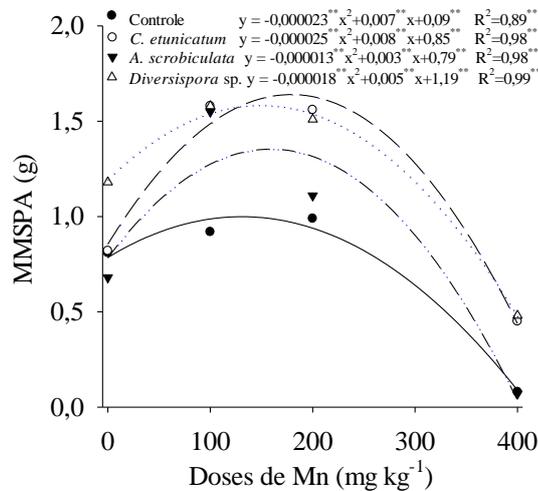
Tabela 7 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR) de *L. leucocephala* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios	
		MMSPA	MMSR
Doses de Mn (A)	3	4,24**	1,98**
FMA (B)	3	0,80**	0,09**
Interação (AxB)	9	0,11**	0,007 ^{ns}
Erro	48	0,13	0,01
Total	63	-	-
C.V.%	-	20,77	21,84

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

A MMSPA das plantas oscilou entre um aumento e uma posterior diminuição com o aumento das doses de Mn aplicadas no solo em todos os tratamentos, os quais se ajustaram ao modelo quadrático (Figura 16). As plantas inoculadas com *Diversispora* sp., *C. etunicatum* e *A. scrobiculata* proporcionaram incrementos de 1,53g, 1,49g e 0,96g na MMSPA das plantas até as doses estimadas de 138,88 mg kg⁻¹, 160 mg kg⁻¹ e 115,38 mg kg⁻¹ de Mn, respectivamente, com tendência de decréscimo a partir destes valores, enquanto que o tratamento controle apresentou incremento máximo de 0,62g na MMSPA das plantas até a dose estimada de 152,17 mg kg⁻¹ de Mn, a partir da qual apresentou decréscimo.

Figura 16 – MMSPA de *L. leucocephala* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

O estresse causado pelos metais pesados, de maneira geral, inibe o metabolismo e a fotossíntese das plantas, provocando redução no seu crescimento (WANG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017). Ainda assim, as plantas colonizadas por FMA apresentaram maior incremento na MMSPA quando comparadas às plantas do tratamento controle. Observa-se que essa melhoria no crescimento das plantas associadas a colonização micorrízica está relacionada a dois benefícios micorrízicos gerais como a maior na absorção de P e o maior acúmulo de Mn nas raízes, o qual pode atuar como uma barreira, evitando a translocação excessiva deste para a parte aérea da planta e atenuando consequentemente a toxidez por Mn (MNASRI *et al.*, 2017).

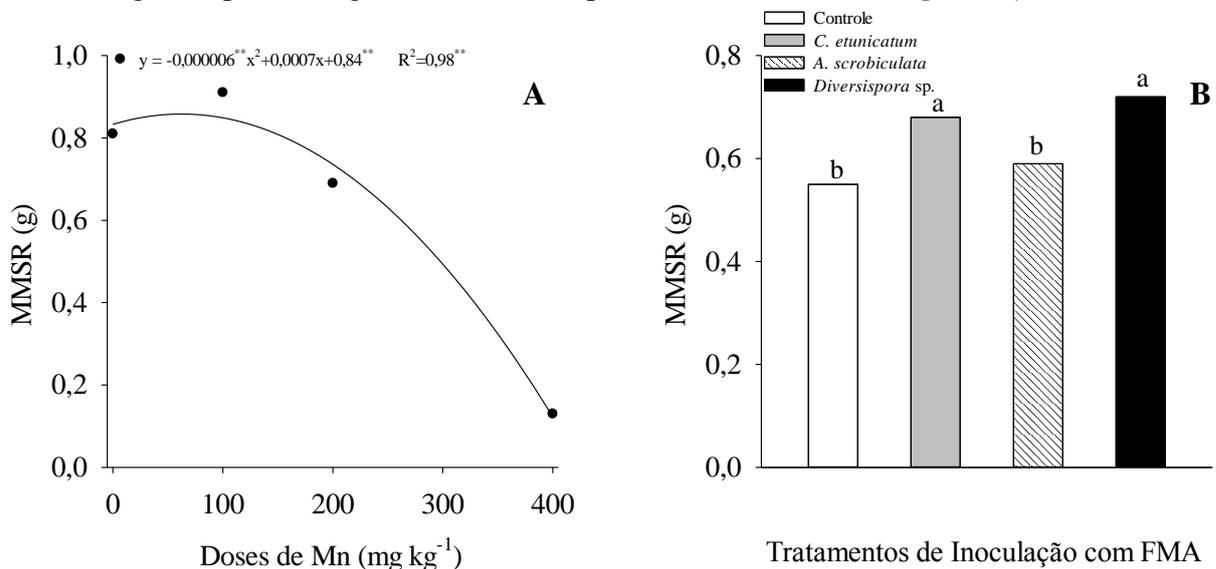
A atuação dos FMA na promoção da MMSPA também foi observada por Garcia *et al.* (2017) em solo com elevado teor de Mn e por Schneider *et al.* (2013) em solo contaminado com arsênio. É importante ressaltar ainda que altas concentrações de metais podem atuar na seleção de determinadas populações de FMA e, por conseguinte, favorecer a dominância de espécies mais adaptadas, possibilitando efeitos diferentes nas plantas de acordo com a espécie de FMA (PEREIRA *et al.*, 2018), como observado no presente estudo.

A MMSR aumentou em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo, ajustando-se ao modelo quadrático, apresentando incremento máximo de 0,86 g até a dose estimada de 65 mg kg⁻¹ de Mn, com tendência de decréscimo a partir deste valor (Figura 17A).

Analisando-se o efeito da inoculação com FMA, constatou-se que a MMSR foi significativamente superior quando as plantas foram inoculadas com o FMA *Diversispora* sp. e *C. etunicatum*, representando incrementos de 30,9% e 23,6%, respectivamente, quando comparadas às do tratamento controle, enquanto que *A. scrobiculata* apresentou resultados

semelhantes a ausência de inoculação (controle) (Figura 17B).

Figura 17 – MMSR de *L. leucocephala* em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letra iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: o autor

Embora o Mn seja um micronutriente essencial as plantas, o excesso desse elemento no solo pode ser responsável por uma série de problemas, como a toxidez foliar que, por sua vez, pode ocasionar a degradação da clorofila, redução na taxa fotossintética e de metabólitos secundários (MACFIE; TAYLOR, 1992; HAUCK *et al.*, 2003; MILLALEO *et al.*, 2010), podendo comprometer o desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, sua biomassa. Resultados similares ao presente estudo também foram observados por Chen *et al.* (2016) ao estudarem o crescimento de raízes de soja sob diferentes níveis de Mn, os quais relataram redução significativa da raiz em função do aumento nos níveis desse elemento no solo.

Os FMA são capazes de atuarem na proteção das plantas contra excesso de metais pesados por diversos mecanismos (CABRAL *et al.*, 2015), podendo assim, contribuir para atenuação dos sintomas de toxidez e influenciarem de maneira positiva a biomassa radicular. Resposta semelhante no aumento da MMSR em plantas colonizadas por FMA também foram observadas por Hashem *et al.* (2016) em plantas de *Solanum lycopersicum* L. cultivadas em solo contaminado por cádmio e por Sadia *et al.* (2016) em plantas de *Triticum aestivum* L. em solo contaminado com até 300 mg kg de zinco.

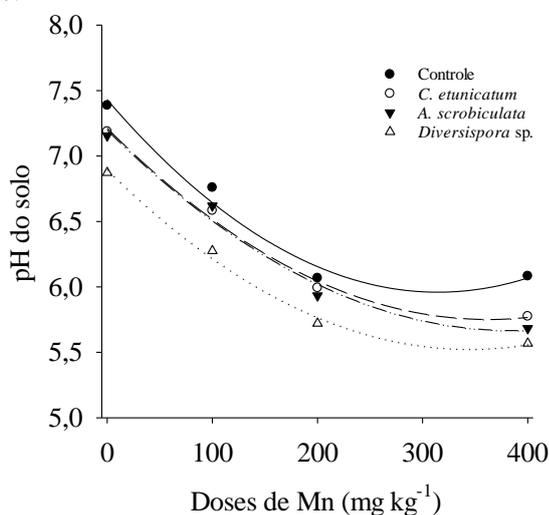
Esses resultados corroboram também com os encontrados por Hristozkova *et al.* (2016) que, ao pesquisarem o efeito de diferentes espécies de FMA em plantas de *Solanum*

lycopersicum L. em solo com cádmio, relataram uma maior biomassa radicular quando as plantas foram inoculadas com o FMA *Claroideoglobus claroideum*.

5.2.2 pH do solo após cultivo

O pH do solo apresentou tendência de decréscimo à medida que se aumentou as doses de Mn aplicadas no solo. De forma geral, todos os tratamentos inoculados com FMA, principalmente com *Diversispora* sp., apresentaram menores valores de pH quando comparado a ausência de inoculação (Figura 18).

Figura 18 – Comportamento do pH do solo após cultivo com *L. leucocephala* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

Comportamento semelhante foi observado também para o pH do solo cultivado com *M. caesalpiniaefolia*, no ensaio I desta tese. Tal fato pode ser explicado pelo excesso de Mn aplicado no solo, assim como já relatado anteriormente.

Vale ressaltar também que as plantas micorrizadas são caracterizadas por uma maior atividade metabólica, principalmente em relação a maior capacidade de absorção de nutrientes (MARSCHNER, 1995; NOGUEIRA, 2001), como já explicado anteriormente no ensaio I. Assim, para manter o equilíbrio eletroquímico na planta, outros cátions como H⁺ são liberados pela raiz e isso pode explicar a maior redução no pH da solução do solo na presença dos FMA (SOUZA *et al.*, 2010).

5.2.3 Densidade de esporos de FMA no solo (DESP) e colonização micorrízica (CM)

Na tabela 8, observa-se que tanto a DESP de FMA no solo quanto a CM foram influenciadas significativamente pelos fatores doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B). Ao analisar o efeito da interação entre doses de Mn e inoculação com FMA (AxB) verificou-se que somente a CM apresentou efeito significativo.

Tabela 8 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de densidade de esporos de FMA no solo (DESP FMA) e colonização micorrízica (CM) de *L. leucocephala* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios	
		DESP FMA	CM
Doses de Mn (A)	3	399807,46**	511,98**
FMA (B)	2	816243,75**	526,92**
Interação (AxB)	6	52275,69 ^{ns}	41,99**
Erro	36	40401,21	9,99
Total	47	-	-
C.V.%	-	18,99	11,65

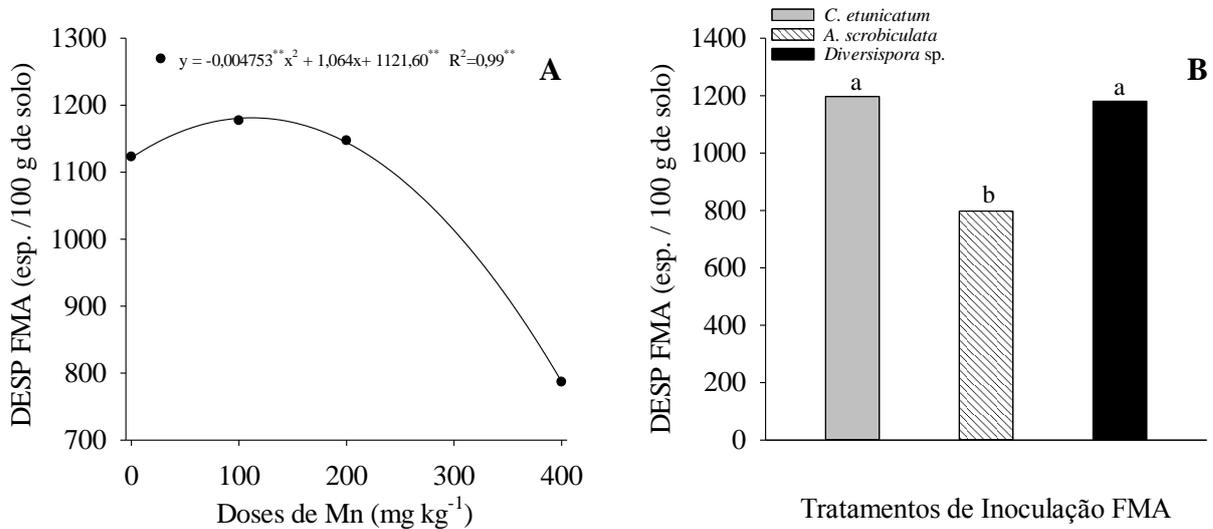
** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

A DESP de FMA no solo aumentou em função das doses crescentes de Mn aplicadas, ajustando-se ao modelo quadrático, apresentando incremento máximo (1181,14 esp. / 100 g de solo) até a dose estimada de 111,9 mg kg⁻¹ de Mn, com tendência de decréscimo a partir deste valor (Figura 19A).

Quanto ao efeito da inoculação com FMA, constatou-se que os maiores valores de DESP de FMA no solo foram observados no tratamento com *C. etunicatum* (1197,18 esp./100 g de solo), seguido do tratamento com *Diversispora* sp. (1180 esp./100 g de solo), os quais diferiram significativamente do tratamento *A. scrobiculata* (797,81 esp./100 g de solo) (Figura 19B).

Figura 19 – DESP de FMA na rizosfera de *L. leucocephala* em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



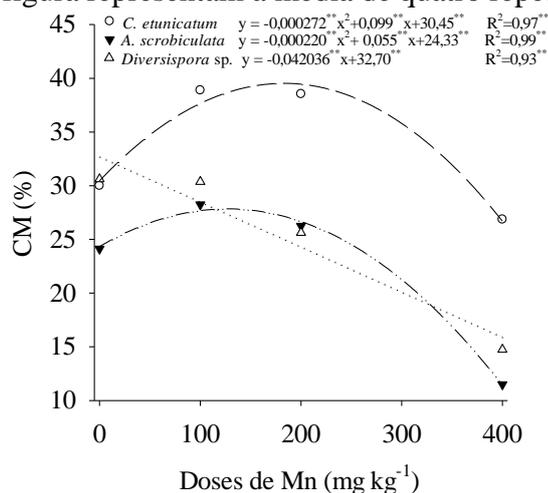
Fonte: o autor

Nas doses iniciais ou mais baixas de Mn no solo, de maneira geral, as plantas apresentaram melhor desenvolvimento e redução nos sintomas de toxidez por Mn. Essa condição pode ter levado a um aumento de esporulação dos FMA, assim como também relatado por Schneider *et al.* (2017) em plantas de *Leucaena leucocephala* associadas com algumas espécies de FMA em solo com baixos níveis de arsênio. Por outro lado, como já mencionado anteriormente, o excesso de Mn no solo pode promover a degradação da clorofila e redução da taxa fotossintética das plantas (ROJAS-LILO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017), influenciando uma menor biossíntese de carboidratos (LYNCH *et al.*, 2012), o que pode ter comprometido a DESP de FMA no solo nos níveis mais elevados de Mn, como observado no presente estudo. Apesar disso, mesmo com a diminuição do número de esporos de FMA em função da adição de doses Mn mais elevadas, estes não desapareceram por completo e apresentaram um número considerado de médio a alto, quando comparado a outros estudos envolvendo metais pesados (RIVERA-BECERRIL *et al.*, 2013; SCHNEIDER *et al.*, 2016), sugestivo de um maior grau de adaptação desses micro-organismos a essas condições de estresse.

Os percentuais de CM variaram em função dos tratamentos de inoculação e das doses de Mn aplicadas ao solo (Figura 20). O tratamento com *C. etunicatum* apresentou os maiores percentuais de CM, ajustando-se ao modelo quadrático, com incremento máximo (39,5%) até a dose estimada de 182,5 mg kg⁻¹ de Mn, com tendência de decréscimo a partir desse valor. Comportamento semelhante também foi observado para o tratamento com *A.*

scrobiculata, o qual apresentou percentual máximo de CM de 27,8% até a dose estimada de 126,5 mg kg⁻¹ de Mn, a partir da qual apresentou decréscimo, enquanto que o tratamento com *Diversispora* sp. ajustou-se ao modelo de resposta linear decrescente, em função do aumento das doses de Mn aplicadas ao solo (Figura 20).

