

EFEITO DO MATERIAL SÓLIDO PARTICULADO DE FERRO SOB O
CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E ECOFISIOLOGIA DE PLANTAS DE
AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* RADDI) INOCULADAS COM
ECTOMICORRIZAS

BIANCA DO CARMO SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

EFEITO DO MATERIAL SÓLIDO PARTICULADO DE FERRO SOB O
CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E ECOFISIOLOGIA DE PLANTAS DE
AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* RADDI) INOCULADAS COM
ECTOMICORRIZAS

BIANCA DO CARMO SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586 Silva, Bianca do Carmo.

Efeito do material sólido particulado de ferro sob o crescimento, nutrição e ecofisiologia de plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) inoculadas com ectomicorrizas / Bianca do Carmo Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

86 f.

Bibliografia: 55 - 73.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

1. Biorremediação. 2. *Pisolithus*. 3. Metal pesado. 4. Estresse oxidativo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

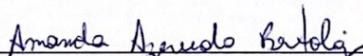
EFEITO DO MATERIAL SÓLIDO PARTICULADO DE FERRO SOB O
CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E ECOFISIOLOGIA DE PLANTAS DE
AROEIRA (*Schinus terebinthifolius* RADDI) INOCULADAS COM
ECTOMICORRIZAS

BIANCA DO CARMO SILVA

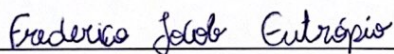
Dissertação apresentada ao Centro
de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020

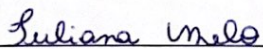
Comissão Examinadora



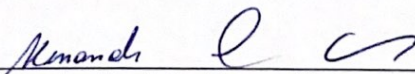
Dr^a. Amanda Azevedo Bertolazi (D.Sc., Produção Vegetal) – UVV



Prof. Dr. Frederico Jacob Eutrópio (D.Sc., Ecologia de Ecossistemas) – MULTIVIX



Prof^a. Dr^a. Juliana Melo da Conceição (D.Sc., Ecologia de Ecossistemas) –
Universidade de Lisboa



Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Orientador)

À Deus pela oportunidade. Aos meus pais José Dias e Maria Lúcia do Carmo. Aos meus avós Dominga Reis e Osvaldo do Carmo. Aos meus sobrinhos. Com todo amor, respeito, admiração e gratidão, DEDICO.

Recomeça...
Se puderes
Sem angústia
E sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses.
De nenhum fruto queiras só metade...
(Miguel Torga)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir esta conquista, pelo seu infinito amor e por colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

Aos meus pais pelo amor e por sempre me apoiarem e incentivarem a estudar. Meu sincero agradecimento à minha mãe pela confiança e pelo carinho. Ao meu Pai que confia e acredita em mim, e que dia a dia me ensina sobre responsabilidades.

À minha irmã Gaby por me ajudar no início desta jornada, sem sua contribuição seria difícil chegar onde cheguei.

À minha prima e irmã Larissa do Carmo, pessoa que me entende e que confio integralmente. Obrigada por todas as conversas via *Skype*, por sempre ser tão positiva e por entender até mesmo as minhas expressões e meias palavras.

Um agradecimento especial aos meus sobrinhos (Enny, Alice, Lucas e Sofia) que são uma inspiração para eu continuar seguindo este caminho.

Gostaria de deixar aqui registrado, o meu reconhecimento e agradecimento aos demais familiares que não mediram esforços para me ajudar nesta conquista, em especial, meus irmãos Gabriel e Jadson, meus avós (Osvaldo e Domingas) e minhas tias (Zilda, Rosa, Conceição e Edna).

À Universidade Estadual do Norte Fluminense e ao CNPq pelo suporte e comprometimento durante estes dois anos.

Agradeço ao meu orientador, professor Alessandro Coutinho Ramos, por todo o conhecimento transmitido, a cerca de Ecofisiologia vegetal e microbiana, principalmente sobre micorrizas.

Ao Sávio Bastos, pessoa que merece o melhor que este mundo pode oferecer. Obrigado de coração por tudo. Obrigada por ser paciente e por me guiar.

Ao professor João Almeida, pelos seus ensinamentos e apoio, sou grata.

Aos membros da banca, Amanda Bertolazi e Frederico Eutrópio, pela participação neste momento tão importante.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem conhecimento, não apenas racional, mas também a manifestação do caráter, afetividade e da educação no processo de formação profissional.

Aos colegas que a UENF me permitiu conhecer, em especial: Lua (Luana Pereira), Kissíla Soares, Bellinha (Isabelle Faria), Lídia Pereira, Jussa (Jussara Silva) e Júnior (Otalício), conviver com vocês foi um presente.

Às minhas queridas amigas e companheiras de fé, Isa (Isamara Reis Gomes) e Carol (Ana Carolina Loreti), pessoas que eu amei conhecer e conviver. Obrigada pela amizade.

Um grande agradecimento à minha querida amiga Quênia Ferreira, por estar comigo em momentos delicados e importantes, e por me apresentar a pequena Sofia. Nunca as esquecerei.

Obrigada às minhas queridas amigas Selsiane Carvalho e Ruth de Abreu, a amizade de vocês nesse mestrado foi fundamental e se tornou uma dívida para toda a eternidade.

Às minhas amigas Lucélia Sousa, Layla Pezzin e Nathália Sousa que mesmo a distância se fizeram presentes na minha vida. Amigas para a vida toda.

Ao meu amado senpai (Arleyson Ribeiro Gomes) por sempre me ajudar, por cuidar de mim, espero poder retribuir tudo ao longo de nossa amizade. Obrigada por existir.

À minha amiga Grazy (Graziela de Paula) por me apoiar e ouvir durante esses dois anos longe de casa.

Obrigada a todos que, direta e/ou indiretamente contribuíram com a minha formação. Sintam-se abraçados, e que Deus proteja, ilumine e guie sempre os nossos caminhos.

Meu sincero agradecimento a todos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aroeira (<i>S. terebinthifolius</i> Raddi)	3
2.2 Material sólido particulado de ferro (MSPFe).....	4
2.3 O Fe no solo e na planta.....	5
2.4 Toxidez de ferro	8
2.5 Fungos ectomicorrízicos (ECM).....	10
2.6 O gênero <i>Pisolithus</i>	13
2.7 Efeito dos fungos ECM sob a toxidez de Fe	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Localização e delineamento experimental	17
3.2 Material biológico: inóculos dos fungos ectomicorrízicos.....	17
3.3 Obtenção das sementes, condições de crescimento e aplicação do MSPFe	18
3.4 Parâmetros de crescimento	20
3.5 Porcentagem de colonização micorrízica	21
3.6 Análise nutricional da parte aérea e das raízes	21
3.7 Parâmetros ecofisiológicos	21
3.8 Parâmetros morfológicos da raiz	22
3.9 Enzimas antioxidantes	23
3.10 Análise estatística dos dados	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Respostas no crescimento de plantas de aroeira submetidas ao MSPFe e inoculadas com ectomicorrizas	25

4.3 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea e raiz	30
4.4 Respostas ecofisiológicas das plantas de aroeira	36
4.6 Atividade das enzimas antioxidantes	42
5. DISCUSSÃO	45
6. RESUMO E CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

SILVA, Bianca do Carmo; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2020; Efeito do material sólido particulado de ferro sob o crescimento, nutrição e ecofisiologia de plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) inoculadas com ectomicorrizas. Orientador: Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Entre os poluentes carregados de metais pesados mais emitidos pelas usinas de mineração, encontra-se o material sólido particulado de ferro (MSPFe). Para promover a recuperação de ambientes contaminados por metais pesados, a utilização de plantas associadas a micro-organismos promotores do crescimento vegetal é considerada uma prática promissora. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do material sólido particulado de ferro sob o crescimento, nutrição e ecofisiologia de plantas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) inoculadas com ectomicorrizas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 6 tratamentos com dois isolados de fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01), sendo os tratamentos: controle; Pt-24; ES-01; MSPFe; Pt-24 + MSPFe; e ES-01 + MSPFe com 6 repetições. A aplicação do MSPFe foi equivalente a 3,3271 g cm² semana⁻¹ planta⁻¹, via pulverização. Foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento vegetal; nutrição mineral; trocas gasosas; índice SPAD; fluorescência da clorofila; atributos morfológicos das raízes; e enzimas antioxidantes. As informações obtidas foram submetidas à análise de variância e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey à 5% de probabilidade.

Em ambas as condições de MSPFe (ausência e presença), a inoculação com Pt-24 apresentou grande influência na altura, diâmetro do colo, nº de folhas, área foliar e índice SPAD, enquanto o micro-organismo ES-01 promoveu um maior conteúdo de macro e micronutrientes em ambas as partições (parte aérea e raiz). A simbiose com os fungos ECM *P. tinctorius* e *P. albus* favoreceu as trocas gasosas, expressando maior taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração e eficiência na carboxilação, nas condições sem e com a deposição de MSPFe. Ambos os isolados influenciaram os atributos morfológicos das raízes, com um aumento na área superficial radicular, volume radicular e diâmetro médio radicular. As plantas com MSPFe e micorrizadas aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes catalase e peroxidase nas folhas e diminuíram nas raízes. Em síntese, este trabalho sugere, através dos parâmetros de crescimento, ecofisiológicos e nutricionais, que a inoculação com *P. tinctorius* e *P. albus* apresentam uma resposta eficiente em minimizar o efeito do MSPFe em plantas de *S. terebinthifolius* Raddi.

ABSTRACT

SILVA, Bianca do Carmo; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2020; Effect of iron particulate solid material on growth, nutrition and ecophysiology of aroeira plants (*Schinus terebinthifolius* Raddi) inoculated with ectomycorrhizae. Advisor: Alessandro Coutinho Ramos.