Figura 20 – CM de *L. leucocephala* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

Para alguns tratamentos de inoculação (*C. etunicatum* e *A. scrobiculata*), o aumento nos níveis de Mn, até um certo ponto, estimulou a taxa de CM, sendo esta diminuída com níveis de Mn mais elevados. Conforme Gaur e Adholeya (2004), diferentes espécies de plantas e FMA podem mostrar resultados diferentes em sua susceptibilidade e tolerância aos metais pesados, podendo possivelmente refletir na taxa de colonização.

No entanto, é importante destacar que nem sempre o elevado percentual de CM está correlacionado com um maior benefício às plantas (GAUR *et al.*, 2004; BALOTA; STENZEL, 2011). Em nosso estudo, mesmo sob baixo percentual de CM nas doses mais elevadas de Mn, os FMA apresentaram resultados positivos em todas as variáveis analisadas para *L. leucocephala*, inclusive na diminuição do Mn na parte aérea, o que refletiu em um menor percentual foliar de toxidez por Mn.

Mnasri *et al.* (2017) também observaram resultados semelhantes ao trabalharem com níveis de cádmio e níquel, os quais registraram percentual de CM de 6% e 7%, respectivamente, nos níveis mais elevados desses elementos. Esses resultados corroboram também com os obtidos por Gunathilakae *et al.* (2018) em solo contaminado por cádmio. De acordo com Nogueira e Cardoso (2003), a infectividade e a eficácia da simbiose para diferentes endófitos podem variar de acordo com as interações planta-fungo-ambiente.

5.2.4 Fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R)

De acordo com a análise de variância (Tabela 9), observa-se que o teor de P na parte aérea foi influenciado significativamente pelo fator doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B). Ao analisar a interação entre doses de Mn x inoculação com FMA (AxB) verificou-se que apenas as variáveis Mn parte aérea e Mn na raiz apresentaram efeito significativo.

Tabela 9 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R) de *L. leucocephala* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios		
		P	Mn PA	Mn R
Doses de Mn (A)	3	0,38**	16499725,16**	14501588,45**
FMA (B)	3	0,49**	550271,55**	877726,21**
Interação (AxB)	9	0,06 ^{ns}	181831,67**	561173,07**
Erro	48	0,08	5668,85	14830
Total	63	-	-	-
C.V.%		20,78	8,62	14,51

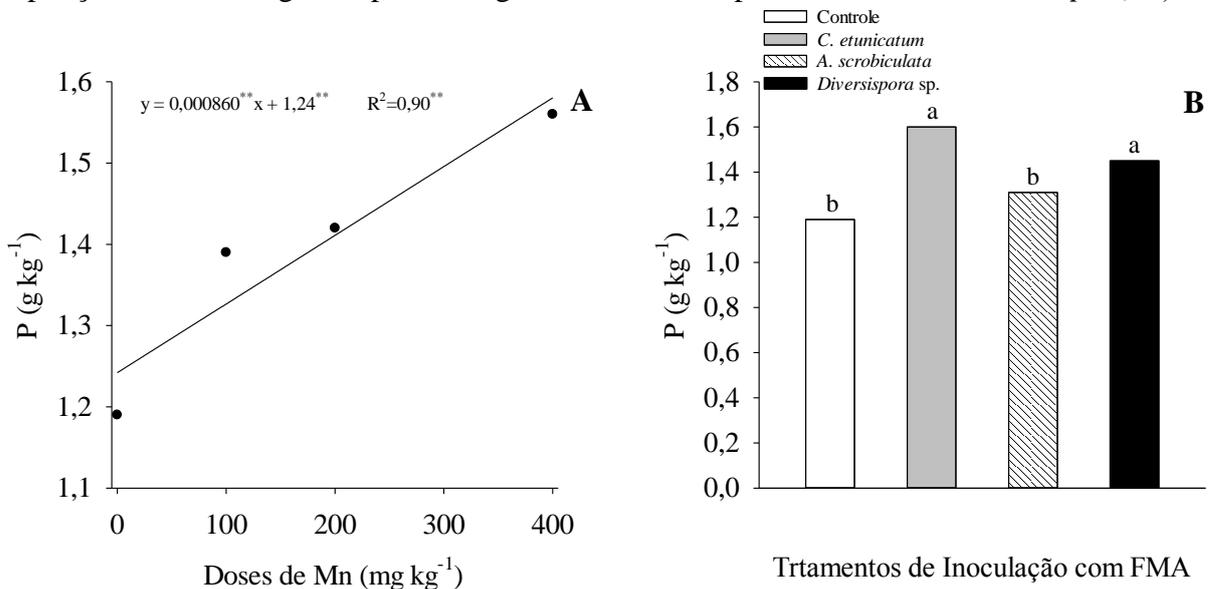
** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

O P na parte aérea apresentou aumento em função das doses de Mn aplicadas ao solo, ajustando-se a um modelo linear crescente (Figura 21A).

Observando-se o efeito da inoculação com FMA, verificou-se que o teor de P na parte aérea foi significativamente superior quando as plantas foram inoculadas com *C. etunicatum* e *Diversispora* sp., representando incrementos de 34,4% e 21,8%, respectivamente, quando comparadas às do tratamento controle, enquanto que *A. scrobiculata* apresentou resultados semelhantes a ausência de inoculação (Figura 21B).

Figura 21 – Teor de P na parte aérea de *L. leucocephala* em função das doses de Mn (A) e tratamentos de inoculação com FMA (B). Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letra iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: o autor

Resposta semelhante a essa foi observada no ensaio I desta tese, realizado com *M. caesalpiniaefolia*. O P possui uma alta ligação de adsorção com alguns cátions metálicos, como Fe e Al (FERNANDO; LYNCH, 2015). Provavelmente o excesso de Mn na solução possa ter reduzido alguns desses cátions metálicos por competição, o que pode ter refletido no aumento de P na solução do solo e consequentemente na parte aérea da planta, juntamente com o Mn.

A melhoria no incremento de P em plantas colonizadas por FMA se deve principalmente a capacidade do micélio externo fúngico em explorar maiores volumes do solo (FERROL *et al.*, 2016). Tal estratégia tem sido fundamental na adaptação e estabelecimento das plantas em locais sob condições adversas, como por exemplo em solos contaminados e degradados pela atividade de mineração, uma vez que esses locais são caracterizados por solos de baixa fertilidade.

Zhou *et al.* (2017), ao estudarem a tolerância de *Tagetes patula* associada a FMA em solo com diferentes níveis de cobre, demonstraram que a inoculação com *Glomus coronatum* contribuiu até 2,1 vezes mais no incremento de P na parte aérea quando comparado às plantas não inoculadas. Resultados semelhantes foram também observados por Yang *et al.* (2016).

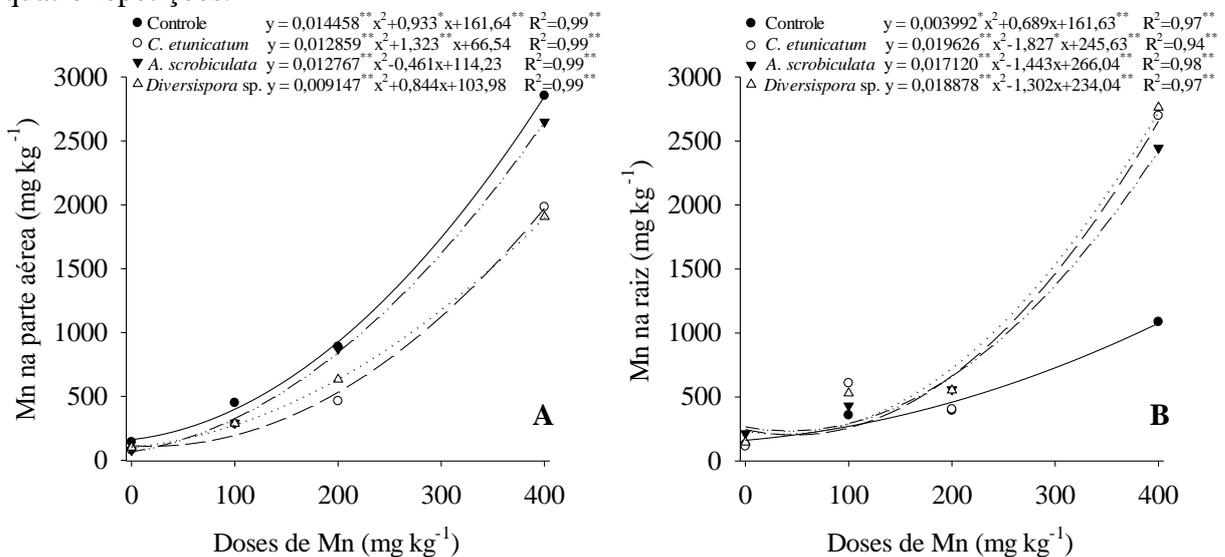
Além disso, é importante salientar que o incremento de P na parte aérea das plantas colonizadas por FMA pode estar relacionado com atenuação da toxidez por Mn.

Conforme alguns autores (FOY, 1984; NOGUEIRA *et al.*, 2007), a maior absorção de P por plantas micorrizadas pode reduzir a relação Mn/P na planta, podendo consequentemente levar a formação de compostos de baixa solubilidade com íon fosfato, diminuindo sua atividade e consequentemente a toxidez na planta.

Os teores de Mn na parte aérea e raiz das plantas aumentaram em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo em todos os tratamentos, evidenciado pelo modelo quadrático (Figura 22A e 22B). Entretanto, na parte aérea, todas as plantas inoculadas com FMA apresentaram diminuição no teor de Mn, quando comparadas às do tratamento controle, principalmente nos tratamentos com *Diversispora* sp. e *C. etunicatum*. Nesse caso, na máxima dose de Mn aplicada no solo, as plantas do tratamento controle apresentaram teores superiores a 2500 mg kg⁻¹ de Mn, ao passo que, nas plantas inoculadas com FMA, como por exemplo no tratamento com *Diversispora* sp., esse teor foi diminuído em mais de 900 mg kg⁻¹ Mn.

Nas raízes, o teor de Mn apresentou comportamento inverso ao da parte aérea, com maior teor desse elemento nas plantas inoculadas com FMA. Na máxima dose de Mn aplicada no solo, as plantas do tratamento controle apresentaram teores inferiores a 1100 mg kg⁻¹ de Mn, enquanto que nas plantas inoculadas com FMA, como por exemplo no tratamento com *Diversispora* sp., esse teor aumentou em mais de 1600 mg kg⁻¹ de Mn. Nesse caso, os tratamentos com *Diversispora* sp., seguido de *C. etunicatum* e *A. scrobiculata* induziram incrementos significativos no teor de Mn na raiz das plantas de 154,07%, 148,21% e 124,92%, respectivamente, comparadas às do tratamento controle (Figura 22B).

Figura 22 – Teor de Mn na parte aérea (A) e raiz (B) de *L. leucocephala* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

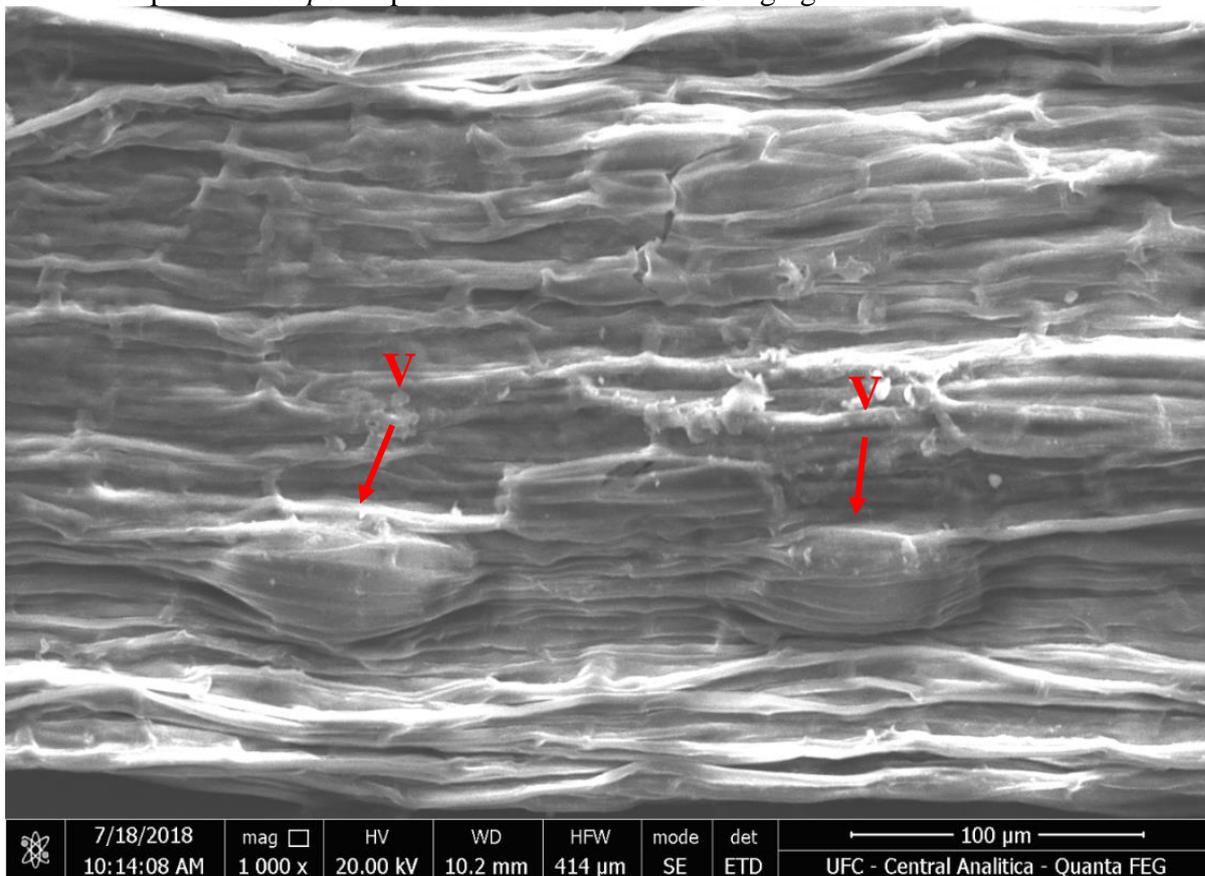
É importante ressaltar que a partir da adição de 200 mg kg⁻¹ de Mn aplicado no solo, todos os tratamentos apresentaram teor de Mn na parte aérea acima dos valores considerados tóxicos para a maioria das espécies vegetais em geral (400 mg kg⁻¹ de Mn na MMSPA) (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Mesmo assim, as plantas inoculadas com FMA foram capazes de apresentar maior tolerância em relação a agressividade da toxidez por este elemento, quando comparadas às do tratamento controle.

A maior tolerância das plantas colonizadas por FMA pode estar relacionada com o maior teor de Mn presente em suas raízes, quando comparado às plantas não colonizadas por FMA. Comportamento semelhante foi observado também por Garcia *et al.* (2017), os quais relataram importância crucial dos FMA na proteção das plantas contra a toxidez por Mn. Apesar desse assunto ainda não ser bem esclarecido, vários mecanismos de desintoxicação de metais pesados envolvendo plantas colonizadas por FMA têm sido relatados na literatura (CHRISTIE *et al.*, 2004; GONZALEZ-CHAVEZ *et al.*, 2002; VODNIK *et al.*, 2008).

Em nosso caso, acreditamos que a diminuição do Mn na parte aérea das plantas colonizadas por FMA esteja também relacionado à retenção e imobilização deste elemento na superfície dos esporos e em outras estruturas fúngicas dos FMA que são formadas no interior da raiz, como as vesículas. Para comprovar essa hipótese foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada a espectroscopia dispersiva de energia (EDS), tornando possível a detecção da ocorrência de percentuais de Mn na superfície dos esporos de FMA, o que refletiu em maior tolerância das plantas colonizadas, confirmando nossa hipótese.

Essa técnica foi utilizada também para analisar um fragmento de raiz colonizado por *Diversispora* sp. e que recebeu a dose de 400 mg kg⁻¹ de Mn (Figura 23). Não foi detectado nenhum percentual deste elemento nas estruturas dos FMA formadas no interior da raiz, principalmente nas vesículas.

Figura 23 – Micrografia eletrônica de varredura de raiz de *L. leucocephala* corada e colonizada por *Diversispora* sp. em tratamento com 400 mg kg^{-1} de Mn. V = vesícula.



Fonte: o autor

Nesse caso, acreditamos que os tratamentos que foram empregados na técnica de coloração da raiz para verificação da colonização micorrízica possam ter interferido na detecção do Mn nas vesículas. Assim, torna-se necessário a realização de estudos mais aprofundados para confirmação de tal fato, visto que atualmente existem poucas informações nessa área de prospecção.

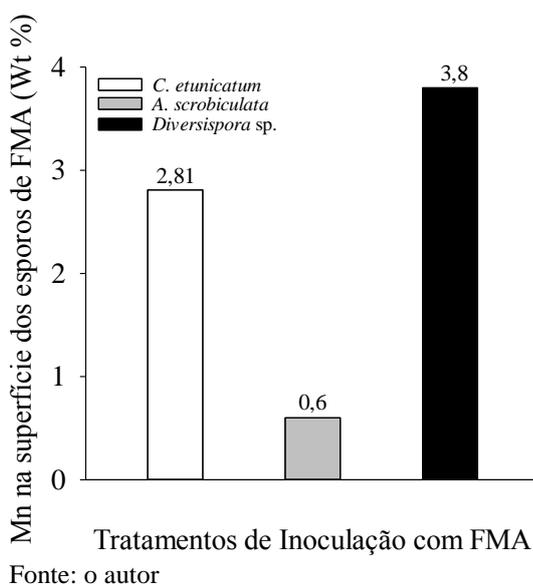
5.2.5 Manganês na superfície dos esporos de FMA através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A análise elementar utilizando MEV e EDS permitiu detectar percentuais de Mn, com base em peso desse elemento presente na amostra (Wt%), na superfície dos esporos de FMA extraídos do solo em que foi adicionado 400 mg kg^{-1} de Mn e cultivado com *Leucaena leucocephala* (Figura 24).

Os percentuais de Mn na superfície dos esporos variaram de acordo com a espécie de FMA, correspondendo a 3,8%, 2,81% e 0,6%, respectivamente, para os tratamentos com *Diversispora* sp., *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*. Na ausência da adição de Mn no solo (0 mg

kg⁻¹), os percentuais desse elemento na superfície dos esporos foram indetectáveis e por isso não foram plotados no gráfico (Figura 24).

Figura 24 – Mn na superfície dos esporos de FMA (Wt %) obtido pela técnica de EDS. Os valores são referentes aos esporos de FMA extraídos do solo com 400 mg kg⁻¹ de Mn cultivado com *L. leucocephala*.



De forma semelhante ao ensaio I, os percentuais de Mn na superfície dos esporos também variaram de acordo com a espécie de FMA, reforçando novamente a idéia de que diferentes espécies de FMA podem induzir diferentes graus de tolerância a capacidade de acúmulo quanto ao Mn.

Notou-se ainda que os maiores percentuais de Mn foram observados na superfície do esporo de *Diversispora sp.*. Esse fato pode estar relacionado a maior adaptação e tolerância desse FMA ao Mn, tendo em vista que foi isolado de uma área de mineração de Mn com elevada concentração desse elemento. Conforme Sánchez-Castro *et al.* (2017), espécies de FMA nativos isolados de locais contaminados por metais pesados a longo prazo podem assumir importante papel na revegetação dessas áreas.

Os percentuais de Mn na superfície dos esporos de FMA, obtidos com auxílio de MEV e EDS, ainda são difíceis de serem interpretados, principalmente por se tratar de um fato pouco estudado e pela escassez de outros resultados comparativos. Entretanto, observamos que os valores para essa variável foram relativamente maiores nos esporos extraídos do solo cultivado com *L. leucocephala*, com exceção dos esporos da espécie *A. scrobiculata*, quando comparados aos observados no ensaio I, com *M. caesalpiniaefolia*, sugestivo de uma mudança no comportamento do acúmulo de Mn nestes micro-organismos, a

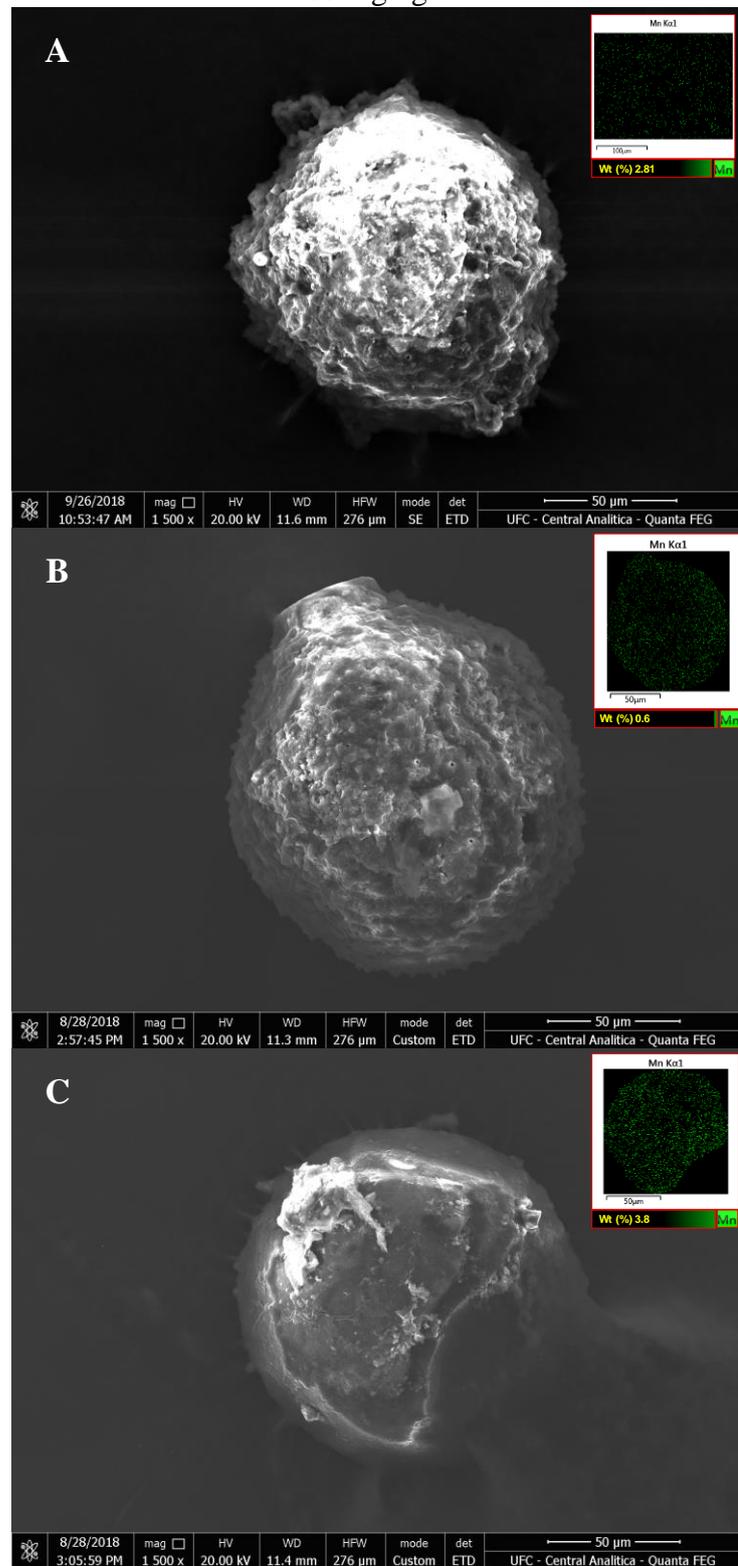
dependem da espécie vegetal.

Estudos têm demonstrado que nem sempre a colonização por diferentes FMA resulta nas mesmas respostas em uma única planta (SMITH *et al.*, 2011; SALAZAR *et al.*, 2018). Tal fato pode ser indicativo também de que diferentes espécies de FMA podem refletir em um comportamento diferente quanto ao acúmulo de Mn nos esporos, como observado no presente estudo. Além disso, deve ser ressaltado que a espessura da parede dos esporos de FMA pode estar relacionada com algum fator estratégico do próprio fungo para evitar a entrada de metais pesados em outros compartimentos que poderiam ocasionar maiores danos, como ocorre em outros organismos (GIANINAZZI-PEARSON *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-GUERRERO *et al.*, 2008). Dessa forma, a menor eficiência de *A. scrobiculata*, observada em quase todos os resultados, pode estar associada a uma menor espessura de sua parede, quando comparados aos demais nesse estudo. Contudo, seria necessário uma análise específica e mais detalhada para mensurar a parede dos esporos e confirmar tal hipótese.

De forma geral, os resultados dessa pesquisa indicam que o acúmulo de Mn na superfície dos esporos de FMA pode se constituir num dos mecanismos para conferir maior tolerância também a *L. leucocephala*, uma vez que, esse fato coincidiu diretamente com o melhor desenvolvimento das plantas, incremento nutricional, redução do Mn na parte aérea e no percentual foliar de toxidez.

Além da detecção de Mn na superfície dos esporos de FMA, a MEV, permitiu a obtenção de imagens com maior nível de detalhes (Figura 25). Nessas imagens, pontos mais claros são tidos como de maior densidade eletrônica, onde são encontrados elementos mais densos como os metais.

Figura 25 – Micrografia eletrônica de varredura (MEV) e resultados da espectroscopia por dispersão de energia (EDS) em esporos de FMA (A- *C. etunicatum*; B - *A. scrobiculata*; C – *Diversispora* sp.) extraídos de solo com 400 mg kg⁻¹ de Mn e cultivado com *L. leucocephala*.



Fonte: o autor

5.2.6 Percentual foliar de toxidez (PFT)

O PFT foi influenciado significativamente pelas doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B), assim como pela interação entre as duas fontes de variação (AxB) (Tabela 10).

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para o percentual foliar de toxidez (PFT) de *L. leucocephala* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

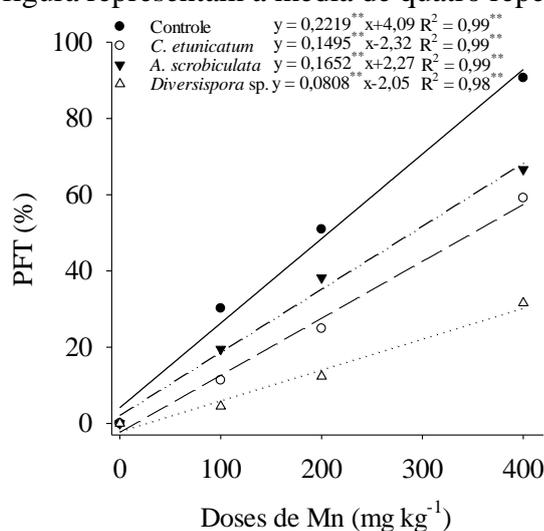
F. V.	G.L.	Quadrados Médios
		PFT
Doses de Mn (A)	3	11128,68**
FMA (B)	3	2678,53**
Interação (AxB)	9	431,16**
Erro	48	77,75
Total	63	-
C.V.%		32,04

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

Todos os tratamentos de inoculação com FMA apresentaram um comportamento linear crescente para o PFT em função das doses de Mn aplicadas no solo (Figura 26). A inoculação com FMA reduziu de maneira significativa o percentual foliar de toxidez. Na máxima dose de Mn aplicada ao solo, apesar da maior intensidade de toxidez, os tratamentos com *Diversispora* sp., seguido de *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*, proporcionaram uma redução no PFT de 65,15 %, 34,74 %, 26,47 %, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle (Figura 26).

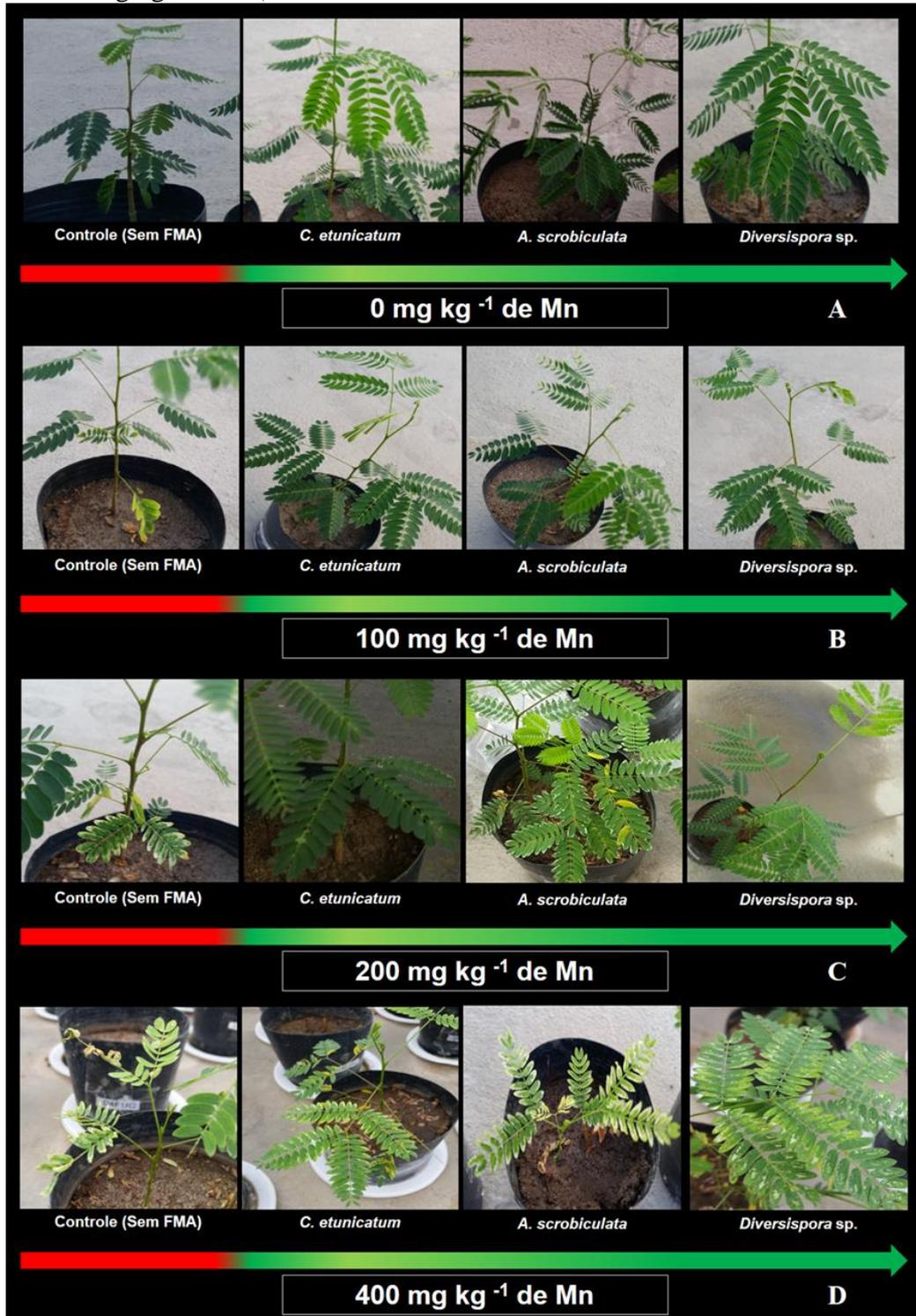
Figura 26 – PFT de *L. leucocephala* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

Ao final da condução experimental, na ausência da adição de Mn no solo (0 mg kg^{-1}), as plantas não apresentaram nenhum sintoma foliar de toxidez referente a esse elemento (Figura 27A).

Figura 27 – Aspecto dos sintomas de toxidez foliar por Mn em plantas de *L. leucocephala* aos 60 dias após transplante (A – 0 mg kg^{-1} de Mn, B – 100 mg kg^{-1} de Mn, C – 300 mg kg^{-1} de Mn e D – 400 mg kg^{-1} de Mn).



Fonte: o autor

Com a aplicação de doses crescentes de Mn no solo, a toxidez foliar se intensificou, principalmente na ausência de inoculação com FMA (Figura 27B, 27C e 27D). É importante ressaltar também que esses sintomas foram mais agressivos no tratamento com *A. scrobiculata*, quando comparado aos demais FMA, ainda assim, menos intenso do que nas plantas não inoculadas.

Os principais sintomas foliares de toxidez por Mn observados foram caracterizados pela formação de manchas marrons, clorose e necrose. Estes mesmos sintomas também foram relatados por Yang *et al.* (2013) e Chen *et al.* (2018). Além disso, na máxima dose de Mn aplicada no solo (400 mg kg^{-1}), foi notável nas plantas sem colonização por FMA a presença de alguns folíolos engruvinhados.

Apesar da CM ter apresentado diminuição em função das doses mais elevadas de Mn, notou-se que a simbiose com os FMA foi eficaz e atenuou os sintomas de toxidez foliar por Mn nas plantas de *Leucaena leucocephala*. Essa resposta está associada a melhoria na nutrição das plantas, ao maior teor de Mn nas raízes e a capacidade dos esporos de FMA em conseguir acumular Mn em sua superfície, refletindo assim, em menor translocação desse elemento para a parte aérea da planta, potencializando sua tolerância sob estas condições.