Iron particulate solid material (IPSM) is among the most emitted pollutants loaded with heavy metals by mining plants. To promote the recovery of environments contaminated by heavy metals, the use of plants associated with microorganisms that promote plant growth is considered a promising practice. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of iron particulate solid material on the growth, nutrition and ecophysiology of aroeira plants (*Schinus terebinthifolius* Raddi) inoculated with ectomycorrhizas. The experimental design was completely randomized, consisting of 6 treatments with two isolates of ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius* (isolated Pt-24) and *P. albus* (isolated ES-01), being the treatments: control; Pt-24; ES-01; IPSM; Pt-24 + IPSM; and ES-01 + IPSM with 6 repetitions. The application of IPSM was equivalent to 3.3271 g cm² week⁻¹ plant⁻¹, by spraying. The following parameters were evaluated: plant growth; mineral nutrition; gas exchange; SPAD index; chlorophyll fluorescence; root morphological attributes; and antioxidant enzymes. The information obtained was submitted to analysis of variance and, when significant, the means compared by the Tukey test at 5% probability. In both conditions of IPSM (absence and presence), inoculation with Pt-24 had a great influence on height, stem diameter, number of leaves, leaf area and SPAD index, while the ES-01 microorganism promoted a higher macro

and micronutrient content in both partitions (shoot and root). The symbiosis with the fungi ECM *P. tinctorius* and *P. albus* favored gas exchange, expressing a higher photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration and efficiency in carboxylation under conditions without and with the deposition of IPSM. Both isolates influenced the morphological attributes of the roots, with an increase in the root surface area, root volume and mean root diameter. Plants with IPSM and mycorrhizal increased the activity of the antioxidant enzymes catalase and peroxidase in the leaves and decreased in the roots. In summary, this work suggests through growth, ecophysiological and nutritional parameters that inoculation with *P. tinctorius* and *P. albus* presents an efficient response in minimizing the effect of IPSM in plants of *S. terebinthifolius* Raddi.

1. INTRODUÇÃO

As atividades de mineração podem levar à geração de grandes quantidades de resíduos carregados de metais pesados, que são liberados de maneira descontrolada, causando contaminação generalizada do ecossistema (Fashola et al., 2016). Entre os poluentes mais emitidos pelas usinas de mineração está o material sólido particulado de ferro (MSPFe), que associado às substâncias ácidas (H_2SO_4 e HNO_3) formadas na atmosfera aumentam a disponibilidade do Fe^{2+} , potencializando os efeitos da toxidez do Fe contido no MSPFe (Bojórquez-Quintal et al., 2016; Veronez et al., 2016).

A recuperação de áreas contaminadas utilizando métodos de revegetação possui efeito positivo e com baixo custo de manutenção. Para tanto, é necessário a utilização de espécies que possuam um eficiente mecanismo de tolerância à estresses ambientais e que sejam capazes de sobreviver em ambientes contaminados por metais e outros estresses (Whiting et al., 2004). Além disso, para promover a recuperação de ambientes contaminados, o uso de micro-organismos promotores do crescimento vegetal é considerado uma das práticas mais promissoras e seguras de manejo. Nessa prática, a interação de plantas com micro-organismos do solo pode desempenhar um papel vital na aclimação de plantas a ambientes metalíferos e, portanto, pode ser explorada para melhorar a tolerância a metais auxiliada por micro-organismos simbiotróficos, sobretudo, fungos micorrízicos (Tiwari e Lata, 2018).

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta nativa do Brasil pertencente à família Anacardiaceae. Esta espécie é caracterizada pela alta adaptabilidade à ambientes adversos, incluindo tolerância as áreas com

contaminantes como o cádmio (Silva et al., 2017; Dawkins e Esiobu, 2018). Somado a isso, a aroeira possui a capacidade de associar-se simbioticamente com alguns fungos ectomicorrízicos (ECM) (Dawkins e Esiobu, 2017), o que poderia melhorar o seu desenvolvimento em ambiente contaminado por metais.

Os fungos ECM são predominantemente basidiomicetos, alguns ascomicetos e poucos zigomicetos. Nessas estruturas simbióticas, a rede Hartig é a interface para a troca metabólica entre o fungo e a raiz. O manto micorrízico está conectado aos filamentos de fungos que se estendem ao solo (micélio extradádico), diretamente envolvidos na mobilização, absorção e translocação de nutrientes do solo e água para as raízes (Domínguez-Núñez e Albanesi, 2020). Além disso, estes micro-organismos tornam a planta mais tolerantes ao estresse causado por metais pesados, por meio das alterações do pH da rizosfera, modificação no sistema de absorção e detoxificação intracelular nos tecidos fúngicos (Kabata-Pendias, 2010).

Os fungos ECM do gênero *Pisolithus* podem proporcionar plantas com maior taxa de crescimento, melhor estado hídrico e maiores valores de troca gasosa, indicando, assim, maior resistência a ambientes desfavoráveis ao seu desenvolvimento (Garcia et al., 2010). De forma geral, os fungos micorrízicos desempenham um papel crucial na absorção de nutrientes das plantas, nas relações hídricas, no estabelecimento de ecossistemas, na diversidade e na produtividade das plantas, bem como também protegem as plantas contra estresses bióticos e abióticos (Quoreshi, 2008). Esses mecanismos podem servir como ferramentas potenciais para a biorremediação de locais poluídos por metais pesados (Fashola et al., 2016).

Contudo, ainda são escassas as informações acerca da relação: planta – fungos ECM – excesso de MSPFe. Assim, a hipótese deste trabalho é que os fungos ECM irão promover uma tolerância ao excesso de Fe advinda do MSPFe nas plantas de aroeira, através de respostas positivas como: no crescimento, trocas gasosas, fluorescência da clorofila, enzimas antioxidantes, bem como nos parâmetros nutricionais, afetando positivamente o desenvolvimento da planta.

Dessa forma, uma melhor compreensão da simbiose ectomicorrízica em plantas de aroeira sob efeito do particulado de Fe, pode levar a avanços no manejo florestal e na proteção ambiental. Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito do material sólido particulado de ferro sob o crescimento, nutrição e ecofisiologia de plantas de aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi) inoculadas com ectomicorrizas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi)

A aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi) é uma espécie perenifólia, heliófila e pioneira, pertencente à família Anacardiaceae (Lorenzi, 2014). É uma essência florestal nativa do Brasil, com ocorrência de Pernambuco até o Rio Grande do Sul, podendo ser encontrada em beira de rios, córrego e em várias várzeas de formação secundária. Entretanto, esta espécie também se desenvolve em terrenos secos e pobres. Desta forma, a aroeira pode ser encontrada desde a restinga até as florestas pluviais (Barbosa et al., 2007; Lorenzi, 2014).

Esta espécie apresenta folhas estreitas e pontiagudas, tronco tortuoso com casca grossa e fissurada. Seus frutos possuem a aparência de uma pequena pimenta de coloração rosa-avermelhada, por isso, também chamados de pimenta-rosa, *pinkpepper*, *poivre rose*, aroeira-vermelha, entre outros nomes (Queires et al., 2006; Patocka e Almeida, 2017).

Dentro de sua amplitude ambiental, a espécie apresenta distintas formas de crescimento, com ecótipos de porte variando desde pequenos arbustos até árvores com 10 metros de altura (Queires et al., 2006). Na restinga, onde é uma espécie característica, a aroeira apresenta-se como um arbusto lenhoso, com caule espesso e tortuoso, imprimindo um carácter florestal à esta vegetação (Cesário e Gaglianone, 2008). Essas mudanças morfológicas e fisiológicas ocorrem em função da adaptação da espécie aos vários ambientes habitados, sendo o grau dessa adaptação, ditado por características genéticas da planta em interação com o seu ambiente (Scalon et al., 2012).

A aroeira possui uma grande importância econômica por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, fitoquímicas e alimentícias (Ennigrou et al., 2016; Tlili et al., 2018). Entretanto, é em programas de reflorestamento ambiental e recuperação de áreas degradadas que esta espécie se destaca ecologicamente (Sattler et al., 2019). Este fato é associado ao caráter de pioneirismo e agressividade competitiva da aroeira, de sua tolerância moderada ao déficit hídrico e à alta temperatura do solo, assim como, sua boa interação biótica com microorganismos promotores do crescimento vegetal (Dawkins e Esiobu, 2017; Dawkins e Esiobu, 2018). Todas essas características influencia positivamente o sucesso regenerativo de ambientes fortemente edáficos e com influência antrópica, como as áreas contaminadas por metais, advindos da indústria de minério (José et al., 2005; Silva et al., 2008; Sabbi et al., 2010; Dobbss et al., 2018).

Portanto, no Brasil a aroeira assume importante papel econômico-ambiental, principalmente por se constituir como matéria-prima para produtores e para indústrias, e devido à sua utilidade para programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, com ênfase para o uso na biorremediação (Dawkins e Esiobu, 2017; Sattler et al., 2019). Dessa forma, a pesquisa acerca do uso desta essência florestal vem ganhando destaque, gerando ano após ano, novas tecnologias, que trazem consigo o aumento do potencial produtivo da planta, em condições normais ou com a presença de estresses (Patocka e Almeida, 2017; Sattler et al., 2019), como por exemplo a presença de MSPFe.

2.2 Material sólido particulado de ferro (MSPFe)

Dentre os diversos materiais originados das indústrias mineradoras lançados no ambiente, está o material sólido particulado (MSP). Este pode ser constituído de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos, cuja composição pode variar significativamente, dependendo da natureza dos materiais industrializados e da localização da fonte de emissão, podendo afetar a vegetação diretamente via foliar ou pela sua deposição no solo (Khan et al., 2008; Zhang et al., 2010; Wuana e Okieimen, 2011).

O MSPFe é um subproduto das indústrias de mineração que pode causar danos à vegetação, uma vez que, ao ser absorvido pelas plantas eleva os teores

de Fe, podendo resultar em reduções significativas na taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração e obstrução dos efeitos bioquímicos desencadeados pelo estresse oxidativo (Pereira et al., 2009). Somado a isso, tem-se a influência da precipitação da chuva ácida que aumenta os efeitos do excesso de Fe pela redução do pH.

Segundo Bojórquez-Quintal et al. (2016), a maioria dos solos ácidos ocorre nos trópicos e subtropicais, onde a acidificação é um processo natural. Essa situação pode ser agravada pela contaminação ambiental através do uso de fertilizantes e substâncias acidificantes, bem como o uso de fontes de energia fóssil, como carvão e óleo, que liberam dióxido de nitrogênio (NO_2) e dióxido de enxofre (SO_2) na atmosfera e que, na presença de agentes oxidantes, originam ácido nítrico (HNO_3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), aumentando, assim, a precipitação da chuva ácida e a acidificação dos corpos de água, do solo e das plantas.

Neste sentido, o excesso de Fe provocado pelo acúmulo de MSPFe no solo pode precipitar em torno das raízes das plantas, formando uma crosta de óxido de ferro comumente chamada de “placa de ferro”, capaz de limitar a absorção de minerais, como o próprio ferro (Ando et al., 1983), dependente de fatores como a sua extensão, a concentração do metal, o pH da solução da planta ou da rizosfera e a idade da raiz (Rengel, 2015). Outra consequência que o excesso de Fe pode provocar é desbalanços nutricionais nas plantas, induzindo à deficiência de alguns minerais essenciais tais como P, Ca, K, Mg e Zn (Audebert e Fofana, 2009), comprometendo, desta forma, o crescimento e desenvolvimento das plantas.