5.3 Experimento com *Acacia mangium* Willd.

5.3.1 Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR)

A análise de variância evidenciou diferença significativa entre as doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B) para MMSPA e MMSR (Tabela 11). Ao analisar o efeito da interação entre essas duas fontes de variação (AxB) verificou-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo (Tabela 11).

Tabela 11 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e raiz (MMSR) de *A. mangium* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios	
		MMSPA	MMSR
Doses de Mn (A)	3	1,44**	0,52**
FMA (B)	3	5,72**	0,76**
Interação (AxB)	9	0,61*	0,03*
Erro	48	0,29	0,01
Total	63	-	-
C.V.%	-	18,96	14,89

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

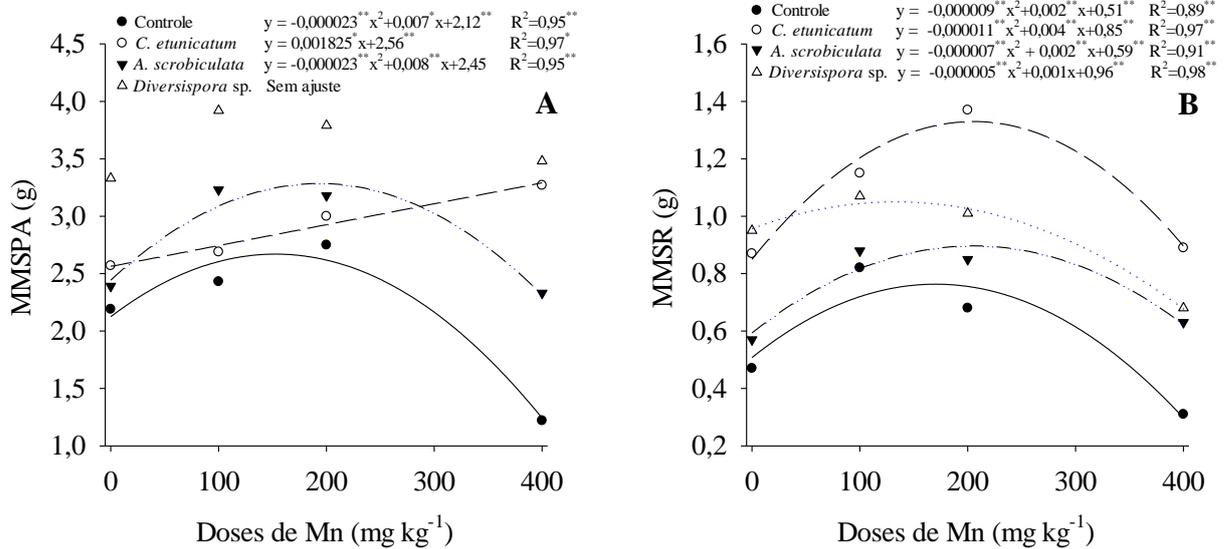
Fonte: o autor

A MMSPA inicialmente apresentou tendência de aumento e, à medida que as doses de Mn aumentaram, esta passou a diminuir em todos os tratamentos, ajustando-se a modelos quadráticos de regressão, com exceção do tratamento com *C. etunicatum* e *Diversispora* sp., os quais apresentaram ajuste linear crescente e ausência de ajuste matemático, respectivamente (Figura 28A). As plantas inoculadas com *A. scrobiculata* e controle, tiveram incrementos de 3,14g e 2,65g na MMSPA até as doses estimadas de 173,91 mg kg⁻¹ e 152,17 mg kg⁻¹ de Mn, respectivamente, enquanto que as plantas inoculadas com *C. etunicatum* tiveram máximo incremento de 3,27g na MMSPA, na dose de 400 mg kg⁻¹ de Mn. Já o tratamento com *Diversispora* sp., mesmo sem ajuste matemático, apresentou valores de MMSPA superiores aos demais tratamentos avaliados, em todas as doses de Mn aplicadas no solo (Figura 28A).

A MMSR das plantas de todos os tratamentos ajustou-se ao modelo quadrático, em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo (Figura 28B). As plantas inoculadas com *C. etunicatum*, *Diversispora* sp. e *A. scrobiculata*, respectivamente, apresentaram incrementos de 1,21g, 1,01g e 0,73 g na MMSR até as doses estimadas de 181,81 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ e 142,85 mg kg⁻¹ de Mn, respectivamente, com tendência de diminuição a partir destes valores. Todos os tratamentos em que houve inoculação com FMA apresentaram

valores de MMSR superiores ao tratamento controle (Figura 28B).

Figura 28 – MMSPA (A) e MMSR (B) de *A. mangium* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

As plantas de acácia micorizadas apresentaram maior incremento em MMSPA e MMSR em todas as doses de Mn avaliadas quando comparadas às do tratamento controle. Esse fato pode ser explicado pela maior atenuação da toxidez por Mn e conseqüentemente maior preservação da biomassa das plantas de *A. mangium* colonizadas por FMA. Conforme Liu *et al.* (2014), a biomassa tem sido utilizada como um parâmetro de grande importância para identificar a tolerância a toxidez por metais em plantas cultivadas.

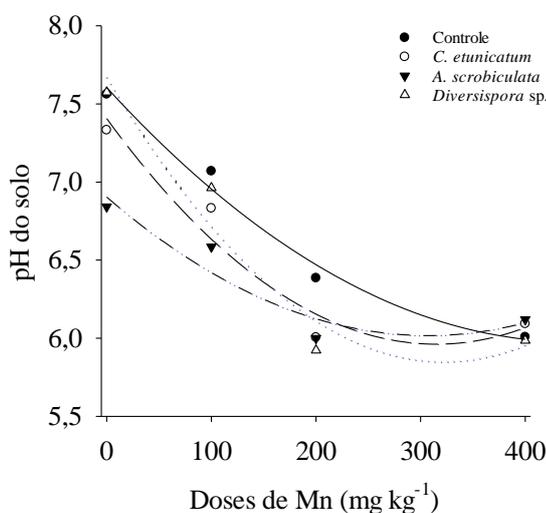
Resultados semelhantes também foram observados por Elhindi *et al.* (2018) para a MMSPA e MMSR de plantas de *Tagetes erecta* L. colonizadas por FMA e cultivadas em solo contaminado com zinco, cobre, chumbo e cádmio, reforçando o papel do fungo no desenvolvimento e tolerância de plantas. Comportamento semelhante também foi evidenciado por Li *et al.* (2018) em plantas de *Medicago sativa* cultivadas em solo contaminado com arsênio e por Amir *et al.* (2019) com plantas de *Metrosideros laurifolia*, em solo contaminado por níquel, cromo e manganês.

Observou-se também que as plantas de acácia apresentaram maior massa de matéria seca quando comparadas às espécies de *M. caesalpiniaefolia* e *L. leucocephala*, nos ensaios I e II desta tese. Possivelmente esse comportamento pode estar relacionado a folhagem mais densa e ao maior tempo que essa espécie permaneceu em casa de vegetação.

5.3.2 pH do solo após cultivo

O pH do solo apresentou tendência de diminuição à medida que se aumentou as doses de Mn aplicadas no solo. De forma geral, todos os tratamentos inoculados com FMA, principalmente com *Diversispora* sp., apresentaram menores valores de pH, quando comparado a ausência de inoculação (Figura 29).

Figura 29 – Comportamento do pH do solo após cultivo com *A. mangium* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores representam a media de quatro repetições.



Fonte: o autor

O pH do solo após cultivo apresentou um padrão de resposta semelhante aos observados nos ensaios I (*M. caesalpiniaefolia*) e II (*L. leucocephala*) desta tese, respectivamente. Nota-se que em todos os tratamentos houve uma tendência de diminuição do pH em função do aumento das doses de Mn aplicadas no solo, o que pode ser explicado pelo excesso desse elemento.

Ainda nesse contexto, observou-se também que micorrizas arbusculares apresentam um comportamento mais expressivo na diminuição do pH, quando comparado ao tratamento controle. Tal fato deve-se a maior atividade metabólica das plantas micorrizadas, principalmente em relação a maior capacidade de absorção de nutrientes (MARSCHNER, 1995; NOGUEIRA, 2001), o que pode resultar também na diminuição do pH da solução do solo na presença dos FMA, como já foi mencionado e explicado anteriormente.

Podemos observar ainda, de maneira geral, que o pH do solo após cultivo de *A. mangium* apresentou valores mais elevados, principalmente nas maiores doses de Mn, quando

comparados aos observados com *M. caesalpiniaefolia* e *L. leucocephala*, respectivamente. Essas diferenças podem estar relacionadas às características fisiológicas das espécies vegetais utilizadas, assim como também pela associação estabelecida com os FMA em cada caso. Resultados semelhantes foram igualmente observados por Nascimento *et al.* (2003).

5.3.3 Densidade de esporos de FMA no solo (DESP) e colonização micorrízica (CM)

De acordo com a análise de variância (Tabela 12), observa-se que tanto a DESP de FMA quanto a CM foram influenciadas significativamente pelas doses de Mn (A) e inoculação com FMA (B), assim como pela interação entre essas duas fontes de variação (AxB).

Tabela 12 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de densidade de esporos de FMA no solo (DESP FMA) e colonização micorrízica (CM) de *A. mangium* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios	
		DESP FMA	CM
Doses de Mn (A)	3	581267,35**	204,88**
FMA (B)	3	172351,39**	677,07**
Interação (AxB)	6	185180,64**	109,98**
Erro	36	6171,28	34,06
Total	47	-	-
C.V.%	-	8,06	16,05

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

A DESP de FMA no solo ajustou-se ao modelo quadrático para todos os tratamentos de inoculação com FMA, em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo (Figura 30A). O tratamento com *Diversispora* sp. apresentou maior DESP de FMA no solo, com incremento máximo de 1336,48 esp./ 100 g de solo até a dose estimada de 39,07 mg kg⁻¹ de Mn, a partir da qual apresentou decréscimo (Figura 30A). Os tratamentos com *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*, respectivamente, apresentaram incrementos máximos de 1129,94 e 1123,98 esp./100 g de solo até as doses estimadas de 230,61 mg kg⁻¹ e 166,97 mg kg⁻¹ de Mn, com tendência de decréscimo a partir destes valores (Figura 30A).

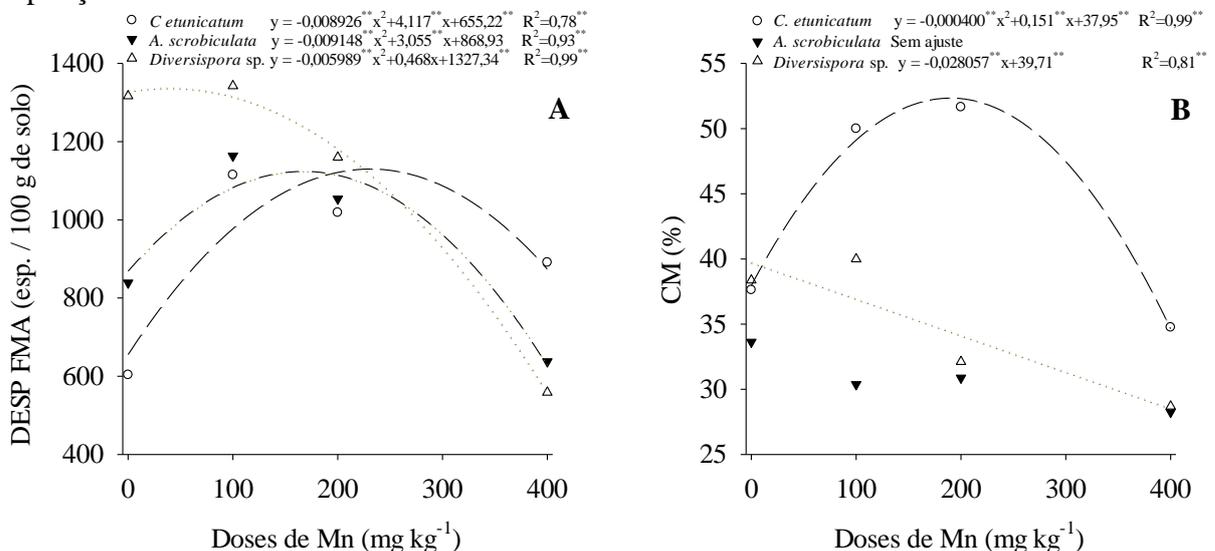
O aumento na DESP de FMA no solo foi estimulado, até certo limite, pela adição da menor dose de Mn no solo. Doses mais elevadas desse elemento provocaram diminuição significativa na DESP de FMA, principalmente do tratamento com *Diversispora* sp., evidenciando efeito tóxico para esporulação desses micro-organismos. Contudo, isso não se

refletiu em maiores prejuízos para as plantas de acácia, visto que nesse tratamento todas elas apresentaram bom desenvolvimento. Em geral, o número de esporos de FMA no solo foi considerado de médio a alto quando comparado a outros resultados observados em solos contaminados por metais pesados (ZAREI *et al.*, 2008; CORNEJO *et al.*, 2013; LERMEN *et al.*, 2015).

Entretanto, notou-se que no nível mais alto de contaminação do solo por Mn, a média geral do número de esporos extraídos do solo cultivado com *A. mangium* foi relativamente menor, principalmente no tratamento com *Diversispora* sp., quando comparados aos dos solos cultivados com *M. caesalpiniaefolia* e *L. leucocephala*, observados nos ensaios I e II desta tese, respectivamente. Efeito semelhante na densidade de esporos de FMA foram observados por Del Val *et al.* (1999) ao estudarem a diversidade de populações de FMA em diferentes espécies vegetais cultivadas em solos contaminados por metais pesados. Esses autores sugerem que a planta hospedeira pode exercer seletividade por determinadas espécies de FMA, influenciando em sua multiplicação. Tal resultado indica que pode existir mecanismos bioquímicos específicos de reconhecimento entre a planta hospedeira e os FMA que podem conferir certo grau de especificidade a simbiose (SCHEUBLIN *et al.*, 2004; GOMIDE *et al.*, 2009).

Além disso, vale ressaltar que a espécie *A. mangium* possui um crescimento mais lento quando comparado às espécies *M. caesalpiniaefolia* e *L. leucocephala*, fato esse que também pode ter contribuído para os resultados do presente estudo.

Figura 30 – DESP de FMA no solo (A) e CM (B) de *A. mangium* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

A CM variou em função dos tratamentos de inoculação com FMA e das doses de Mn aplicadas no solo (Figura 30B). O tratamento com *C. etunicatum* apresentou os maiores percentuais de CM, ajustando-se ao modelo quadrático, com incremento máximo de 52,20% até a dose estimada de 188,75 mg kg⁻¹ de Mn, a partir da qual apresentou decréscimo (Figura 30B). O tratamento com *Diversispora* sp. ajustou-se ao modelo linear decrescente e apresentou diminuição da CM em função do aumento das doses de Mn aplicadas ao solo (Figura 30B), enquanto que o tratamento com *A. scrobiculata* não permitiu ajuste matemático para esta variável (Figura 30B).

O aumento nas doses de Mn aplicadas no solo reduziu significativamente o percentual de CM das plantas de *A. mangium*. Apesar disso, notou-se que a simbiose micorrízica foi eficaz e não limitou o desenvolvimento das plantas, principalmente nos tratamentos com *C. etunicatum* e *Diversispora* sp.. Vale ressaltar ainda que no tratamento com *Diversispora* sp. houve maior incremento de P na parte aérea das plantas de *A. mangium*, mesmo sob redução no percentual de CM. Isso reforça mais uma vez que nem sempre os benefícios micorrízicos estão associados ao percentual de CM (KANWAL *et al.*, 2016) e que o controle da CM por FMA, nesses ambientes, pode ser considerado uma estratégia (SCHNEIDER *et al.*, 2017).

Efeito similar foi observado também por Merlos *et al.* (2016) em plantas de milho cultivadas em solo contaminado com cobre. De acordo com esses autores o percentual de CM foi reduzido, aproximadamente, de 43% para 22%, no nível mais elevado de cobre. Chang *et al.* (2018), pesquisando o efeito da simbiose micorrízica arbuscular sobre o crescimento de milho em solo contaminado com cádmio, também relataram redução significativa no percentual de CM com aumento dos níveis desse elemento aplicado no solo, registrando uma taxa de colonização de 22% no nível mais elevado.

5.3.4 Fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R)

Conforme a análise de variância (Tabela 13), observa-se que o P na parte aérea apresentou efeito significativo apenas para o fator isolado inoculação com FMA (B). Ao analisar a interação entre doses de Mn x inoculação com FMA (AxB) verificou-se que apenas as variáveis Mn na parte aérea e Mn na raiz apresentaram efeito significativo.