2.3 O Fe no solo e na planta

O Fe é o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre, representando cerca de 5% deste total, depois do oxigênio, silício e alumínio, (Girard e Girard, 2013) e o segundo metal mais abundante depois do alumínio (Cotton et al., 1999).

Este micronutriente é essencial para o desenvolvimento das plantas, pois atua como cofator de diversas enzimas que participam de importantes processos metabólicos como: fotossíntese, respiração, fixação do nitrogênio, síntese de clorofila, síntese de DNA, citocromos e de hormônios, entre outros. O Fe também está envolvido em reações de redução - oxidação, juntamente com outros

micronutrientes metálicos, tais como Zn, Cu, Ni e Mo, que podem sofrer reações de oxidação e redução reversíveis, além de desempenharem funções importantes na transformação de energia e na transferência de elétrons (Gurzău et al., 2003; Taiz e Zeiger, 2009).

O Fe é um nutriente constituinte das proteínas e enzimas envolvidas em diferentes processos celulares, incluindo citocromos, catalase, peroxidases não-específicas, dismutase do superóxido, leghemoglobina, enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, nitrogenase e várias outras enzimas envolvidas na biossíntese de clorofilas (Asada, 1992; Kampfenkel et al., 1995).

O ferro está presente na solução do solo como Fe^{2+} (ferroso), Fe^{3+} (férico) e complexos orgânicos, podendo ser absorvidos pelas plantas nessas três formas. Como o Fe^{3+} é pouco solúvel, o Fe^{2+} e o ferro em complexos orgânicos solúveis são as principais formas de absorção e transporte na planta (Marschner, 2012). As reações do ferro são largamente dependentes dos baixos níveis de pH e do Eh (potencial redox) no ambiente, também são sistema e do estágio de oxidação dos componentes de ferro envolvidos (Husson, 2013). A toxicidade do ferro ferroso é frequente em Eh e pH baixos e, inversamente, a deficiência de ferro pode ocorrer em Eh e pH altos (Tanaka et al., 1966).

O Fe^{3+} é um composto de baixa solubilidade e encontra-se normalmente precipitado, quelado a matéria orgânica. No solo, a relação entre Fe^{3+} e Fe^{2+} é determinada principalmente pelas condições de aeração. Em solos inundados, a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} provoca um aumento na disponibilidade deste micronutriente para as plantas. Em solos com boa aeração, a forma Fe^{2+} ocorre em proporção muito pequena, exceto em condições de pH muito baixo. Neste sentido, os solos, em geral, apresentam teores adequados deste nutriente quando o pH está próximo a 6,0 (Marschner, 2012; Colombo et al., 2013; Krohling et al., 2016).

As plantas apresentam mecanismos específicos para a absorção de ferro a fim de suprir a demanda para seu crescimento e desenvolvimento. Em condições normais, com uma concentração suficiente de ferro no solo, as plantas reduzem o Fe^{3+} a Fe^{2+} através da membrana plasmática via transportador de baixa afinidade, porém este ainda não foi caracterizado à nível molecular (Curie e Briat, 2003). Em condições aeróbicas a concentração de Fe^{2+} na solução do solo normalmente é baixa. Desta forma, em condições de deficiência de ferro as plantas desenvolvem diferentes estratégias para aumentar a absorção deste nutriente. De acordo com

Römheld (1987) e Marschner e Römheld (1994) estas estratégias foram denominadas de Estratégia I (redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}) e Estratégia II (quelatagem do Fe^{3+}).

Estratégia I - adotada pelas plantas superiores (dicotiledôneas e monocotiledôneas), com exceção das gramíneas, consiste na: i) protonação da rizosfera através de uma H^+ -ATPase específica da membrana plasmática que acidifica o pH da solução do solo e aumenta a solubilidade do Fe^{3+} ; ii) redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} através da enzima quelato redutase (FRO, *Ferric Reductase Oxidase*); e iii) transporte do Fe^{2+} para a raiz através de um transportador de especificidade seletiva (IRT1, *Iron Regulated Transporter1*) (Marschner e Römheld, 1994; Eide et al., 1996; Robinson et al., 1999).

Estratégia II - desenvolvida em gramíneas monocotiledôneas como o arroz, milho e trigo, que utilizam uma estratégia de quelatagem para aquisição do Fe do solo, consiste em: i) as plantas que fazem uso da liberação de fitossideróforos (PS) na rizosfera, que são aminoácidos não proteicos sintetizados a partir de compostos de uma família de ácidos mugineicos (MAs) que inclui os ácidos mugineico (MA), 2'-deoximugineico (DMA), 3-epihidroximugineico (epi-HMA), e 3-epihidroxi 2'-deoximugineico (epiHDMA) liberados na rizosfera de plantas sob deficiência de ferro, com o objetivo de aumentar a absorção deste elemento (Curie e Briat, 2003). Estes compostos apresentam alta afinidade e propriedades minerais quelantes, assim, se ligam ao Fe^{3+} na rizosfera, formando o complexo estável Fe^{3+} -PS (solúvel), podendo, desta forma, ser absorvido por transportadores sem que seja necessária uma redução extracelular (Roberts et al., 2004); ii) os complexos formados são reconhecidos e transportados para o interior das células da raiz por transportadores específicos, e usados como fonte de ferro na planta (Mori, 1999; Curie et al., 2001). Segundo Schmidt (1999), além das estratégias citadas acima, alterações morfológicas na raiz e aumento da concentração de citrato no floema, também tem como função auxiliar na absorção de ferro.

Depois que o nutriente entra na epiderme da planta, através das raízes, por absorção ativa, ele é transportado por fluxo transpiratório até o xilema. Através do diferencial de potencial gerado pela transpiração, o Fe é carregado na seiva bruta e translocado até a parte superior das plantas. Dentro do xilema o ferro pode sofrer quelatagem por alguns ácidos orgânicos, principalmente o citrato. Já sua mobilidade para o floema é pouco conhecida, mas, sabe-se que o ferro contido na seiva é

proveniente das folhas, e é ligado por um transportador, a nicotianamina. Já o transporte intracelular é realizado por vários transportadores e genes (Cataldo et al., 1988; Stephan e Scholz, 1993; Curie e Briat, 2003).

Segundo Marschner (2012) o Fe é considerado pouco móvel na planta, pois é afetado por vários fatores, como presença de Mn, deficiência de K, elevado teor de P, entre outros. Todavia, sua remobilização é intermediária em angiospermas, em função da inclusão do ferro em componentes estruturais nas grandes moléculas orgânicas e cloroplastos.

2.4 Toxidez de ferro

A toxidez por ferro é atribuída à excessiva absorção do elemento pela planta (toxidez direta) ou à deficiência generalizada de outros nutrientes, causados por altos teores de ferro solúvel na solução do solo (toxidez indireta) (Saaltink et al., 2017). Em síntese, os sintomas de toxicidade de ferro consistem de: desequilíbrio fisiológico; crescimento e desenvolvimento reduzido; baixo perfilhamento; folhas amareladas; secamento total das folhas com concentrações muito altas de ferro; raízes curtas, grossas e pouco ramificadas e com coloração avermelhada (Li et al., 2015; Souza et al., 2019).

O excesso de Fe pode também causar desbalanços nutricionais nas plantas, induzindo à deficiência de alguns minerais essenciais tais como P, Ca, K, Mg e Zn, podendo também desfavorecer o equilíbrio fisiológico (Audebert e Fofana, 2009).

Dentre os metais de alta densidade (aqueles acima de 5 g cm^{-3}) que são potencialmente tóxicos na forma de íons, o ferro em nível adequado é considerado um metal não crítico em relação à toxicidade na fauna e na flora (Mcbride, 1994; Epstein e Bloom, 2006). Entretanto, são inúmeros os fatores que interferem na disponibilidade e mobilidade de metais, inclusive do Fe. Alguns deles são: pH, nível de oxigênio, teor de matéria orgânica, quantidade de argila e potencial redox. Além da concentração do íon em questão, a magnitude do dano depende também do tempo de exposição, da sensibilidade das plantas, do uso da água pelas culturas, entre outros (Smith et al., 2002; Walker, 2004; Campos, 2010).

O excesso de Fe pode gerar injúrias nas células da epiderme e do parênquima clorofiliano, como as trocas gasosas, fluorescência da clorofila (Pinto

et al., 2018; Aung et al., 2019); redução do conteúdo de clorofila (Chatterjee et al., 2006); estresse oxidativo com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Connolly e Guerinot, 2002); desequilíbrio nutricional (Audebert e Fofana, 2009); danos no aparato fotossintético (Suh et al., 2002); instabilidade da membrana (Fang et al., 2001); clorose nas folhas velhas (Chatterjee et al., 2006); escurecimento das raízes (Sahrawat, 2005); e inibição do crescimento da planta (Chatterjee et al., 2006). O excesso de ferro pode ainda danificar lipídios, proteínas e DNA pela formação de radicais hidroxila na reação de Feton (Connolly e Guerinot, 2002).

No interior da célula, as quantidades excessivas de Fe podem potencializar o estresse oxidativo, com aumento na produção de ROS, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (HO^{\cdot}), este último é considerado de maior toxidez para a célula. A HO^{\cdot} é extremamente tóxica para o metabolismo celular, pois é responsável pela oxidação de macromoléculas biológicas como lipídios de membrana, ácidos nucleicos e proteínas (Marschner, 2012).

Uma das estratégias de desintoxicação das plantas com alta concentrações de ROS é por meio dos sistemas enzimáticos antioxidantes (Agarwal et al. 2005). Os sistemas de defesa antioxidante das plantas, incluindo a proteção enzimática, co-evoluíram com o metabolismo aeróbico para neutralizar os danos oxidativos devido às ROS (Davar et al., 2013). Dessa forma, os mecanismos de ação enzimática para minimizar as ROS ocorrem via aumento das enzimas antioxidantes, como o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX) e os mecanismos de ação não-enzimática tais como, glutathiona reduzida, ácido ascórbico, carotenoides, dentre outros (Fang et al., 2001). Neste trabalho, foi destacado o papel antioxidante da CAT e POX.