Tabela 13 – Resumo da análise de variância para os parâmetros de fósforo na parte aérea (P) e manganês na parte aérea (Mn PA) e raiz (Mn R) de *A. mangium* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

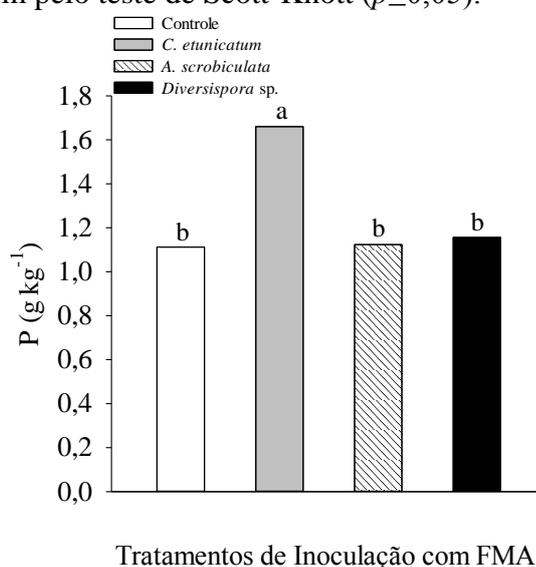
F. V.	G.L.	Quadrados Médios		
		P	Mn PA	Mn R
Doses de Mn (A)	3	0,15 ^{ns}	16298487,11 ^{**}	61033010,64 ^{**}
FMA(B)	3	1,12 ^{**}	1286988,75 ^{**}	8372815,08 ^{**}
Interação (AxB)	9	0,11 ^{ns}	373454,68 ^{**}	1666044,99 ^{**}
Erro	48	0,09	40046,71	294781,6
Total	63	-	-	-
C.V.%	-	24,92	22,05	21,09

^{**} e ^{*} - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

O teor de P na parte aérea foi significativamente superior quando as plantas foram inoculadas com *C. etunicatum* (1,66 g kg⁻¹), comparadas às do tratamento com *Diversispora* sp. (1,15 g kg⁻¹), *A. scrobiculata* (1,12 g kg⁻¹) e controle (1,11 g kg⁻¹) (Figura 31).

Figura 31 – Teor de P na parte aérea de *A. mangium* em função dos tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições. Médias seguidas por letra iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



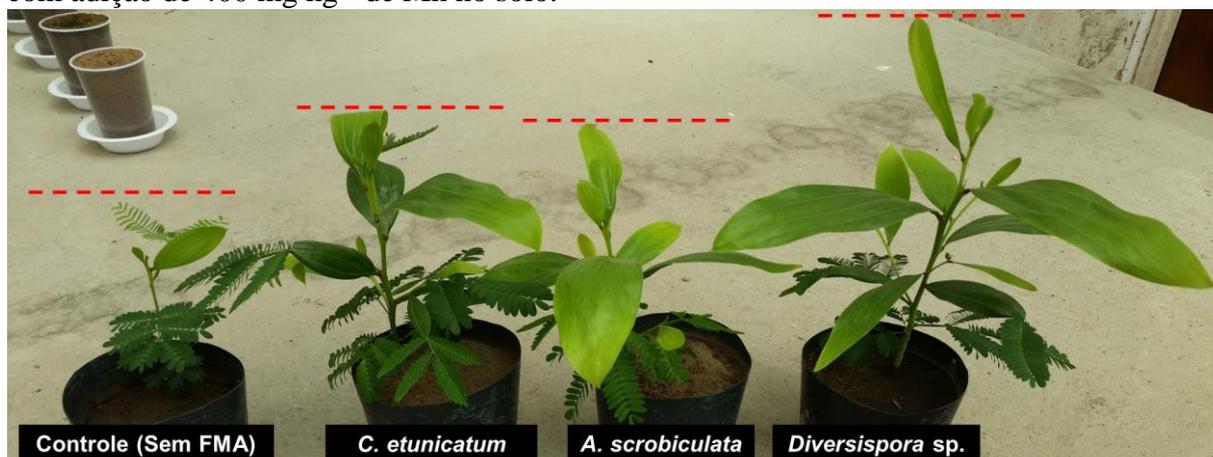
Fonte: o autor

O efeito do FMA *C. etunicatum* no incremento de P na parte aérea das plantas foi bem mais expressivo quando comparado aos demais tratamentos de inoculação, inclusive o controle. De forma geral, a melhoria no incremento nutricional das plantas micorrizadas tem sido associado ao maior volume de solo explorado pelas hifas fúngicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Notou-se ainda que não houve diferença entre os tratamentos com *Diversispora* sp.

e *A. scrobiculata* no teor de P na parte aérea, quando comparado às plantas do tratamento controle. Este fato pode estar relacionado a um efeito de diluição do P nas folhas, tendo em vista o maior crescimento das plantas de *A. mangium* associadas aos FMA (Figura 32). Resultados semelhantes foram observados também por Rodrigues *et al.* (2018) em plantas de *Tectona grandis*. Nossos resultados corroboram também com os observados por Wang *et al.* (2016) e Amir *et al.* (2019).

Figura 32 – Crescimento das plantas de *A. mangium* sob inoculação com FMA no tratamento com adição de 400 mg kg⁻¹ de Mn no solo.



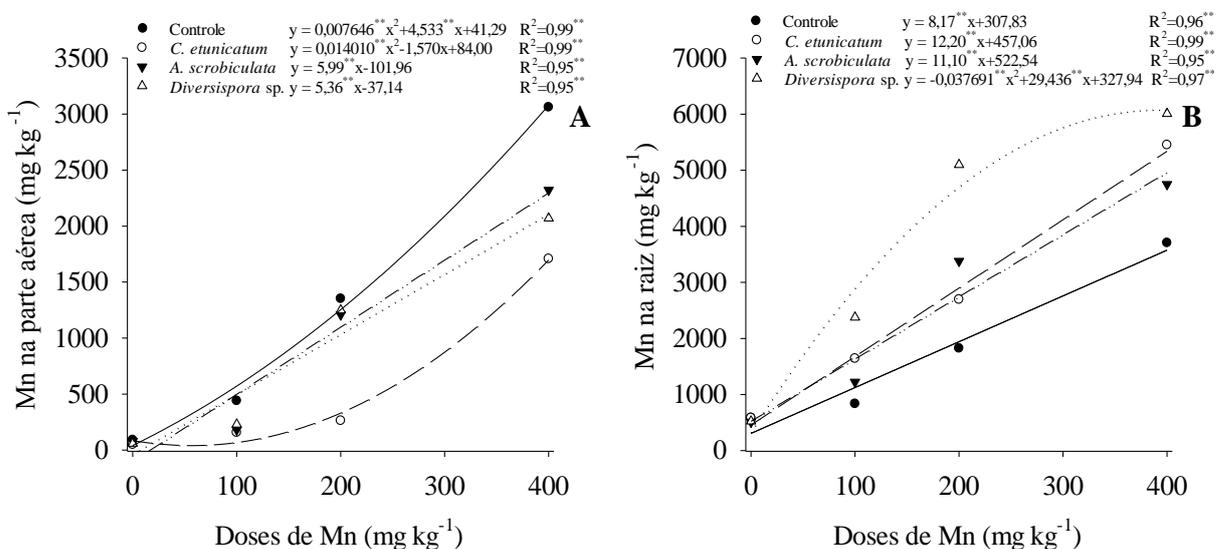
Fonte: o autor

Os teores de Mn na parte aérea das plantas aumentaram em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo em todos os tratamentos, conforme modelo quadrático (controle e *C. etunicatum*) e linear crescente (*A. scrobiculata* e *Diversispora* sp.) (Figura 33A). No entanto, todas as plantas inoculadas com FMA foram capazes de reduzir o teor de Mn na parte aérea, quando comparadas às do tratamento controle. Sendo assim, na máxima dose de Mn aplicada no solo, as plantas do tratamento controle apresentaram teores superiores a 3000 mg kg⁻¹ de Mn, ao passo que, nas plantas inoculadas com FMA, como por exemplo no tratamento com *C. etunicatum*, esse teor foi diminuído em mais de 1300 mg kg⁻¹ em relação ao controle (Figura 33A).

Os teores de Mn nas raízes também apresentaram tendência de aumento em função das doses crescentes de Mn aplicadas no solo em todos os tratamentos, os quais ajustaram-se ao modelo quadrático (*Diversispora* sp.) e linear (*C. etunicatum*, *A. scrobiculata* e controle) (Figura 33B). Entretanto, nas raízes, o teor de Mn apresentou comportamento inverso ao da parte aérea, com maior teor desse elemento nas plantas inoculadas com FMA. Na máxima dose de Mn aplicada no solo, as plantas do tratamento controle apresentaram

teores inferiores a 3750 mg kg^{-1} de Mn, ao passo que, nas inoculadas com FMA, como por exemplo no tratamento com *Diversispora* sp., esse teor aumentou em mais de 2280 mg kg^{-1} de Mn, em relação ao controle. Nessa situação, os tratamentos com *Diversispora* sp., seguido de *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*, apresentaram incrementos significativos no teor de Mn nas raízes das plantas de 62,02%, 47,05% e 28,08%, respectivamente, comparadas às do tratamento controle (Figura 33B).

Figura 33 – Teor de Mn na parte aérea (A) e raiz (B) de *A. mangium* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

Elevados teores de Mn no solo podem ser altamente tóxicos para as plantas. Apesar disso, algumas espécies podem se desenvolver em solos com excesso desse elemento (GARCIA *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2018). Um dos mecanismos de tolerância das plantas ao Mn pode estar relacionado ao estabelecimento da associação simbiótica com os FMA. Entretanto, esses possíveis mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos.

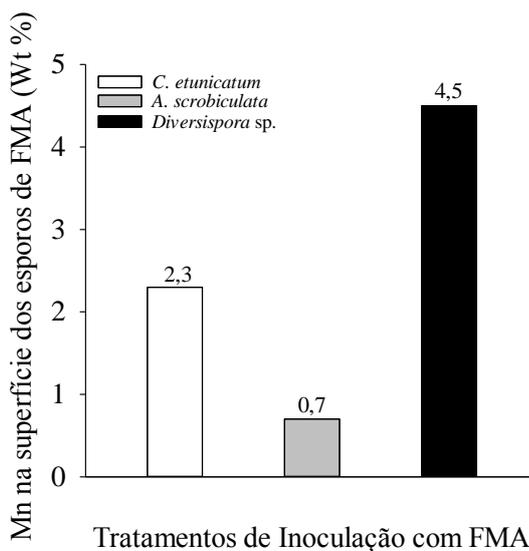
Em nossos resultados observamos que a inoculação com FMA aumentou a tolerância das plantas de *A. mangium* ao Mn, aumentando significativamente os teores desse elemento nas raízes e diminuindo na parte aérea, quando comparado às não inoculadas, principalmente nas condições mais extremas de Mn aplicadas no solo (400 mg kg^{-1}). Ainda assim, os teores de Mn observados na parte aérea foram considerados elevados e acima do limite tóxico para maioria das espécies vegetais (KABATAPENDIAS; PENDIAS, 2001). No entanto, isso não resultou em grandes limitações ao desenvolvimento das plantas de *A. mangium*, quando comparado às não inoculadas.

É importante ressaltar ainda que os teores de Mn nas raízes foram bem mais elevados nas plantas de *A. mangium* micorrizadas, quando comparado a *M. caesalpiniaefolia* e *L. leucocephala*, respectivamente, nos ensaios I e II desta tese, chegando a atingir em alguns tratamentos valores aproximados a 6000 mg kg^{-1} de Mn. Isso pode explicar em parte a maior capacidade adaptativa dessa espécie vegetal frente às condições mais extremas de Mn e sua possibilidade de uso em programas de revegetação de áreas contaminadas por esse elemento. Além disso, através de análises de MEV e EDS, foi demonstrado em nosso estudo que os esporos dos FMA acumulam Mn na sua superfície, podendo funcionar como uma barreira biológica para diminuir a translocação desse elemento para a parte aérea das plantas e aumentar sua tolerância.

5.3.5 Manganês na superfície dos esporos de FMA através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A análise elementar utilizando MEV e EDS permitiu detectar percentuais de Mn, com base em peso desse elemento (Wt%), na superfície dos esporos de FMA extraídos do solo em que foi adicionado 400 mg kg^{-1} de Mn e cultivado com *Acacia mangium* Willd. (Figura 34).

Figura 34 – Mn na superfície dos esporos de FMA (Wt %) obtidos pela técnica de EDS. Os valores são referentes aos esporos de FMA extraídos do solo com 400 mg kg^{-1} de Mn cultivado com *A. mangium*.



Fonte: o autor

Os percentuais de Mn na superfície dos esporos variaram de acordo com a espécie

de FMA, correspondendo a 4,5, 2,3 e 0,7%, respectivamente, para os tratamentos com *Diversispora* sp., *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*. Na ausência da adição de Mn no solo (0 mg kg^{-1}), os percentuais desse elemento na superfície dos esporos foram indetectáveis e por isso não foram plotados no gráfico (Figura 34).

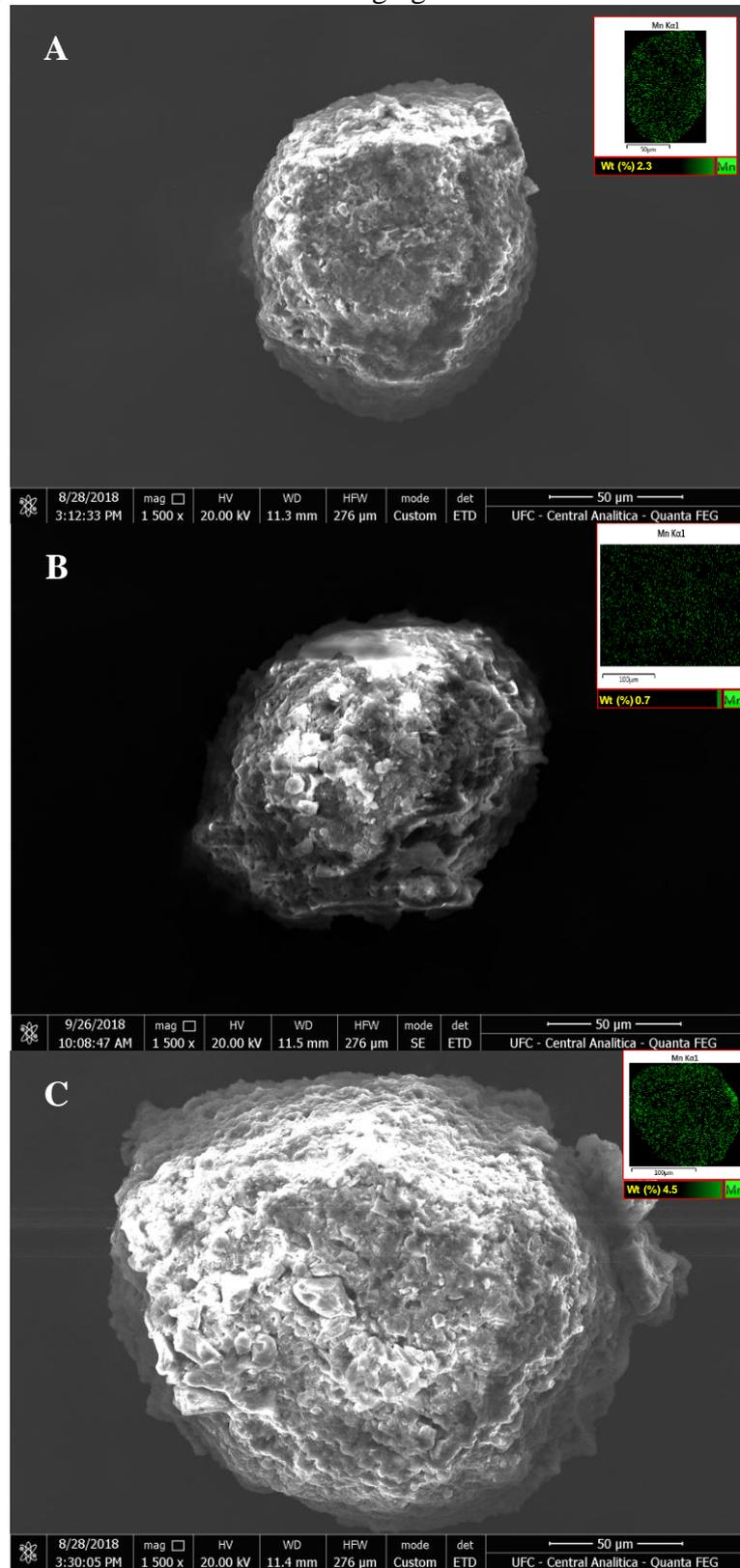
Novamente, nossos resultados evidenciam a afinidade dos esporos de FMA em acumular Mn em sua superfície. Assim como observado nos ensaios I e II, respectivamente, desta tese, verifica-se que há uma variabilidade no acúmulo de Mn na superfície dos esporos entre as espécies de FMA. Notou-se também que o FMA *Diversispora* sp. apresentou os maiores percentuais de Mn acumulado, o que pode estar relacionado a sua maior capacidade adaptativa a esse elemento, visto que foi isolado de uma área de mineração com elevada concentração de Mn.