A CAT é uma enzima indispensável à desintoxicação da célula vegetal em condições de estresse, pois é responsável pela dismutação direta do H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo o H_2O_2 gerado nos peroxissomos pelas oxidases envolvidas na oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e no catabolismo de purinas, o que fazo da CAT a principal via de degradação do H_2O_2 na célula vegetal (Gill e Tuteja, 2010). A POX é uma enzima que catalisa a oxido-redução entre H_2O_2 e vários redutores, estando envolvida também em vários processos fisiológicos nas plantas, tais como a lignificação, metabolismo da auxina, síntese de fitoalexina, reticulação de componentes da parede celular e outros (Almagro et al., 2008).

Para sustentar o crescimento e evitar a toxicidade do ferro celular ou minimizá-la, as plantas também dependem da capacidade de armazenar e remobilizar o ferro (Li et al., 2015). Tratando-se do armazenamento do Fe, este pode ocorrer no apoplasto, nos vacúolos, nos plastídeos e em uma proteína especializada denominada ferritina (Murgia et al., 2002; Curie e Briat, 2003), a qual atua na manutenção da homeostase de ferro nas células, como reportado por Majerus et al. (2009) em plantas de arroz expostas ao excesso desse metal.

As concentrações de Fe na planta variam entre 10 e 1500 mg kg⁻¹ de massa de matéria seca, dependendo da parte da planta e da espécie, considerando-se concentrações entre 50 e 100 mg kg⁻¹ como adequadas para um crescimento normal da planta (Dechen e Nachtigall, 2006). Contudo, para alcançar níveis tóxicos as concentrações dependem da espécie, cultivar, estado fisiológico e das condições de crescimento (Mahender et al., 2019). Em plantas de *Solanum tuberosum* L., valores entre 61 e 134 mg kg⁻¹ MS de Fe são considerados tóxicos (Chatterjee et al., 2006). Em *Eugenia uniflora* L. foram detectados sintomas de toxicidade nos valores entre 120 e 229 mg kg⁻¹ MS de Fe (Jucoski et al., 2016).

Segundo Li et al. (2015), para sobreviver em condições de toxidez por Fe as plantas desenvolveram mecanismos morfológicos e fisiológicos que ajudam a prevenir ou mesmo tolerar tais condições. Assim como as plantas apresentam mecanismos para absorver Fe em condições de deficiência, estas também apresentam mecanismos para evitar sua toxicidade (Gross et al., 2003).

De modo geral, as plantas apresentam estratégias de adaptação para minimizar os efeitos da toxidez por ferro, sendo estas: a estratégia I, mecanismo de exclusão de Fe²⁺ ao nível de raiz, por oxidação e formação da placa férrica na rizosfera; a estratégia II, mecanismo de inclusão, o sequestro em vacúolos, apoplasto e proteínas ferritina; a estratégia III, mecanismo de tolerância ou inativação do Fe nos tecidos das plantas, detoxificação por ação de enzimas antioxidantes; estratégia IV, associação simbiótica com micro-organismos (Chen et al., 1980; Audebert e Sahrawat, 2000; Becker e Asch, 2005; Moreira e Siqueira, 2006; Majerus et al., 2007; Majerus et al., 2009).

2.5 Fungos ectomicorrízicos (ECM)

A capacidade das raízes das plantas estabelecerem relações simbióticas mutualistas com certos fungos do solo é conhecida como micorrizas (Silveira, 1992), sendo este termo inicialmente proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, em 1885 (Siqueira e Franco, 1988). Nessas associações, os fungos micorrízicos aumentam a absorção de vários nutrientes do solo e os translocam para a planta hospedeira, por meio da distribuição difusa do micélio no solo ao redor das raízes, pois assim alcança distâncias maiores do que aquelas alcançadas pelas raízes não colonizadas e desta forma, proporciona maior capacidade de absorção de água e nutrientes, principalmente P, N e K (Clasen et al., 2018).

Sete diferentes categorias de micorrizas têm sido distinguidas com base em suas características morfológicas, espécies de fungos e plantas envolvidas, são elas: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutóide, monotropóide, ericóide e orquidóide (Finlay, 2008; Smith; Read, 2008).

O termo ectomicorriza foi proposto inicialmente por Peyronel et al. (1969), em uma pesquisa realizada pela Universidade Estadual de Oregon, Estados Unidos. Nesta simbiose, as raízes são caracterizadas pela presença de três estruturas:

- (i) o *manto fúngico*, formado por uma massa de hifas que recobre externamente a raiz hospedeira, podendo variar em relação a sua estrutura organizacional, cor e espessura, ou até formar um falso tecido parenquimatoso, influenciando diretamente na absorção de água e de nutrientes, e a proteção contra patógenos;
- (ii) um *complexo sistema denominado Rede de Hartig*, estrutura onde ocorre as trocas metabólicas entre os simbiontes, e as hifas cobrem as radículas, formando uma espécie de manto fora dos espaços intercelulares, mas que se vincula ao córtex celular da raiz; e
- (iii) o *micélio externo* que faz a ligação entre a ectomicorriza/solo/basidiocarpos, favorecendo maior captação de água e nutriente, devido ao aumento da região explorada pelo crescimento das hifas (Brundrett et al., 1996; Peterson et al., 2004; Smith e Read, 2008).

Os fungos ectomicorrízicos (ECM) são encontrados em diferentes famílias dos filos Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota e Deuteromycota, mas a maioria das espécies pertence ao filo Basidiomycota (Brundrett et al., 1996; Peterson et al., 2004). O filo Basidiomycota contém 16 classes, 52 ordens, 177 famílias, 1589

gêneros e mais de 30.000 espécies (Moore, 1980; Kirk et al., 2008). Segundo Dai et al. (2015), estima-se que aproximadamente 32% das taxas de fungos já descritos na literatura pertençam a este filo.

No Brasil, os micro-organismos ECM que pertencem ao filo Basidiomycota, e que frequentemente colonizam espécies florestais, pertencem aos gêneros: *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon*, *Amanita*, *Lactarius*, *Russula*, *Thelephora* e *Ramaria* (Moreira e Siqueira, 2006; Siqueira et al., 2010).

Pela sua natureza simbiote mutualista, os fungos ECM têm uma grande importância ecológica e econômica por diversos fatores (Martin et al., 2016). Podem transformar certas substâncias tornando-as disponíveis para as plantas, aumentar a tolerância do vegetal quando este é submetido a solos de composição ácida ou com alta toxidez, ou ainda, elevar a viabilidade das árvores frente ao impacto da ação eutrofisadora em solos florestais (Sebastiana et al., 2018; Maltz et al., 2019). Além disso, os fungos ECM proporcionam mudanças na arquitetura radicular com maior intensidade de ramificação, aumentando a superfície de contato com o solo, e dessa forma as raízes colonizadas apresentam maior longevidade, maior resistência a patógenos, a elementos tóxicos no solo e a condições extremas de temperatura e umidade (Clasen et al., 2018).

No processo de colonização, a troca de sinais entre os simbioses inicia-se antes do contato físico e da formação das estruturas típicas (manto, rede de Hartig, etc). As primeiras trocas de sinais entre os simbioses ocorrem através de exsudação das raízes, que estimulam a ramificação das hifas produzidas a partir da germinação de propágulos do solo, penetrando no córtex radicular, onde cresce e se ramifica. A germinação do propágulo fúngico pode ser influenciada pelas condições da rizosfera (zona de depleção para N e enriquecida para C), servindo de estímulo trófico para o crescimento da hifa em direção à raiz (Tagu et al., 2002).

Desta forma, de acordo com Malajczuk et al. (1990), antes do início da função simbiótica, ocorrem cinco estágios de desenvolvimento:

1. Pré-infecção, caracterizada pelo contato das hifas com a raiz;
2. Iniciação simbiótica, configurada pela ligação fúngica à epiderme;
3. Colonização fúngica, caracterizada pela multiplicação e penetração das hifas em camadas entre células epidérmicas, que após alguns dias de propagação, variando em função da espécie hospedeira, formarão o manto;

4. Diferenciação simbiótica, na qual a rede de Hartig prolifera e há um rápido acúmulo de mantos-hifas; e
5. Função simbiótica, significa o fim do crescimento “líquido” de Hartig e o desenvolvimento de um manto consistente, fortemente pressionado contra as células epidérmicas.

Após o desenvolvimento das hifas os fungos lançam suas redes de hifas no solo, ampliando, assim, o volume de solo que seria explorado apenas pelas raízes, contribuindo para uma maior absorção de água e nutrientes minerais essenciais, P em especial (Kaur et al., 2014). Segundo Gadd (2007), este benefício nutricional está associando à mobilidade e biodisponibilidade alteradas de nutrientes e metais não essenciais, assim como às distribuições alteradas de metais entre plantas e fungos, o que contribui com a produtividade vegetal.

Outros benefícios das ectomicorrizas que também podem resultar em efeitos adicionais à melhoria nutricional são: a ação biorreguladora, a qual se relaciona com a produção de substâncias estimulantes de crescimento, melhoria na relação água-planta, solo-planta e alterações bioquímicas e fisiológicas (Shi et al., 2017). Em troca de todos esses benefícios as plantas fornecem substrato energético ao fungo, resultando em uma perfeita interação (Kaur et al., 2014).

2.6 O gênero *Pisolithus*

O gênero *Pisolithus* pertence ao filo Basidiomycota e à família Sclerodermataceae. É difundido mundialmente, principalmente devido ao seu uso decorrente em programas controlados de micorrização, formando associações ectomicorrízicas com vários gêneros de plantas lenhosas (Lebel et al., 2018). Estes fungos foram utilizados com sucesso na melhoria do crescimento de eucalipto (Costa et al., 2019) e em plantações de pinus (Franco e Castro, 2014).

As espécies do gênero *Pisolithus* já foram registradas em diversos ambientes, como florestas, plantações e locais altamente perturbados (áreas de mineração, margens da estrada e outros), e demonstraram ser particularmente eficazes na melhoria do crescimento das plantas (Egerton-Warburton, 2015). Segundo este mesmo autor, o *Pisolithus* sp. é tolerante ao alumínio, confere

aumento no crescimento, nutrição mineral e tolerância de metais ao eucalipto em mina ácida.

As introduções iniciais de *Pisolithus* sp. para silvicultura comercial e horticultura provavelmente ocorreram através de esporos e raízes ectomicorrízicas em associação com mudas de coníferas, carvalhos ou eucaliptos do viveiro. Recentemente, a aplicação de vários inóculos comerciais contendo '*Pisolithus*' (e outros fungos micorrízicos) estão ocorrendo em plantações, paisagens urbanas e parques urbanos, na tentativa de aumentar o vigor e a sobrevivência de plantas nativas e não-nativas (Lebel et al., 2018).

Segundo Maltz et al. (2019), a inoculação com *Pisolithus* pode favorecer o crescimento vegetal, aliviar condições ambientais estressantes e alterar a estrutura das comunidades de fungos micorrízicos. Como observado por Alvarez et al. (2009) ao trabalharem com *Nothofagus dombeyi* sob condições de seca, detectaram um aumento no crescimento, na atividade enzimática e melhorias no aparato nutricional, em especial N e P. Sebastiana et al. (2018) estudando plantas de sobreiro (*Quercus suber* L.), também em condição de seca, evidenciaram efeito positivo na altura, biomassa da parte aérea, diâmetro e crescimento das raízes, mostrando que a inoculação do *Pisolithus* foi eficaz no aumento da tolerância à seca. Shi et al. (2017) detectaram que a inoculação com *Pisolithus* sp. em plantas de *Pinus thunbergii*, promoveu um incremento no crescimento e na taxa fotossintética, indicando que os fungos podem melhorar a sobrevivência e a competitividade das plantas hospedeiras.

O uso de *Pisolithus* sp. também possui destaque na recuperação de áreas contaminadas, como as mineradoras (Aggangan e Aggangan, 2012). Estes micro-organismos possuem papel biocontrolador que atenuam os danos causados por estresses abióticos, e promovem a melhoria nutricional e a agregação do solo, bem como reduzem a severidade e/ou amenizam os danos causados por toxidez por metais (Franco e Castro, 2014; Canton et al., 2016), mostrando a alta relação simbiótica mutualista desses fungos com as plantas.

2.7 Efeito dos fungos ECM sob a toxidez de Fe

Os fungos ECM estão entre os membros mais influentes da microbiota do solo, pois auxiliam os processos de recuperação das áreas degradadas, que ainda são cruciais para a sustentabilidade dos ecossistemas terrestres. Todavia, não é apenas a presença dos fungos ECM que auxiliam nos processos de recuperação das áreas degradadas, mas sua diversidade genética e funcional, fatores estes, importantes tanto para a estrutura da comunidade vegetal quanto para a estrutura do ecossistema (Domínguez-Núñez e Albanesi, 2020). Desta forma, a utilização desses fungos apresenta um papel importante, podendo influenciar diretamente na tolerância aos estresses ambientais, como a toxidez de Fe, no efeito inibitório de estresse oxidativo na planta e em melhorias na aquisição de nutrientes (Bonfante e Genre, 2010; Maltz et al., 2019).

Para obter os benefícios dos fungos para as plantas hospedeiras em condições de toxidez de metais pesados, é necessário avaliar o impacto dos metais sobre estes, pois os fungos ectomicorrízicos apresentam variações intra, interespecíficas, e adaptação à fatores abióticos diversos (Glen et al., 2001; Kernaghan et al., 2003).

Em ambiente com toxicidade de Fe e sem micorrizas, o excesso deste elemento pode limitar o desempenho fotossintético e nutricional da planta, e o MSPFe, subproduto das indústrias de mineração, pode causar desequilíbrio na dinâmica sucessional e comprometer o desenvolvimento das espécies vegetais da área (Pereira et al., 2009). Contudo, na presença dos fungos ECM, os mecanismos pelos quais estes micro-organismos podem tolerar o excesso de metais pesados como o Fe são numerosos. Esses mecanismos pode ser processos externos às hifas, como precipitação dos metais (imobilização extracelular), ligação a polímeros da parede celular (quitina ou melanina), alterações no pH da rizosfera, e processos internos nas células fúngicas, que resultam na complexação (quelação intracelular) ou compartimentalização dos metais em vacúolos dos fungos, resultando na redução da exposição radicular e a destoxificação intracelular nos tecidos fúngicos, inferindo assim, na fisiologia e bioquímica vegetal (Gadd, 1993; Kabata-Pendias, 2010).

Dessa forma, por conferir proteção às plantas em relação aos efeitos nocivos de altas concentrações de metais pesados no solo, a inoculação com fungos ECM é fortemente associada à fitorremediação, que consiste em uma técnica utilizada

para remover contaminantes do solo através do cultivo de espécies vegetais tolerantes aos metais (Ban et al., 2015; Liu et al., 2015).

A fitorremediação com plantas ectomicorrizadas teria, portanto, um grande potencial para remover ou diminuir a quantidade de elementos tóxicos nos solos. Isso ocorre, pois a composição da comunidade dos fungos ECM e suas características funcionais mediam o desempenho das plantas em solos contaminados por metais. Além disso, os fungos ECM têm uma alta influência na capacidade das plantas para fitorremediação de contaminantes (Gil-Martínez et al., 2018), tornando a interação entre esses micro-organismos e diversas espécies de plantas uma importante estratégia de sobrevivência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no *Campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ (Latitude de 21°19'23" S; Longitude de 41°10'40" W; Altitude de 14 m), sob condições naturais de luminosidade e temperatura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 6 tratamentos com dois isolados de fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (isolado Pt-24) e *Pisolithus albus* (isolado ES-01). Os tratamentos realizados foram: controle; Pt-24; ES-01; MSPFe; Pt-24 + MSPFe; e ES-01 + MSPFe com 6 repetições por tratamento. A aplicação do MSPFe foi equivalente a 3,3271 g cm² semana⁻¹ planta⁻¹, via pulverização. A unidade experimental foi composta por um vaso de plástico com capacidade de 720 mL, com uma planta por vaso.

3.2 Material biológico: inóculos dos fungos ectomicorrízicos

Foram utilizados dois isolados de fungos ectomicorrízicos na realização do experimento. O fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* (isolado Pt-24), originário de Michigan-EUA, foi obtido da coleção de culturas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil. O fungo *P. albus* (isolado ES-01) foi coletado em um solo Latossolo Vermelho-Amarelo, de um

plântio de eucalipto na cidade de Biriricas (20°22'16"S/40°35'08"), no município de Domingos Martins, estado do Espírito Santo, Brasil (Figura 1).

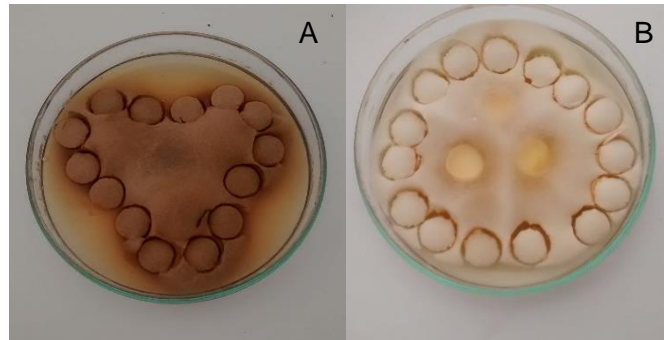


Figura 1. *P. tinctorius* (isolado Pt-24) (A) e *P. albus* (isolado ES-01) (B) em meio MNM.

As culturas de estoque foram cultivadas na ausência de luz em incubadora BOD a 25 ± 1 °C em meio de cultura MNM – Melin-Norkrans Modificado (Marx, 1969). No preparo do meio MNM, foram adicionados os seguintes reagentes para 1L de meio: CaCl_2 (0,05g/L), NaCl (0,025g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,15g/L), FeCl_3 (1g/L), 4mL de KH_2PO_4 (0,125g/L) e tiamina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 15g de ágar-ágar, 10g de glicose. O meio MNM foi ajustado para pH 5,5-5,6 antes da esterilização, por 20 min a 121 °C.

3.3 Obtenção das sementes, condições de crescimento e aplicação do MSPFe

As sementes *S. terebinthifolius* Raddi, 1820 (Sapindales: Anacardiaceae Lindley, 1830) foram obtidas em casa comercial (Sementes Caiçara - Lote: 015 - Registro: 25492). As sementes foram submetidas a um processo de escarificação mecânica para a retirada da mucilagem, e foram tratadas por meio da desinfestação de superfície com hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos, e posteriormente com álcool 70% por 3 minutos.

Após a esterilização, as sementes foram semeadas em bandejas, contendo areia quartzo (12/20) autoclavada duas vezes, com intervalo de 24 horas entre uma e outra esterilização, a 121 °C, durante 60 minutos. O processo de germinação das mudas foi realizado em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de 25 ± 1 °C, 70% umidade e (16/8h luz/escuro) durante 30 dias. Após 30 dias da germinação as mudas foram transplantadas para tubetes de

100 cm³, contendo os substratos previamente autoclavados por duas vezes compostos de areia:terra vegetal na proporção 1:1 (v/v), e em seguida colocado em casa de vegetação. Após aclimação de 15 dias, foi realizada a inoculação com os micro-organismos.

A inoculação das plantas com os fungos micorrízicos foi realizada 45 dias após a germinação, por meio da utilização de discos de meio de cultura de 11 mm, contendo micélio dos fungos ectomicorrízicos (isolado Pt-24 e isolado ES01). As raízes foram retiradas dos tubetes e envolvidas nos discos de meio de cultura com os micro-organismos, em seguida, foram devolvidas para os seus respectivos tubetes. Após 15 dias foram transplantadas para os vasos de 720 mL (ø 10 cm) com o substrato areia:terra vegetal, tratado como já descrito. Desta forma, 30 dias após esse processo iniciou-se a aplicação do MSPFe.

O MSPFe utilizado neste experimento foi o minério de ferro em pó, que é estocado no quintal da indústria de mineração SAMARCO (Figura 2). O minério apresenta 279,0 mg dm⁻³ de Fe e é composto por diversos outros elementos e matéria orgânica, conforme descrito na tabela 1.



Figura 2. MSPFe utilizado no experimento.

Tabela 1. Análise dos componentes do MSPFe.

pH	P	K	Ca	Mg	Al	Na	C	MO	Fe	Cu	Zn	Mn	S	B
	mg dm ⁻³	-----cmol _c dm ⁻³ -----					----%----		-----mg dm ⁻³ -----					
8,9	71	50	2,9	0,2	0	1,92	0,55	8,47	279	2,7	2,4	311,2	69,1	0,5

As plantas foram submetidas a duas aplicações por semana de MSPFe, via pulverização, 45 dias após a inoculação (d.a.i.). Para a aplicação do MSPFe, foi feito um cálculo fundamentado no MSPFe liberado nas mineradoras, 6 mg cm² dia⁻¹

¹ de MSPFe (Lopes et al., 2000), que por sua vez, é equivalente a 0,471 g cm² dia⁻¹ por vaso. Este cálculo baseado no raio do vaso deste experimento (5 cm²), e acrescentado a média de perda, totalizando 0,4753 g cm² dia⁻¹ planta⁻¹. A média de perda foi calculada usando o peso do MSPFe perdido após sua aplicação via pulverização em três plantas. Foram realizadas duas aplicações por semana de 3,3271 g cm² dia⁻¹ planta⁻¹ de MSPFe (0,4753 g x 7 = 3,3271) entre os horários de 7-9 horas (manhã), durante 30 dias.