Outros possíveis fatores têm sido relatados para explicar essas variações na afinidade aos metais pesados entre diferentes espécies de FMA. Smith e Read (1997) sugerem que diferenças na composição química da parede celular fúngica entre diferentes espécies de FMA podem levar a esse tipo de variação. Conforme esses autores, tem sido especulado também que outros componentes da parede celular, como os grupos carboxílicos, amino e hidroxílicos podem representar sítios de ligação com íons metálicos, influenciando o grau de afinidade aos metais pesados.

Em geral, como já mencionado anteriormente, os valores dos percentuais de Mn na superfície dos esporos de FMA observados no presente estudo são difíceis de serem interpretados, principalmente pela inexistência de outros resultados comparativos com o Mn utilizando essa mesma técnica. Contudo, vale ressaltar que os maiores percentuais de Mn observados na superfície dos esporos de FMA refletiram diretamente na atenuação dos sintomas de toxidez por Mn, maximizando o desenvolvimento das plantas de *A. mangium* quando cultivada em condições de excesso desse elemento.

Além da detecção de Mn na superfície dos esporos de FMA, a MEV permitiu a obtenção de imagens com maior nível de detalhes (Figura 35). Na imagem, pontos mais claros são tidos como de maior densidade eletrônica, onde são encontrados elementos mais densos como os metais.

Figura 35 – Micrografia eletrônica de varredura (MEV) e resultados da espectroscopia de por dispersão de energia (EDS) em esporos de FMA (A- *C. etunicatum*; B - *A. scrobiculata*; C – *Diversispora* sp.) extraídos de solo com 400 mg kg^{-1} de Mn e cultivado com *A. mangium*.



Fonte: o autor

5.3.6 Percentual foliar de toxidez (PFT)

De acordo com a análise de variância (Tabela 14), observa-se que todos os fatores isolados (A) e (B), bem como suas interações apresentaram efeito significativo para o PFT.

Tabela 14 – Resumo da análise de variância para o percentual foliar de toxidez (PFT) de *A. mangium* sob inoculação com FMA e doses de Mn.

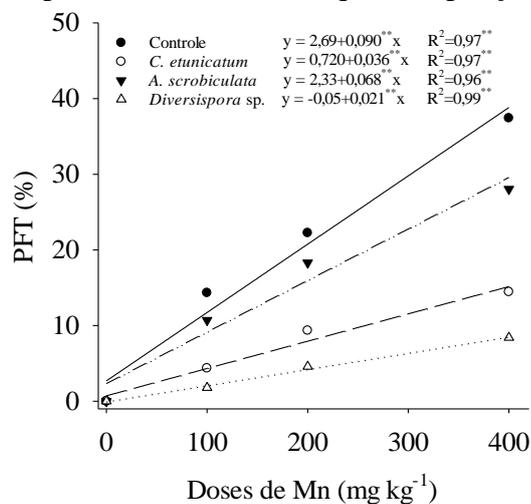
F. V.	G.L.	Quadrados Médios
		PFT
Doses de Mn (A)	3	1391,37**
FMA (B)	3	725,07**
Interação (AxB)	9	119,11**
Erro	48	16,5
Total	63	
C.V.%	-	37,36

** e * - Significativos a 1% ($p \leq 0,01$) e a 5% ($p \leq 0,05$) de significância, respectivamente, pelo teste F.

Fonte: o autor

O PFT das plantas aumentou em função das doses de Mn aplicadas no solo em todos os tratamentos, os quais ajustaram-se ao modelo de resposta linear crescente (Figura 36). No entanto, a inoculação com FMA foi capaz de reduzir significativamente o PFT, mesmo na máxima dose de Mn aplicada no solo. Na máxima dose de Mn, os tratamentos com *Diversispora* sp., seguido de *C. etunicatum* e *A. scrobiculata*, proporcionaram redução no PFT de 77,52%, 61,40% e 25,09%, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle (Figura 36).

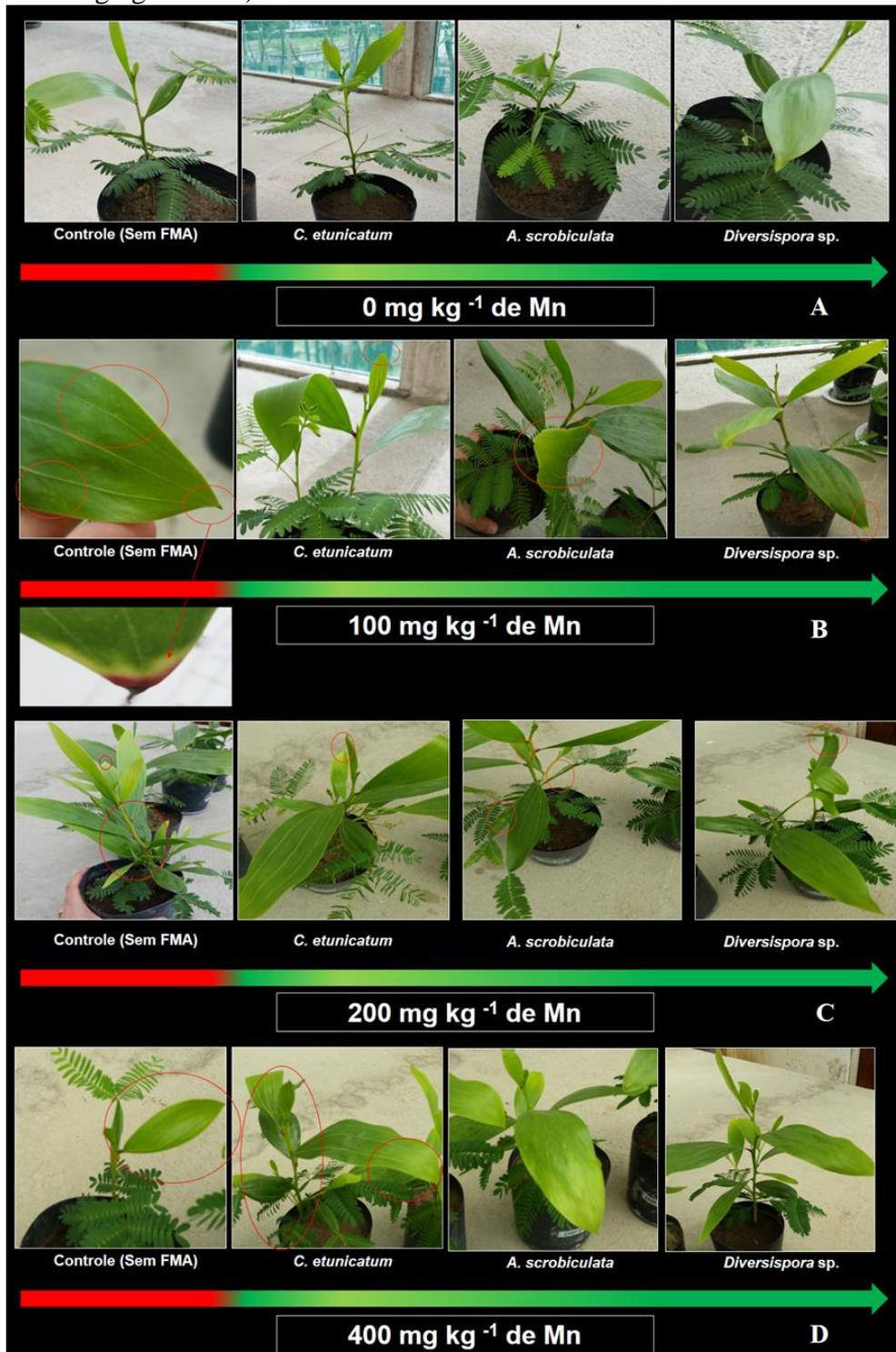
Figura 36 – PFT de *A. mangium* em função das doses de Mn e tratamentos de inoculação com FMA. Os valores da figura representam a média de quatro repetições.



Fonte: o autor

Aos 90 dias após o transplante, período final da condução experimental, não foram observados nenhum sintoma de toxidez foliar por Mn na ausência da aplicação desse elemento no solo (0 mg kg^{-1}) (Figura 37A).

Figura 37 – Aspecto dos sintomas de toxidez foliar por Mn em plantas de *A. mangium* aos 90 dias após o transplante (A – 0 mg kg^{-1} de Mn, B – 100 mg kg^{-1} de Mn, C – 300 mg kg^{-1} de Mn e D – 400 mg kg^{-1} de Mn).

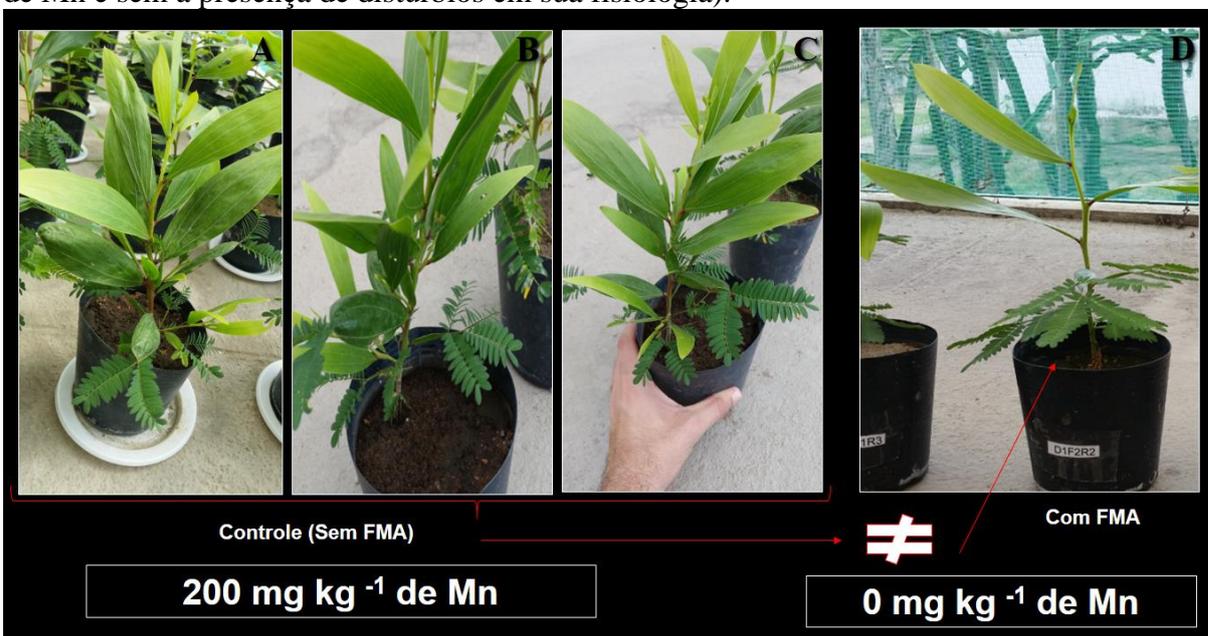


Fonte: o autor

A intensificação dos sintomas de toxidez foliar por Mn ocorreu com as doses crescentes desse elemento aplicadas no solo, principalmente, nas plantas não inoculadas com FMA (Figura 37B, 37C e 37D). Nas plantas colonizadas por FMA, a menor agressividade da toxidez foliar por Mn pode estar associada a eficácia da simbiose micorrízica e seu efeito na proteção do hospedeiro sob condições de excesso de Mn no solo. Comportamento semelhante foi observado também em plantas de *M. caesalpiniaefolia* e *L. leucocephala*, nos experimentos I e II, respectivamente, desta tese.

Nas plantas de *A. mangium* os principais sintomas de toxidez por Mn observados foram caracterizados por clorose internerval em algumas folhas e manchas marrons na parte final do limbo foliar (Figura 37B). Além disso, sob aplicação de doses crescente de Mn no solo, foi notável que as plantas de *A. mangium* apresentaram alguns distúrbios em sua fisiologia, caracterizado por má alternância foliar e, em alguns casos, por superbrotação (Figura 38A, 38B e 38C).

Figura 38 – Aspecto das plantas de *A. mangium* cultivadas na presença (200 mg kg^{-1}) e ausência (0 mg kg^{-1}) de Mn (A, B e C – plantas do tratamento controle apresentando distúrbios em sua fisiologia na presença de Mn e D - planta inoculada com FMA na ausência de Mn e sem a presença de distúrbios em sua fisiologia).

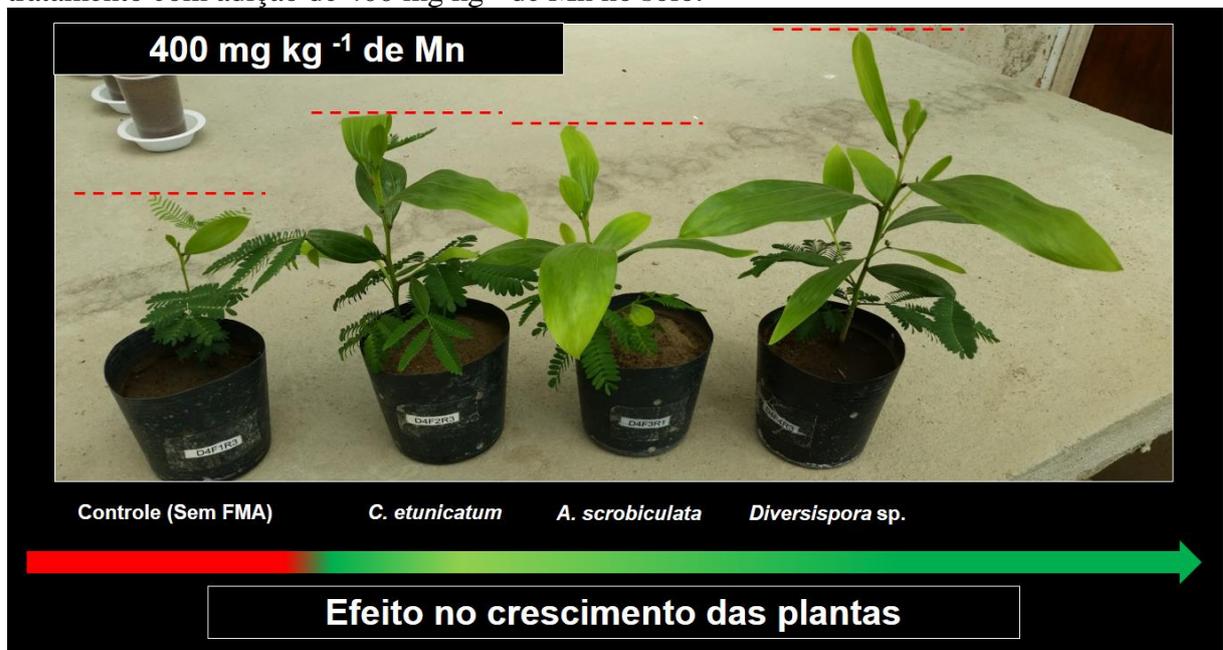


Fonte: o autor

Em geral, é importante ressaltar que as plantas de *A. mangium* apresentaram menor PFT quando comparado aos resultados observados para as plantas de *M. caesalpiniaefolia* e *L. leucocephala*, nos experimentos I e II, respectivamente, desta tese. É provável que nas plantas de *A. mangium* possa ter ocorrido maior diluição do Mn no tecido

vegetal em decorrência da maior produção de massa, principalmente nas plantas micorrizadas (Figura 39). Resultados semelhantes foram observados também por Andrade *et al.* (2003) em solo contaminado com chumbo e cultivado com plantas de soja.

Figura 39 – Efeito no crescimento das plantas de *A. mangium* sob inoculação com FMA no tratamento com adição de 400 mg kg^{-1} de Mn no solo.



Fonte: o autor

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o cultivo de três diferentes espécies leguminosas, inoculadas com FMA em solo sob doses crescentes de Mn nos permite as seguintes conclusões:

As concentrações excessivas de Mn no solo causam fitotoxidez e inibem o desenvolvimento das espécies leguminosas.

A inoculação com FMA atenua a toxidez induzida por Mn e maximiza o desenvolvimento das espécies leguminosas.

Os benefícios proporcionados pelos FMA dependem da planta hospedeira e da concentração de Mn no solo.

Os esporos dos FMA acumulam Mn em sua superfície, funcionando como uma barreira biológica para diminuir a fitotoxidez e aumentar a tolerância das espécies leguminosas ao Mn.

A eficiência desse mecanismo é dependente da espécie de FMA e da planta hospedeira.

Ao se considerar a tolerância das espécies leguminosas com base em sua biomassa e no percentual foliar de toxidez por Mn, as espécies *A. mangium* e *M. caesalpiniaefolia*, associadas ao FMA *Diversispora* sp. e *C. etunicatum*, respectivamente, apresentam maior tolerância a concentrações elevadas de Mn no solo, tornando-as, nesse estudo, as mais indicadas para futuras práticas de revegetação de áreas de mineração com excesso de Mn.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. *In*: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V.; V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v. 1. p. 299-352.
- ALMEIDA, R. O. P. O.; SÁNCHEZ, L. E. Revegetação de áreas de mineração: critérios de monitoramento e avaliação do desempenho. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, p.47-54, 2005.
- AMIR, H.; CAVALOC, Y.; LAURENT, A.; PAGAND, P.; GUNKEL, P.; LEMESTRE, M.; MÉDEVIELLE, V.; PAIN, A.; MCCOY, S. Arbuscular mycorrhizal fungi and sewage sludge enhance growth and adaptation of *Metrosideros laurifolia* on ultramafic soil in New Caledonia: A field experiment. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 651, p. 334-343, 2019.
- AMIR, H.; JOURAND, P.; CAVALOC, Y.; DUCOUSSO, M. Role of Mycorrhizal Fungi in the Alleviation of Heavy Metal Toxicity in Plants. **Soil Biology**, [s.l.], v. 41, p. 241-258, 2014.
- AMMRF (Australian). **Train for advanced research with MyScope™**. Disponível em: <http://www.ammrf.org.au/myscope>. Acesso em: 15 jan. 2016.
- AMNA; ALI, N.; MASOOD, S.; MUKHTAR, T.; KAMRAN, M. A.; RAFIQUE, M.; MUNIS, M. F. H.; CHAUDHARY, H. J. Differential effects of cadmium and chromium on growth, photosynthetic activity, and metal uptake of *Linum usitatissimum* in association with *Glomus intraradices*. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s.l.], v. 187, p. 1-11, 2015.
- ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria ambiental**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007. 176p.
- ANDRADE, S. A. L.; ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; SILVEIRA, A. P. D. Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 945-954, 2003.
- ANDRADE, S. A. L.; SILVEIRA, A. P. D.; MAZZAFERA, P. Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 408, p. 5381-5391, 2010.
- AQUINO, A. B.; AQUINO, B. F.; HERNANDEZ, F. F. F.; HOLANDA, F. J. M.; FREIRE, J. M.; CRISOSTOMO, L. A.; COSTA, R. I.; UCHÔA, S. C. P.; FERNANDES, V. L. B. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado do CE**. 1.ed. Fortaleza: UFC, 1993. 247p.
- ARAÚJO, A. S. F. de; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores Biológicos de Qualidade do Solo. **Bioscience Journal**, [s.l.], v. 23, p.66-75, 2007.
- ARAÚJO, I. C. S.; COSTA, M. C. G. Biomass and nutrient accumulation pattern of leguminous tree seedlings grown on mine tailings amended with organic waste. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 60, p.254-260, 2013.

BALDISSEROTTO, C.; FERRONI, L.; ANFUSO, E.; PAGNONI, A.; FASULO, M. P. Responses of *Trapa natans* L. floating laminae to high concentrations of manganese. **Protoplasma**, [s.l.], v. 231, p.65-82, 2007.

BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; STENZEL, N. M. C. Resposta da acerola à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em solo com diferentes níveis de fósforo. **Bragantia**, Campinas, v. 70, p. 166–175, 2011.

BATTY, L. C. The Potential Importance of Mine Sites for Biodiversity. **Mine Water and The Environment**, [s.l.], v. 24, p.101-103, 2005.

BAUM, C.; EL-TOHAMY, W.; GRUDA, N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 187, p.131-141, 2015.

BERTOLAZI, A. A.; CANTON, G. C.; AZEVEDO, I. G.; CRUZ, Z. M.; SOARES, D. N.; CONCEIÇÃO, J. M.; SANTOS, W. O.; RAMOS, A. C. O papel das ectomicorrizas na biorremediação dos metais pesados no solo. **Natureza On Line**, [s.l.], v. 8, p.24-31, 2010.

BIRÓ, B.; FÜZY, A.; POSTA, K. Long-term effect of heavy metal loads on the mycorrhizal colonization and metal uptake of barley. **Agrokémia és Talajtan**, [s.l.], v. 59, p. 175–184, 2010.

BRIGIDA, M. B. S. **Uso de composto orgânico e espécies vegetais para condicionamento de rejeito de beneficiamento de minério de ferro**. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas), Solos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

BRITO, I.; CARVALHO, M.; ALHO, L.; GOSS, M. J. Managing arbuscular mycorrhizal fungi for bioprotection: Mn toxicity. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 68, p. 78–84, 2014.

CABRAL, L. do N.; PEREIRA, S. S.; ALVES, T. L. B. Degradação ambiental e implicações para a saúde humana decorrentes da mineração: o caso dos trabalhadores de uma pedreira no município de Campina Grande/PB. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, Uberlândia, v. 8, p.104-118, 2012.

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

CABRAL, L.; SOARES, C. R. F. S.; GIACHINI, A. J.; SIQUEIRA, J. O. Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 31, p. 1655–1664, 2015.

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

CARRASCO, L.; AZCÓN, R.; KOHLER, J.; ROLDÁN, A.; CARAVACA, F. Comparative

effects of native filamentous and arbuscular mycorrhizal fungi in the establishment of an autochthonous, leguminous shrub growing in a metal-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 409, p. 1205–1209, 2011.

CHANG, Q.; DIAO, F. W.; WANG, Q. F.; PAN, L.; DANG, Z. H.; GUO, W. Effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on growth, nutrient and metal uptake by maize seedlings (*Zea mays* L.) grown in soils spiked with Lanthanum and Cadmium. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 241, p. 607–615, 2018.

CHEN, A.; GU, M.; WANG, S.; CHEN, J.; XU, G. Transport properties and regulatory roles of nitrogen in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s.l.], v. 74, p. 80–88, 2018.

CHEN, B. D.; ZHU, Y.; DUAN, J.; XIAO, X. Y.; SMITH, S. E. Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 147, p.374-380, 2007.

CHEN, Z.; YAN, W.; SUN, L.; TIAN, J.; LIAO, H. Proteomic analysis reveals growth inhibition of soybean roots by manganese toxicity is associated with alteration of cell wall structure and lignification. **Journal of Proteomics**, [s.l.], v. 143, p. 151–160, 2016.

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

CIPRIANI, H. N., DIAS, L. E.; COSTA, M. D.; CAMPOS, N. V.; AZEVEDO, A. A.; GOMES, R. J.; FIALHO, I. F.; AMEZQUITA, S. P. M. Arsenic toxicity in *Acacia mangium* Willd. and *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. seedlings. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 1423-1430, 2013.

COLODETE, C. M.; DOBBSS, L. B.; RAMOS, A. C. Aplicação das micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas. **Natureza on line**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.31-37, 2014.

CONESA, H. M.; GARCÍA, G.; FAZ, Á.; ARNALDOS, R. Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. **Chemosphere**, [s.l.], v. 68, p. 1180–1185, 2007.

CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; VALDERAS, A.; BORIE, F.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 57, p. 925–928, 2013.

CUI, G.; AI, S.; CHEN, K.; WANG, X. Arbuscular mycorrhiza augments cadmium tolerance in soybean by altering accumulation and partitioning of nutrient elements, and related gene expression. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 171, p. 231–239, 2019.

DEDAVID, B. A. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras – materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. 1. ed., Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DEL VAL, C.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 718–723, 1999.

ELHINDI, K. M.; AL-MANA, F. A.; EL-HENDAWY, S.; AL-SELWEY, W. A.; ELGORBAN, A. M. Arbuscular mycorrhizal fungi mitigates heavy metal toxicity adverse effects in sewage water contaminated soil on *Tagetes erecta* L. **Soil Science and Plant Nutrition**, [s.l.], v. 64, p. 662–668, 2018.

EMBRAPA. **Recuperação de Áreas Degradadas**. 2008. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=229&func=unid>. Acesso em: 18 abr. 2018.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3ª ed. Brasília, DF: EMBRAPA, 2013. 353p.

FARIA, S. M.; CHADA, S. S. **Interação microrganismos e plantas na recuperação de áreas degradadas**. Disponível em: www.rc.unesp.br/xivsbps/mesa03MSMF.pdf. Acesso em: 01 jun. 2016.

FERNANDO, D. R.; LYNCH, J. P. Manganese phytotoxicity: New light on an old problem. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 116, p. 313–319, 2015.

FERREIRA, D. F. **Análise estatística por meio do SISVAR** (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar, p. 255- 258, 2000.

FERROL, N.; TAMAYO, E.; VARGAS, P. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 67, p. 6253–6565, 2016.

FOY, C. D. **Physiological effects of hydrogen, aluminium, and manganese toxicities in acid soils**. In: ADAMS, F. (ed) Soil Acidity and Liming. (1984). p 57-97. American Society of Agronomy, Madison.

GARCIA, K. G. V. **Desenvolvimento de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. colonizada com micorrizas arbusculares em solos degradados por mineração de Mn**. 2015. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2015.

GARCIA, K. G. V.; GOMES, V. F. F.; FILHO, P. F. M.; MARTINS, C. M.; SILVA JÚNIOR, J. M. T. da; CUNHA, C. S. M.; PINHEIRO, J. I. Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Phytostabilization of Soil Degraded by Manganese Mining. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 10, p. 192-202, 2018.

GARCIA, K. G. V.; GOMES, V. F. F.; MENDES FILHO, P. F.; MARTINS, C. M.; ALMEIDA, A. M. M.; SILVA JUNIOR, J. M. T. Tolerância de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. associada a micorrizas arbusculares em substrato da mineração de manganês. **Revista de Ciências Agrárias (BELÉM)**, [s.l.], v. 60, p. 247-255, 2017.

GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **Current Science**, [s.l.], v. 86, p. 528-534, 2004.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizae *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactive British Mycology Society**, [s.l.], v. 388, p. 235-244, 1963.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMOINE, M. C.; ARNOULD, C.; GOLLOTTE, A.; MORTON, B. Localization of β (1 \rightarrow 3) Glucans in Spore and Hyphal Walls of Fungi in the Glomales. **Mycologia**, [s.l.], v. 86, p.478-485, 1994.

GOMES, M. P.; ANDRADE, M. L.; NASCENTES, C. C.; SCOTTI, M. R. Arsenic Root Sequestration by a Tropical Woody Legume as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Organic Matter: Implications for Land Reclamation. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s.l.], v. 225, p.1-12, 2014.

GOMIDE, P. H. O.; SANTOS, J. G. D. dos; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Diversidade e função de fungos micorrízicos arbusculares em sucessão de espécies hospedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 1483–1490, 2009.

GONZALEZ-CHAVEZ, C.; D'HAEN, J.; VANGRONVELD, J.; DODD, J. C. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 240, p. 287-297, 2002.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; MELVILLE, L. H.; FERROL, N.; LOTT, J. N. A.; AZCÓN-AGUILAR, N.; PETERSON, R. LARRY. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Canadian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.103-110, 2008.

GUNATHILAKAE, N.; YAPA, N.; HETTIARACHCHI, R. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the cadmium phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Groundwater for Sustainable Development**, [s.l.], v. 7, p. 477–482, 2018.

HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; AL HUQAIL, A. A.; EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S. Alleviation of cadmium stress in *Solanum lycopersicum* L. by arbuscular mycorrhizal fungi via induction of acquired systemic tolerance. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 23, p. 272–281, 2016.

HAUCK, M.; PAUL, A.; GROSS, S.; RAUBUCH, M. Manganese toxicity in epiphytic lichens: Chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 49, p. 181–191, 2003.

HELGASON, T.; FITTER, A. H. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 60, p. 2465–2480, 2009.

HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 68, p.139-146, 2007.

HRISTOZKOVA, M.; STANCHEVA, I.; GENEVA, M.; BOYCHINOVA, M. Comparison of several arbuscular mycorrhizal fungi and sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) symbiotic associations in heavy metal polluted soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 23, p. 436–442, 2017.

HU, J.; WANG, H.; WU, F.; WU, S.; CAO, Z.; LIN, X.; WONG, M. H. Arbuscular mycorrhizal fungi influence the accumulation and partitioning of Cd and P in bashfulgrass (*Mimosa pudica* L.) grown on a moderately Cd-contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 73, p. 51–57, 2014.

HUANG, J.; NARA, K.; ZONG, K.; WANG, J.; XUE, S.; PENG, K.; SHEN, Z.; LIAN, C. Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (*Pinus massoniana*) and white oak (*Quercus fabri*) in a manganese mining region in Hunan Province, China. **Fungal Ecology**, [s.l.], v. 9, p. 1–10, 2014.

HUANG, X.; HO, S. H.; ZHU, S.; MA, F.; WU, J.; YANG, J.; WANG, L. Adaptive response of arbuscular mycorrhizal symbiosis to accumulation of elements and translocation in *Phragmites australis* affected by cadmium stress. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 197, p. 448–455, 2017.

IBAMA. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília, 1990. 96p.

IBRAM. **Informações e Análises a Economia Mineral Brasileira**. 7ed., 2012. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00003797.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2019.

ILUNGA, E.; MAHY, G.; PIQUERAY, J.; SÉLECK, M.; NGOY, M.; MEERTS, P.; FAUCON, M. Plant functional traits as a promising tool for the ecological restoration of degraded tropical metal-rich habitats and revegetation of metal-rich bare soils: A case study in copper vegetation of Katanga, DRC. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 82, p. 214–221, 2015.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; REYES-DÍAZ, M.; BERRÍOS, G.; RODRIGUES-SALVADOR, A.; NUNES-NESE, A.; DEPPE, M.; DEMANET, R.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M. Physiological and biochemical responses to manganese toxicity in ryegrass (*Lolium perenne* L.) genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 113, p. 89-97, 2017.

JUÁREZ-SANTILLÁN, L. F.; LUCHO-CONSTANTINO, C. A.; VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, G. A.; CERÓN-UBILLA, N. M.; BELTRÁN-HERNÁNDEZ, R. I. Bioresource Technology Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, p. 5836-5841, 2010.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413 p.

KANWAL, S.; BANO, A.; MALIK, R. N. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metals and effects on growth and biochemical activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants in Zn contaminated soils. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 15, p. 872–883, 2016.

KAPUSTA, P.; SOBCZYK, Ł. Effects of heavy metal pollution from mining and smelting on

enchytraeid communities under different land management and soil conditions. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 536, p.517-526, 2015.

KHADE, S. W.; ADHOLEYA, A. Arbuscular mycorrhizal association in plants growing on metal-contaminated and noncontaminated soils adjoining Kanpur tanneries, Uttar Pradesh, India. **Water, Air, and Soil Pollution**, [s.l.], v. 202, p. 45–56, 2009.

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

KÖHL, L.; HEIJDEN, M. G. A. van der H. Arbuscular mycorrhizal fungal species differ in their effect on nutrient leaching. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 94, p.191-199, 2016.

KOSKE R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, [s.l.], v. 92, p. 486-505, 1989.

KOTHARI, S. K.; MARSCHNER, H.; ROMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, [s.l.], v. 117, p.649-655, 1991.

KUMAR, K. S.; DAYANANDA, S.; SUBRAMANYAM, C. Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 242, p. 45-50, 2005.

LEMPP, B. Avanços metodológicos da microscopia na avaliação de alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p.316-329, 2007.

LENOIR, I.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, A. Lounès-hadj. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 123, p. 4-15, 2016.

LERMEN, C.; BOGONI, F.; MOHR, M.; ALBERTON, O. Growth of *Cymbopogon citratus* inoculated with mycorrhizal fungi under different levels of lead. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 186, p. 239–246, 2015.

LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 139-153, 1997.

LI, J.; SUN, Y.; JIANG, X.; CHEN, B.; ZHANG, X. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate arsenic toxicity to *Medicago sativa* by influencing arsenic speciation and partitioning. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 157, p. 235–243, 2018.