A aplicação do MSPFe seguiu o modelo de Hirano et al. (1995), com adaptações, na qual foi colocado papel alumínio na parte superior dos vasos para que a pulverização atingisse apenas a parte aérea da planta, sem atingir o substrato. A aplicação ocorreu dentro de uma câmara, visando maximizar a eficiência do nível de particulado fornecido neste experimento.

Todas as plantas foram submetidas à irrigação uniforme de água destilada (diariamente), em pH ideal (5,5-6,5), mantendo o substrato próximo à capacidade de campo. Porém, nos mesmos dias em que foram realizadas as aplicações do MSPFe, as plantas também foram submetidas a pH 3,0, via H₂SO₄, utilizando um pulverizador costal (83 ml min⁻¹ sob 4.0 kg cm⁻² de pressão). Duas vezes por semana, cada vaso foi regado com 50 mL de solução Clark, com ¼ de força iônica (Clark, 1975).

O experimento foi conduzido por 30 dias em incubadora BOD, e por 90 d.a.i em casa de vegetação. As atividades foram desenvolvidas de março a julho de 2019, totalizando 120 dias de experimento.

3.4 Parâmetros de crescimento

Para avaliação dos parâmetros de crescimento, foram mensurados a altura utilizando uma régua, o diâmetro do colo com auxílio de um paquímetro, a contagem do número de folhas, e a área foliar. Este último foi quantificado com um medidor de bancada modelo LI - 3100 LICOR (Lincoln, NE, USA). Após a coleta e repartição o material foi seco a 70 °C em estufa de circulação forçada de ar, por 96 horas, tempo considerado suficiente para estabilizar o peso das amostras. Em seguida foi efetuada a pesagem em balança analítica para a obtenção da biomassa seca da parte aérea e da raiz.

3.5 Porcentagem de colonização micorrízica

A porcentagem de colonização micorrízica das plantas foi mensurada após a coleta do experimento, conforme descrito por Koske e Gemma (1995) e Grace e Stribley (1991). A porcentagem do comprimento de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada conforme descrito por Giovanetti e Mosse (1980).

3.6 Análise nutricional da parte aérea e das raízes

Para a avaliação do conteúdo de nutrientes das plantas de aroeira foi realizada a repartição da parte aérea e das raízes. Inicialmente as plantas foram submetidas à secagem, em seguida foram moídas em moinho do tipo Willey, e então foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e devidamente identificados.

Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, no qual o nitrogênio foi determinado pelo método de Nessler (Jackson, 1965). Os outros nutrientes P, K, Ca, Mg, S, Fe, B, Zn, Mn, Cu e Ni foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta (Peters, 2005). O conteúdo de macronutriente foi obtido a partir da equação: Conteúdo (mg planta⁻¹) = Teor (g) x peso da massa seca da partição (g) x 1000/100. O conteúdo de micronutriente foi obtido por meio da equação: Conteúdo (µg planta⁻¹) = Teor (mg) x peso da massa seca da partição (g).

3.7 Parâmetros ecofisiológicos

A taxa fotossintética líquida (P_N : µmol CO₂ m²s⁻¹), a condutância estomática (g_s : mol m²s⁻¹), a taxa de transpiração (E : mmol m²s⁻¹), e a eficiência na carboxilação (P_N/C_i) foram avaliadas utilizando um analisador de gás de infravermelhos (IRGA, Infrared Gas Analyzer), modelo Li-6400 (Li-Cor, Biosciences Inc., Nebraska, EUA). As trocas gasosas da aroeira foram mensuradas em apenas

um dia. As folhas foram clipeadas com o auxílio de uma cuveta Parkinson com 2,5 cm² de área foliar conectada ao CIRAS-2.

A intensidade de cor verde das folhas (Índice SPAD) foi avaliada por meio do medidor portátil de clorofila, modelo SPAD-502 “Soil Plant Analyser Development” (Minolta, Japão), nas mesmas folhas e nos mesmos dias em que foram realizadas as medidas de trocas gasosas.

Quanto à fluorescência da clorofila, à eficiência quântica efetiva do PSII (F_v/F_0) e o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), estes foram determinados utilizando um fluorômetro de clorofila modulado (modelo OS5p; Opti-Sciences). A fluorescência da clorofila foi medida usando folhas totalmente expandidas sob condições de luz, sendo as mesmas folhas utilizadas na avaliação das trocas gasosas.

3.8 Parâmetros morfológicos da raiz

A análise da distribuição radicular foi realizada aos 120 dias após a semeadura, quantificando os parâmetros comprimento (CR, em cm), diâmetro (DMR, em mm), volume (VR, em cm³), e área superficial (ASR, em cm²) das raízes. Para a realização destas avaliações, o sistema radicular das plantas foi lavado cuidadosamente em água corrente, com o auxílio de peneiras de malha de 2 mm, para eliminação do solo aderido às raízes. Posteriormente, foram acondicionados em sacos plásticos, previamente identificados e levados à geladeira com temperatura de aproximadamente 4 °C.

As raízes de aroeira tiveram sua imagem digitalizada, utilizando o Scanner EPSON Expression 10000XL. Neste procedimento, utilizou-se uma cubeta com dimensões de 150 mm x 250 mm, previamente preenchida com água deionizada, onde as raízes foram distribuídas, sendo a quantificação das variáveis CR, VR, DMR e ASR, realizada por meio do *software* “WinRhizo”.

Para a análise da imagem pelo *software*, os dados foram considerados em dez classes de diâmetro: classe 1 ($\leq 0,5$ mm); classe 2 ($>0,5$ e $\leq 1,0$ mm); classe 3 (>1 e $\leq 1,5$ mm); classe 4 ($>1,5$ e ≤ 2 mm); classe 5 (> 2 e $\leq 2,5$ mm); classe 6 ($> 2,5$ e ≤ 3 mm); classe 7 (>3 e $\leq 3,5$ mm); classe 8 ($> 3,5$ e ≤ 4 mm); classe 9 (> 4 e $\leq 4,5$ mm); e classe 10 (diâmetro $> 4,5$ mm).

Através do *software* “WhinRhizo”, verificou-se que a ocorrência de raízes nas classes 3, 9 e 10 foram pouco frequentes. Assim, optou-se por agrupar e totalizar as raízes em duas subclasses, classificando-as em: raízes finas (diâmetro < 1,0 mm) e raízes grossas (diâmetro > 1,0 mm). Desta forma, mensurando-se o comprimento de raízes finas (CRF) em cm; comprimento de raízes grossas (CRG) em cm; área superficial de raízes finas (ASRF) em cm²; área superficial de raízes grossas (ASRG) em cm²; volume de raízes finas (VRF) em cm³; e volume de raízes grossas (VRG) em cm³.

3.9 Enzimas antioxidantes

A atividade da catalase (CAT) foi determinada seguindo a metodologia de Beutler (1975), utilizando quatro repetições de cada tratamento, para cada partição (folha e raiz). As amostras foram homogeneizadas em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo EDTA (5 mM), e centrifugadas a 15.000 × g por 15 min a 4°C. O meio de reação, 1 mL, continha tampão Tris-HCl (40 mM), pH 8,0, com EDTA (5 mM) e H₂O₂ (12 mM). A reação foi iniciada pela adição de 10 mL de extrato bruto. O consumo de substrato foi monitorado por 30 segundo a 240 nm. Sabe-se que, uma unidade de enzima é definida como a quantidade capaz de transformar 1 mol de substrato por minuto. A atividade da CAT foi expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína (U mg proteína⁻¹).

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada conforme Kar e Mishra (1976). A determinação da atividade da POX na folha e raiz envolveu: 125 µM de tampão fosfato em pH 6,8, 50 µM de ácido pirogálico, 50 µM de H₂O₂ e 1 mL do extrato enzimático diluído 20 vezes. Este extrato enzimático foi incubado durante 5 min a 25 °C, posteriormente, foi interrompida pela adição de 0,5 mL de H₂SO₄ a 5% (v/v). A quantidade de purpurogalina formada foi determinada tomando a absorvância a 420 nm. As atividades de peroxidase foram expressas em unidades de absorção.

3.10 Análise estatística dos dados

As informações obtidas foram submetidas à análise de variância e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.0.

4. RESULTADOS

4.1 Respostas no crescimento de plantas de aroeira submetidas ao MSPFe e inoculadas com ectomicorrizas

As plantas de aroeira inoculadas com o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* (isolado Pt-24) apresentaram um incremento significativo na altura (22,2%) e no diâmetro do colo (19,1%) das plantas sem o MSPFe comparadas aos seus respectivos controles ($P < 0,0001$; Figura 3A e 3B). Porém, não houve diferença significativa nestas variáveis quando inoculadas com *P. albus* (isolado ES-01) sem o MSPFe (Figura 4). Nas plantas com o MSPFe os fungos Pt-24 e ES-01 promoveram incremento na altura e no diâmetro do colo ($P < 0,0001$), quando comparadas ao seus respectivos controles, sendo um aumento na altura de 53,4% (Pt-24) e 16,5% (ES-01), e no diâmetro do colo 17% (Pt-24) e 15 % (ES-01), respectivamente. A presença do MSPFe provocou uma redução significativa na altura (12,4%) e no diâmetro do colo (11,8%), quando observadas as condições controle, sem e com o MSPFe. As plantas inoculadas com Pt-24 sem e com o MSPFe também sofreram redução na altura (4,6%) e diâmetro do colo (13,3%). No entanto, não houve diferença significativa nas plantas inoculadas com o ES-01 após a aplicação do MSPFe. Em ambas as exposições de MSPFe o *P. tinctorius* apresentou melhor resposta na altura e diâmetro do colo.

Detectou-se um aumento significativo no número de folhas nas plantas inoculadas com Pt-24 (16,2%) e ES-01 (5,6%), quando comparadas aos seus controles e na ausência do MSPFe, bem como, um aumento significativo desta característica na presença do MSPFe ($P < 0,0001$) das plantas com Pt-24 (42,2%) e

ES-01 (38,1%), em relação ao controle (Figura 3C). O estresse provocado pela aplicação do MSPFe reduziu o número de folhas das plantas controle (24,8%) e das plantas inoculadas com Pt-24 (10,3%).