LI, M. S. Ecological restoration of mineland with particular reference to the metalliferous mine wasteland in China: A review of research and practice. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 357, p.38-53, 2006.

LI, M. S.; LUO, Y. P.; SU, Z. Y. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation

- in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 147, p.168-175, 2007.
- LIN, A.-J.; ZHANG, X.-H.; WONG, M.-H.; YE, Z.-H.; LOU, L.-Q.; WANG, Y.-S.; ZHU, Y.-G. Increase of multi-metal tolerance of three leguminous plants by arbuscular mycorrhizal fungi colonization. **Environmental Geochemistry and Health**, [s.l.], v. 29, p.473-481, 2007.
- LINS, C. E. L., MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. S. B. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, [s.l.], v. 31, p. 355-363, 2007.
- LIU, H.; YUAN, M.; TAN, S.; YANG, X.; LAN, Z.; JIANG, Q.; YE, Z.; JING, Y. Enhancement of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus versiforme*) on the growth and Cd uptake by Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum*. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 89, p. 44-49, 2015.
- LIU, L.; GONG, Z.; ZHANG, Y.; LI, P. Growth, cadmium uptake and accumulation of maize (*Zea mays* L.) under the effects of arbuscular mycorrhizal fungi. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 23, p. 1979–1986, 2014.
- LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. Í.; MELO, W. J. de. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. **Bragantia**, Campinas, v. 70, p.132-138, 2011.
- LOPES LEAL, P.; VARÓN-LÓPEZ, M.; GONÇALVES DE OLIVEIRA PRADO, I.; VALENTIM DOS SANTOS, J.; FONSÊCA SOUSA SOARES, C. R.; SIQUEIRA, J. O.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. Enrichment of arbuscular mycorrhizal fungi in a contaminated soil after rehabilitation. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 47, p. 853–862, 2016.
- LYNCH, J.; MARSCHNER, P.; RENGEL, Z. **Effects of internal and external factors on root growth and development**. In ‘**Mineral nutrition of higher plants**’. (Eds P Marschner), 2012. p. 331– 346. (Academic Press: London).
- MA, X.; LUO, W.; LI, J.; WU, F. Arbuscular mycorrhizal fungi increase both concentrations and bioavailability of Zn in wheat (*Triticum aestivum* L) grain on Zn-spiked soils. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 135, p. 91–97, 2019.
- MACFIE, S. M.; TAYLOR, G. J. The effects of excess manganese on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 85, p. 467-475, 1992.
- MADEJÓN, P.; MURILLO, J. M.; MARANON, T.; CABRERA, F.; SORIANO, M. A. Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcollar mine spill. **The Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 307, p. 239–257, 2003.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319 p.
- MARQUES, T. C. L. L. de S. e M.; MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e

teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p.121-132, 2000.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. 889p.

MCGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H.; EVANS, D. G.; FAIRCHILD, G. L.; SWAN, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, [s.l.], v. 115, p. 495-501, 1990.

MENDES FILHO, P. F. **Potencial de reabilitação do solo de uma área degradada, através da revegetação e do manejo microbiano**. 2004. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Solos e Nutrição de Plantas), Solos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MENDES FILHO, P. F.; VASCONCELLOS, R. L. F.; PAULA, A. M. de; CARDOSO, E. J. B. N. Evaluating the Potential of Forest Species Under “Microbial Management” for the Restoration of Degraded Mining Areas. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s.l.], v. 208, p.79-89, 2009.

MENEZES, L. A. S.; LEANDRO, W. M. Avaliação de espécies de coberturas do solo com potencial de uso em sistema de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v. 3, p.173-180, 2004.

MERLOS, M. A.; ZITKA, O.; VOJTECH, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differentially regulates the copper response of two maize cultivars differing in copper tolerance. **Plant Science**, [s.l.], v. 253, p. 68–76, 2016.

MILLALEO, R.; REYES-DÍAZ, M.; IVANOV, A. G.; MORA, M. L.; ALBERDI, M. Manganese as Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance Mechanisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [s.l.], v. 10, p. 476-494, 2010.

MIRANSARI, M. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, p.645-653, 2011.

MNASRI, M.; JANOUŠKOVÁ, M.; RYDLOVÁ, J.; ABDELLY, C.; GHNAYA, T. Comparison of arbuscular mycorrhizal fungal effects on the heavy metal uptake of a host and a non-host plant species in contact with extraradical mycelial network. **Chemosphere**, [s.l.], v. 171, p. 476–484, 2017.

MORAIS, G. P. **Comportamento de híbridos de milho adubados com nitrogênio e inoculados com diazotróficos associativos**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, 2. ed., Lavras: Editora UFLA, 2006. 729.

MORONI, J. S.; SCOTT, B. J.; WRATTEN, N. Differential tolerance of high manganese

among rapeseed genotypes. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 253, p.507-519, 2003.

MUNIZ, D. H. de F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, [s.l.], v. 4, p.83-100, 2006.

NASCIMENTO, J. T.; SILVA, I. D. F.; SANTIAGO, R. D.; F, L. de; NETO, S. Efeito de leguminosas nas características químicas e matéria orgânica de um solo degradado. **Revista Brasileira de Engenharia Química e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, p. 457-462, 2003.

NOGUEIRA, M. A. **Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja**. 2001. 195p. Tese (Doutorado em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 1605-1612, 2002.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type and endophyte. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 329–335, 2003.

NOGUEIRA, M. A.; NEHLS, U.; HAMPP, R.; PORALLA, K.; CARDOSO, E. J. B. N. Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 298, n. 1–2, p. 273–284, 2007.

OLSSON, P. A.; HAMMER, E. C.; PALLON, J.; VAN AARLE, I. M.; WALLANDER, H. Elemental composition in vesicles of an arbuscular mycorrhizal fungus, as revealed by PIXE analysis. **Fungal Biology**, [s.l.], v. 115, p. 643–648, 2011.

ORLOWSKA, E.; PRZYBYLOWICZ, W.; ORLOWSKI, D.; MONGWAKETSI, N. P.; TURNAU, K.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J. Mycorrhizal colonization affects the elemental distribution in roots of Ni-hyperaccumulator *Berkheya coddii* Roessler. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 175, p. 100–109, 2013.

PAN, G.; LIU, W.; ZHANG, H.; LIU, P. Morphophysiological responses and tolerance mechanisms of *Xanthium strumarium* to manganese stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 165, p. 654–661, 2018.

PANDE, M.; TARAFDAR, J. C. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in neem-based agroforestry systems in Rajasthan. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 26, p. 233–241, 2004.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 6, p. 763-775, 2008.

PEREIRA, L. S.; DE ARAÚJO, R. P.; DE OLIVEIRA, P. S.; DA SILVA, L. D.; ALVES, P. A. C.; FERNANDES, V. F.; GROSS, E. Cadmium induced changes in *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) grown on organically fertilized soil with reference to mycorrhizae, metabolism, anatomy and ultrastructure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 150, p. 76–

85, 2018.

RABIE, G. H. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 4, p. 332–345, 2005.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. H.; FURLANI, A.M.C. **Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas, Instituto Agrônomo de Campinas & Fundação IAC, 1996. 285p. (Boletim Técnico, 100).

RAMOS, A. C.; FAÇANHA, A. R.; PALMA, L. M.; OKOROKOV, L. A.; ZILMA, M. A.; SILVA, A. G.; SIQUEIRA, A. F.; BERTOLAZI, A. A.; CANTON, G. C.; SANTOS, W. O.; SCHIMITBERGER, V. M. B.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 23, p.79-89, 2011.

RIVERA-BECERRIL, F.; JUÁREZ-VÁZQUEZ, L. V.; HERNÁNDEZ-CERVANTES, S. C.; ACEVEDO-SANDOVAL, O. A.; VELA-CORREA, G.; CRUZ-CHÁVEZ, E.; MORENO-ESPÍNDOLA, I. P.; ESQUIVEL-HERRERA, A.; DE LEÓN-GONZÁLEZ, F. Impacts of manganese mining activity on the environment: Interactions among soil, plants, and arbuscular mycorrhiza. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [s.l.], v. 64, p. 219-227, 2013.

RODRIGUES, L. A.; BARROSO, D. G.; FIQUEIREDO, F. A. M. M. de A. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* L. F. **Ciência Florestal**, [s.l.], v. 28, p. 25–34, 2018.

ROJAS-LILLO, Y.; ALBERDI, M.; ACEVEDO, P.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; RENGEL, Z.; MORA, M. de la L.; REYES-DÍAZ, M. Manganese toxicity and UV-B radiation differentially influence the physiology and biochemistry of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars. **Functional Plant Biology**, [s.l.], v. 41, p. 156-167, 2013.

ROMÁN- DAÑOBEYTIA, F.; HUAYLLANI, M.; MICHI, A.; IBARRA, F. Reforestation with four native tree species after abandoned gold mining in the Peruvian Amazon. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 85, p. 39-46, 2015.

SABADIN, H. C. Adubação verde. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.37, p.19-26, 1984.

SADIA, K.; ASMA, B.; RIFFAT, N. M. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metals and effects on growth and biochemical activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants in Zn contaminated soils. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 15, p. 872–883, 2016.

SALAZAR, M. J.; MENOYO, E.; FAGGIOLI, V.; GEML, J.; CABELLO, M.; RODRIGUEZ, J. H.; MARRO, N.; PARDO, A.; PIGNATA, M. L.; BECERRA, A. G. Pb accumulation in spores of arbuscular mycorrhizal fungi. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 643, p. 238–246, 2018.

SÁNCHEZ-CASTRO, I.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; CLEYET-MAREL, J. C.; BAUDOIN, E.; VAN TUINEN, D. Glomeromycota communities survive extreme levels of

metal toxicity in an orphan mining site. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 598, p. 121–128, 2017.

SANTOS, E. F.; KONDO SANTINI, J. M.; PAIXÃO, A. P.; FURLANI JÚNIOR, E.; LAVRES, J.; CAMPOS, M.; REIS, A. R. dos. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 113, p. 6–19, 2017.

SCHEUBLIN, T. R.; RIDGWAY, K. P.; YOUNG, J. P. W.; HEIJDEN, M. G. A. van der. Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v.70, p.6240-6246, 2004.

SCHMIDT, F.; FORTES, M. de A.; WESZ, J.; BUSS, G. L.; SOUSA, R. O. de. Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p.1226-1235, 2013.

SCHNEIDER, J.; BUNDSCHUH, J.; DO NASCIMENTO, C. W. A. Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 572, p. 86-97, 2016.

SCHNEIDER, J.; BUNDSCHUH, J.; RANGEL, W. de M.; GUILHERME, L. R. G. Potential of different AM fungi (native from As-contaminated and uncontaminated soils) for supporting *Leucaena leucocephala* growth in As-contaminated soil. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 224, p. 125-135, 2017.

SCHNEIDER, J.; STÜRMER, S. L.; GUILHERME, L. R. G.; DE SOUZA MOREIRA, F. M.; SOARES, C. R. F. D. S. Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 262, p. 1105-1115, 2013.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ed. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

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

SMITH, S. E.; JAKOBSEN, I.; GRØNLUND, M.; SMITH, F. A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. **Plant Physiology**, [s.l.], v 156, p. 1050–1057, 2011.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**, 2nd ed., Academic Press: London, 1997. 605 p.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3. ed., New York: Academic Press, 2008. 800 p.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. de A.; MARQUES, T. C. L. L. de S. e M.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Acúmulo de metais pesados nas raízes, caule e folhas

de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 13, p. 302-315, 2001.

SOLÍS-DOMÍNGUEZ, F. A.; VALENTÍN-VARGAS, A.; CHOROVER, J.; MAIER, R. M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure of mesquite grown in acidic lead / zinc mine tailings. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 409, p.1009-1016, 2011.

SOUZA, L. H.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; DE ALBUQUERQUE VILLANI, E. M. Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 1641–1652, 2010.

SPAGNOLETTI, F.; CARMONA, M.; TOBAR, N. E.; CHIOCCHIO, V.; LAVADO, R. S. Arbuscular mycorrhiza reduces the negative effects of *M. phaseolina* on soybean plants in arsenic-contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 121, p. 41–47, 2017.

SUDOVÁ, R.; VOSÁTKA, M. Differences in the effects of three arbuscular mycorrhizal fungal strains on P and Pb accumulation by maize plants. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 296, p.77-83, 2007.

SUN, K.; WANG, H.; XIA, Z. The maize bHLH transcription factor bHLH105 confers manganese tolerance in transgenic tobacco. **Plant Science**, [s.l.], v. 280, p. 97-109, 2019.

SUN, Y.; ZHANG, X.; WU, Z.; HU, Y.; WU, S.; CHEN, B. The molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the arsenic mining impacted sites in Hunan Province of China. **Journal of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 39, p.110-118, 2016.

TOKTAR, M.; LO PAPA, G.; KOZYBAYEVA, F. E.; DAZZI, C. Ecological restoration in contaminated soils of Kokdzhon phosphate mining area (Zhambyl region, Kazakhstan). **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 86, p.1-4, 2016.

VASCONCELLOS, M. C.; PAGLIUSO, D.; SOTOMAIOR, V. S. Fitorremediação: Uma proposta de descontaminação do solo. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, [s.l.], v. 34, p.261-267, 2012.

VODNIK, D.; GR, H.; MA, I.; ELTEREN, J. T. Van; KOVA, M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 392, p.130-136, 2008.

WANG, F. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applications. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s.l.], v. 47, p. 1901-1957, 2017.

WANG, F.; LIU, X.; SHI, Z.; TONG, R.; ADAMS, C. A. Chemosphere Arbuscular mycorrhizae alleviate negative effects of zinc oxide nanoparticle and zinc accumulation in maize plants - A soil microcosm experiment. **Chemosphere**, [s.l.], v. 147, p. 88-97, 2016.

WANG, R.; WANG, J.; ZHAO, L.; YANG, S.; SONG, Y. Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of *Arabidopsis seedlings*. **BioMetals**, [s.l.], v. 28, p. 123-132,

2015.

WANG, X.; LIU, Y.; ZENG, G.; CHAI, L.; XIAO, X.; SONG, X.; MIN, Z. Chemosphere Pedological characteristics of Mn mine tailings and metal accumulation by native plants. **Chemosphere**, [s.l.], v. 72, p.1260-1266, 2008.

WEIERSBYE, I. M.; STRAKER, C. J.; PRZYBYLOWICZ, W. j. Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass, *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. **Nuclear Instruments and Methods In Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, [s.l.], v. 158, p.335-343, 1999.

WU, S.; ZHANG, X.; CHEN, B.; WU, Z.; LI, T.; HU, Y.; SUN, Y.; WANG, Y. Chromium immobilization by extraradical mycelium of arbuscular mycorrhiza contributes to plant chromium tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 122, p. 10-18, 2016.

XIA, Y. S.; CHEN, B. D; CHRISTIE, P.; SMITH F, A.; WANG, Y. S.; LI, X. L. Arsenic uptake by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in an arsenic-contaminated soil with added phosphorus. **Journal of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 19, p. 1245-1251, 2007.

XU, J.; GARCIA, A.; LAGERKVIST, A.; BERTILSSON, S.; SJÖBLÖM, R.; KUMPIENE, J. Sources and remediation techniques for mercury contaminated soil. **Environment International**, [s.l.], v. 74, p. 42-53, 2015.

YANG, Q.; ZENG, Q.; XIAO, F.; LIU, X.; PAN, J.; HE, J.; LI, Z. Investigation of manganese tolerance and accumulation of two Mn hyperaccumulators *Phytolacca americana* L. and *Polygonum hydropiper* L. in the real Mn-contaminated soils near a manganese mine. **Environmental Earth Sciences**, [s.l.], v. 68, p. 1127–1134, 2013.

YANG, Y.; LIANG, Y.; HAN, X.; CHIU, T. Y.; GHOSH, A.; CHEN, H.; TANG, M. The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, p. 1-14, 2016.

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

ZAREI, M.; KÖNIG, S.; HEMPEL, S.; NEKOU EI, M. K.; SAVAGHEBI, G.; BUSCOT, F. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 156, p. 1277–1283, 2008.

ZHANG, Y.; HU, J.; BAI, J.; WANG, J.; YIN, R.; WANG, J.; LIN, X. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate the heavy metal toxicity on sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants cultivated on a heavily contaminated field soil at a WEEE-recycling site. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 628-629, p. 282-290, 2018.

ZHOU, X.; FU, L.; XIA, Y.; ZHENG, L.; CHEN, C.; SHEN, Z.; CHEN, Y. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance the copper tolerance of *Tagetes patula* through the sorption and

barrier mechanisms of intraradical hyphae. **Metallomics**, [s.l.], v. 9, p. 936–948, 2017.