Houve um aumento significativo na área foliar das plantas inoculadas com o micro-organismo Pt-24, comparadas aos controles em ambos os status de MSPFe, com aumento significativo (24,8%) na ausência do MSPFe e (26,6%) nas plantas tratadas com o MSPFe. Nos demais tratamentos não se detectou variações significativas, mostrando que o fungo *P. tinctorius* foi mais expressivo (Figura 3D e 5).

Observou-se um incremento significativo na MSPA nas plantas inoculadas com ES-01 em relação ao controle. Em condição sem o MSPFe o aumento foi de 87,9% ($P < 0,0001$), e com o MSPFe foi de 28,7% (Figura 3E). As plantas inoculadas com o Pt-24 apresentaram comportamento similar ao controle. As plantas do controle, sob estresse por particulado de Fe apresentaram um aumento significativo de 40,2% da MSPA.

A presença do fungo ectomicorrízico ES-01 provocou um aumento significativo de 121,5% na MSR, comparadas ao controle. Ao observar as raízes das plantas micorrizadas sem MSPFe, percebeu-se um incremento de 60,8% nas plantas com ES-01 em relação àquelas com Pt-24 ($P < 0,0001$; Figura 3F). Não houve diferença estatística entre os tratamentos das plantas com o particulado de Fe.

No geral, em ambas as condições de MSPFe as plantas inoculadas com Pt-24 apresentaram grande influência nos parâmetros de altura, diâmetro do colo, número de folhas e área foliar, enquanto o micro-organismo ES-01 apresentou maior influência na MSPA e MSR.

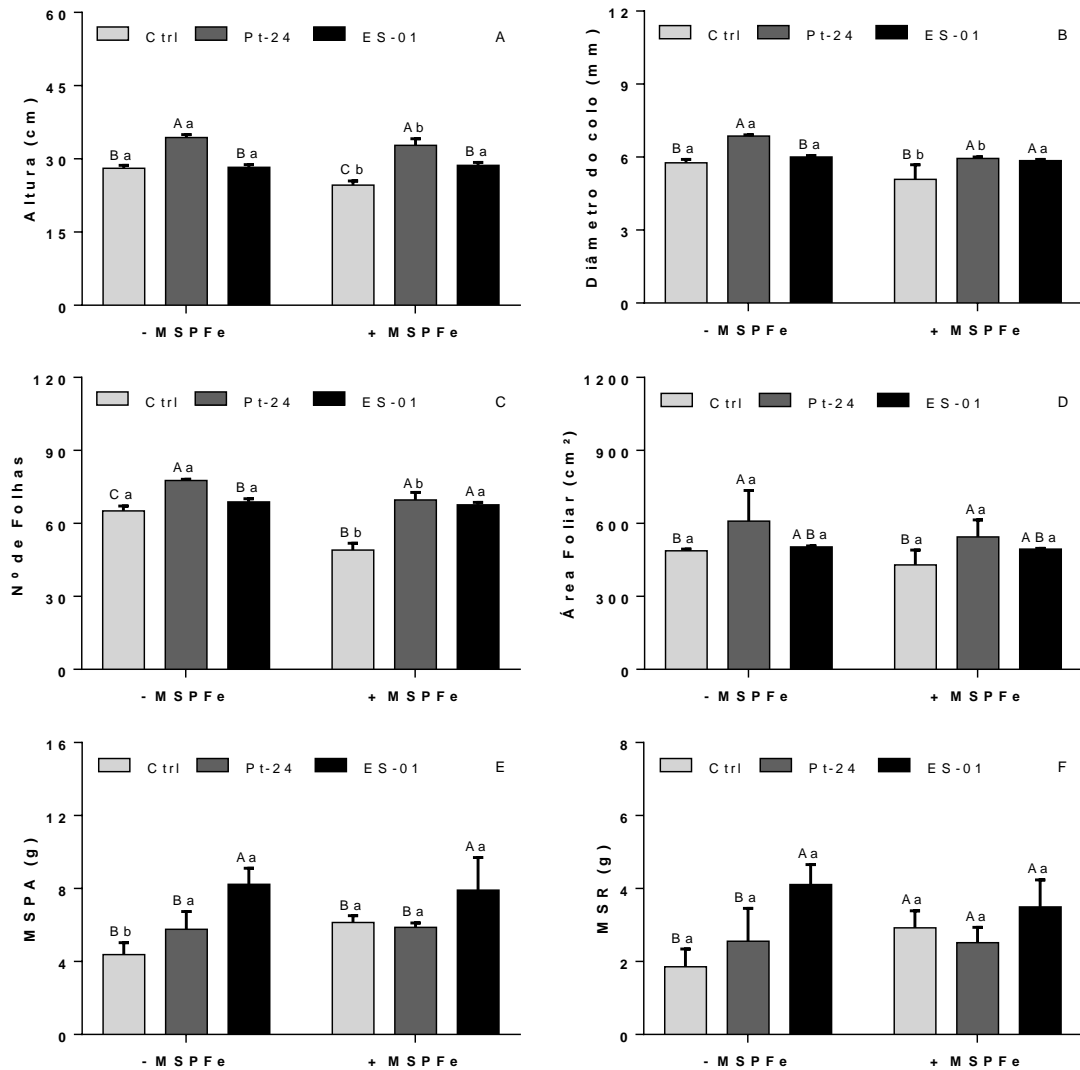


Figura 3. Altura (A), diâmetro do colo (B), número de folhas (C), área foliar (D), massa seca da parte aérea (E) e massa seca da raiz (F) de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.



Figura 4. Visualização frontal do experimento de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe, e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01).

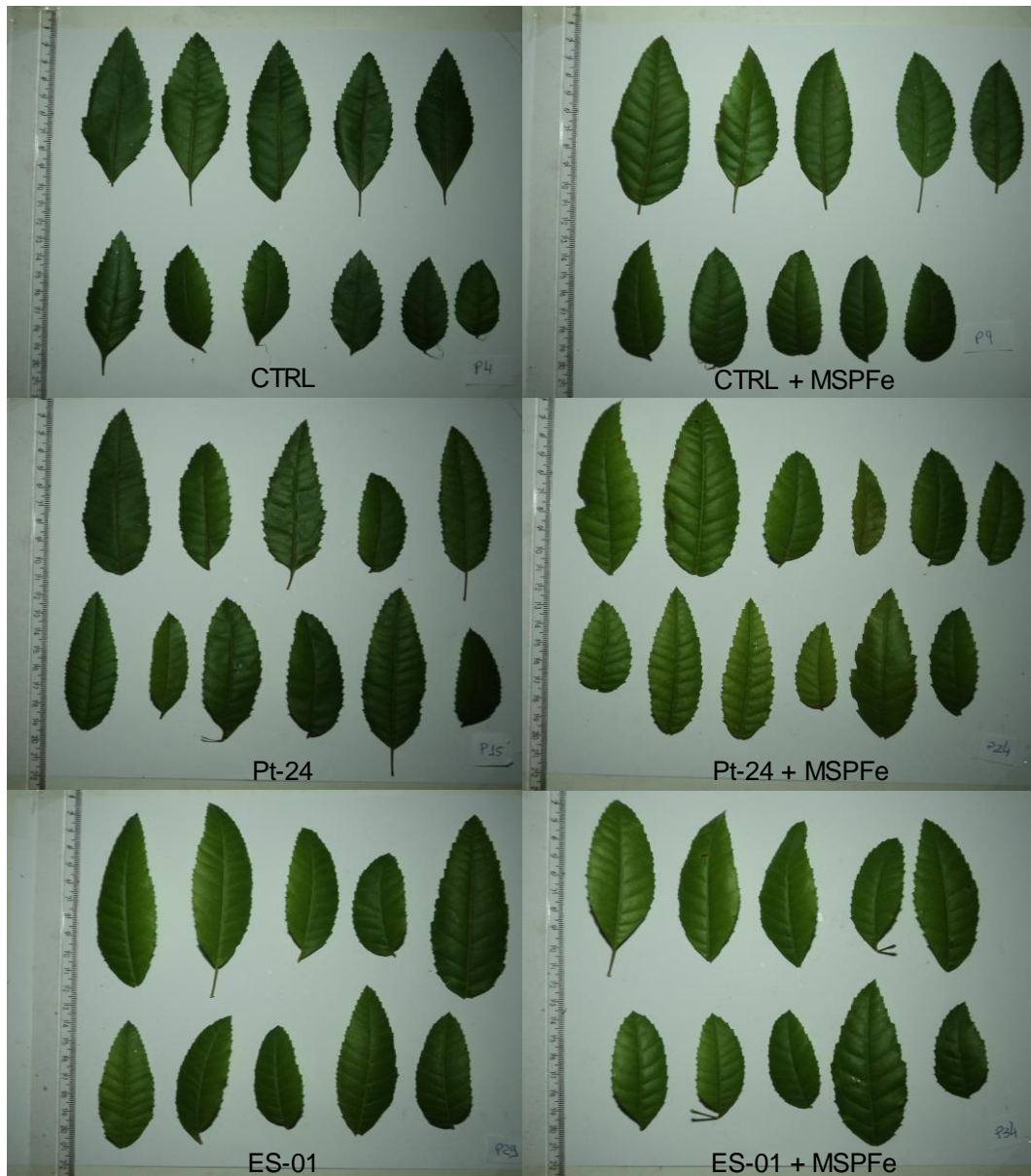


Figura 5. Visualização da área foliar de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe, e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01).

4.2 Porcentagem de colonização micorrízica

A porcentagem de colonização das raízes de aroeira aumentou significativamente nas plantas sem o MSPFe ($P < 0,0001$), porém não houve diferença significativa entre os isolados Pt-24 e ES-01 neste mesmo status de Fe (Figura 6). Observou-se também um aumento significativo no percentual de colonização em ambas as espécies do gênero *Pisolithus* nas plantas com o MSPFe ($P < 0,0001$).

Analisando as plantas com o isolado Pt-24 nas condições sem e com o MSPFe, observou-se uma redução significativa na porcentagem de colonização micorrízica de 14,46%, enquanto as plantas com o isolado ES-01 não sofreram influência com a aplicação do MSPFe (Figura 6).

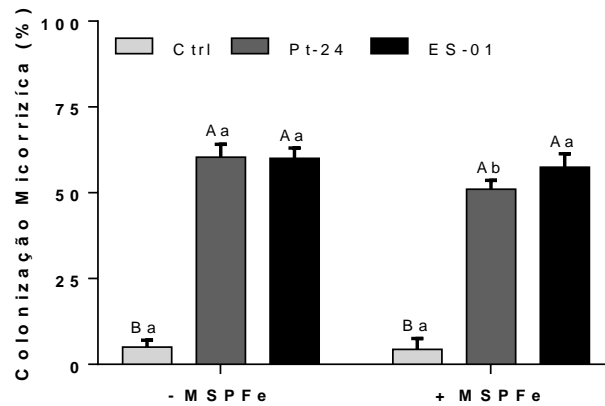


Figura 6. Porcentagem de colonização micorrízica em plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

4.3 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea e raiz

Nesta pesquisa foram analisados o conteúdo de macronutrientes, sendo estes, Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S) e micronutrientes, Ferro (Fe), Boro (B), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Manganês (Mn) e Níquel (Ni), sendo os macro e micronutrientes avaliados na parte aérea e nas raízes.

Todas as plantas submetidas à aplicação do MSPFe e sem inoculação apresentaram maior conteúdo de macro e micronutrientes, quando comparadas ao controle sem o particulado (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Observou-se um aumento significativo no conteúdo de macronutrientes na parte aérea ($P < 0,0001$) e raízes de todas as plantas inoculadas com o Pt-24 e ES-01, nas condições sem o MSPFe. Contudo, a inoculação com ES-01 mostrou uma maior influência no conteúdo de macronutrientes ($P < 0,0001$), exceto para o Ca

($P=0,0025$) e K ($P<0,0001$), nas raízes que tiveram maior influência quando inoculadas com Pt-24 (Figura 7 e 8).

Após submeter as plantas ao MSPFe foi observado na parte aérea e raízes, uma redução do conteúdo de macronutrientes das plantas inoculadas com Pt-24, com exceção do N, Ca e S nas raízes que aumentaram com a presença deste inóculo (Figura 7 e 8). Nestas condições percebeu-se reduções significativas somente para o conteúdo de N (15,2%), K (29,1%), Ca (43,2%), Mg (45%) e S (45,8%) na parte aérea e de K (17,3%) nas raízes. Na presença do MSPFe, as plantas com ES-01 apresentaram um aumento no conteúdo de N e P na parte aérea e uma redução no conteúdo de K, Ca, Mg e S para esta mesma partição, com significância somente para Ca (14%), Mg (16,1%) e S (29,1%). Entretanto, todas as plantas com MSPFe, e inoculadas com ES-01 incrementaram no conteúdo de macronutrientes nas raízes, com significância para N (31,8%), Ca (33,8%) e S (28,4%).

As plantas inoculadas, e em condição sem MSPFe, apresentaram um aumento no conteúdo de micronutrientes na parte aérea e nas raízes, exceto o Cu na parte aérea, que regrediu em conteúdo após a inoculação com Pt-24 e o Fe na raiz que reduziu em ambas as inoculações (Figura 9 e 10). Analisando a parte aérea, a inoculação com ES-01 nas plantas sem MSPFe possibilitou um maior e significativo conteúdo de micronutrientes, comparado ao Pt-24 com ($P=0,0123$) para Fe e ($P<0,0001$) para B, Cu, Mn, Zn e Ni. O fungo ES-01 aumentou exponencialmente o conteúdo dos metais Cu, Mn Zn e Ni na parte aérea das plantas sem o MSPFe. Nas raízes das plantas sem o MSPFe, o micro-organismo ES-01 obteve melhor resposta somente no Cu ($P<0,0001$), pois o conteúdo de B ($P=0,0025$), Mn ($P=0,0004$), Zn ($P=0,0014$) e Ni ($P<0,0001$) foram mais influenciados pela inoculação com Pt-24.

A aplicação do MSPFe causou um aumento significativo no conteúdo de Fe na parte aérea de todas as plantas, contudo, houve uma redução da toxidez de Fe nas plantas inoculadas, sendo esta redução de 39,7% nas plantas com Pt-24 e de 23,7% com ES-01 ($P<0,0001$; Figura 9A).

Houve uma redução no conteúdo de B da parte aérea nas plantas inoculadas e com MSPFe, com significância nas plantas inoculadas com Pt-24 (27,5%) ($P<0,0001$; Figura 9B). Essa redução também foi observada no conteúdo de Cu, em que a aplicação do MSPFe inibiu a absorção do Cu em todas as plantas

inoculadas, sendo esta inibição significativa de 56% nas plantas com Pt-24 e 25,6% em plantas com ES-01 ($P < 0,0001$; Figura 9C).

A presença dos fungos ECM Pt-24 diminuiu significativamente o acúmulo de Mn nas plantas com MSPFe (39,9% e $P < 0,0001$), porém as plantas inoculadas com ES-01 e com MSPFe apresentaram efeito contrário, com um aumento na absorção do Mn de 12,8% (Figura 9D).

O conteúdo de Zn e Ni na parte aérea diminuiu significativamente nas plantas micorrizadas e com MSPFe, com uma redução no conteúdo de Zn de 57,8% com o Pt-24 e de 37,6 com ES-01 ($P < 0,0001$; Figura 9E). Também ocorreu um decréscimo significativo no conteúdo de Ni de 63,6% nas plantas inoculadas com Pt-24 ($P < 0,0001$) e 16,8% quando inoculadas com ES-01 ($P = 0,0034$) (Figura 9F).

Não houve diferença significativa no conteúdo de Fe na raiz, porém o fungo ES-01 provocou pequenas reduções no acúmulo deste elemento nas plantas com MSPFe (Figura 10A). Nas plantas sem o MSPFe, o conteúdo de B, Cu, Mn, Zn e Ni aumentou após a inoculação com *P. tinctorius* e *P. albus* (Figura 10B, 10C, 10D, 10E e 10F). Não houve variações significativas no conteúdo de B e Mn nas raízes após a aplicação do MSPFe. A presença do fungo Pt-24 nas plantas com MSPFe reduziu o conteúdo de Cu, Zn e Ni, com significância estatística somente no conteúdo de Cu (26,5%), enquanto que o ES-01 reduziu o conteúdo de Cu e aumentou o Zn e Ni. Segundo a abundância relativa do conteúdo de micronutrientes analisado, obteve-se a seguinte sequência $Fe > Mn > B > Zn > Cu > Ni$.

No geral as plantas micorrizadas apresentaram uma resposta positiva no balanço nutricional, entretanto, com o isolado ES-01, as plantas de *S. terebinthifolius* mostraram-se mais estimuladas e com uma melhor resposta no conteúdo de macro e micronutrientes em ambas as partições (parte aérea e raiz) e nas condições com e sem o MSPFe.

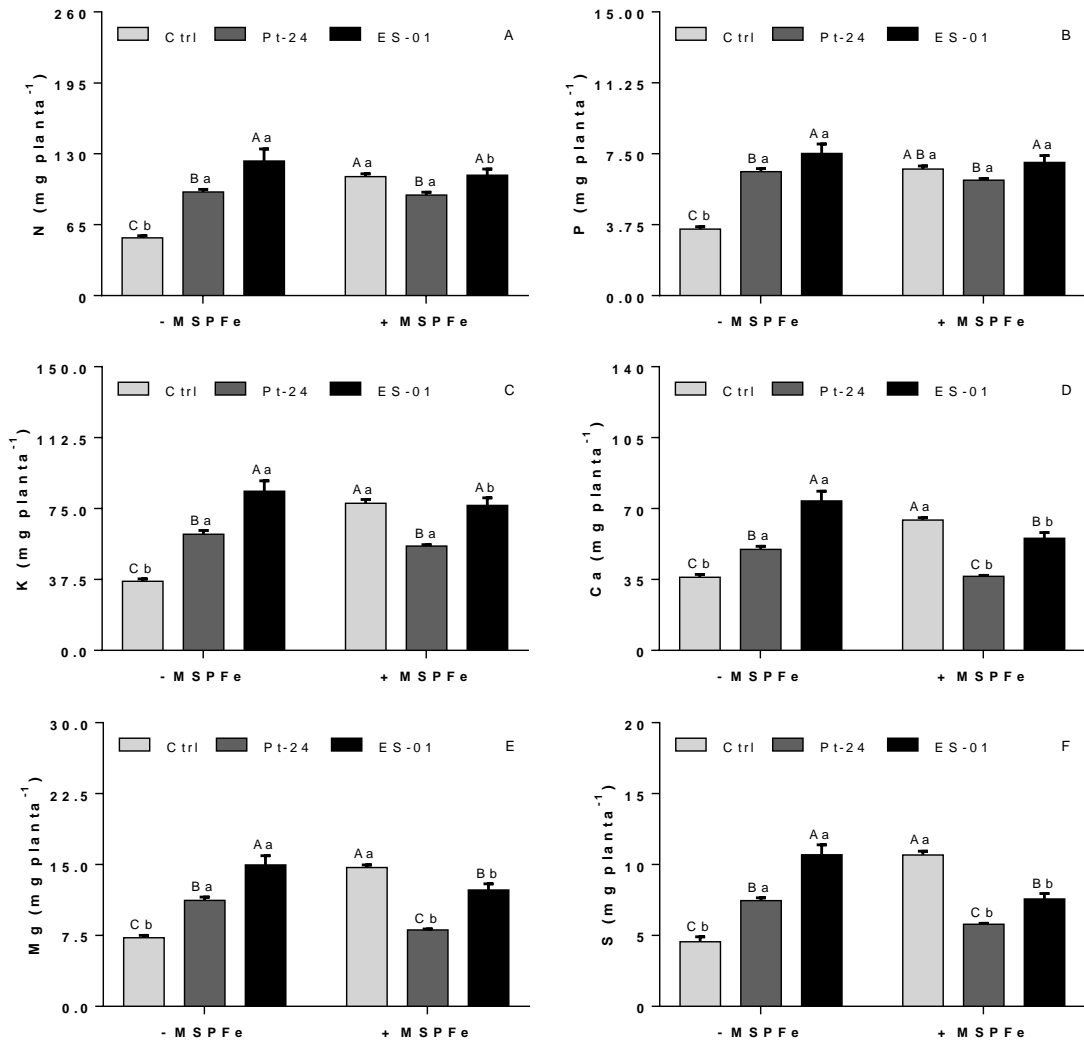


Figura 7. Conteúdo de macronutrientes na parte aérea de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

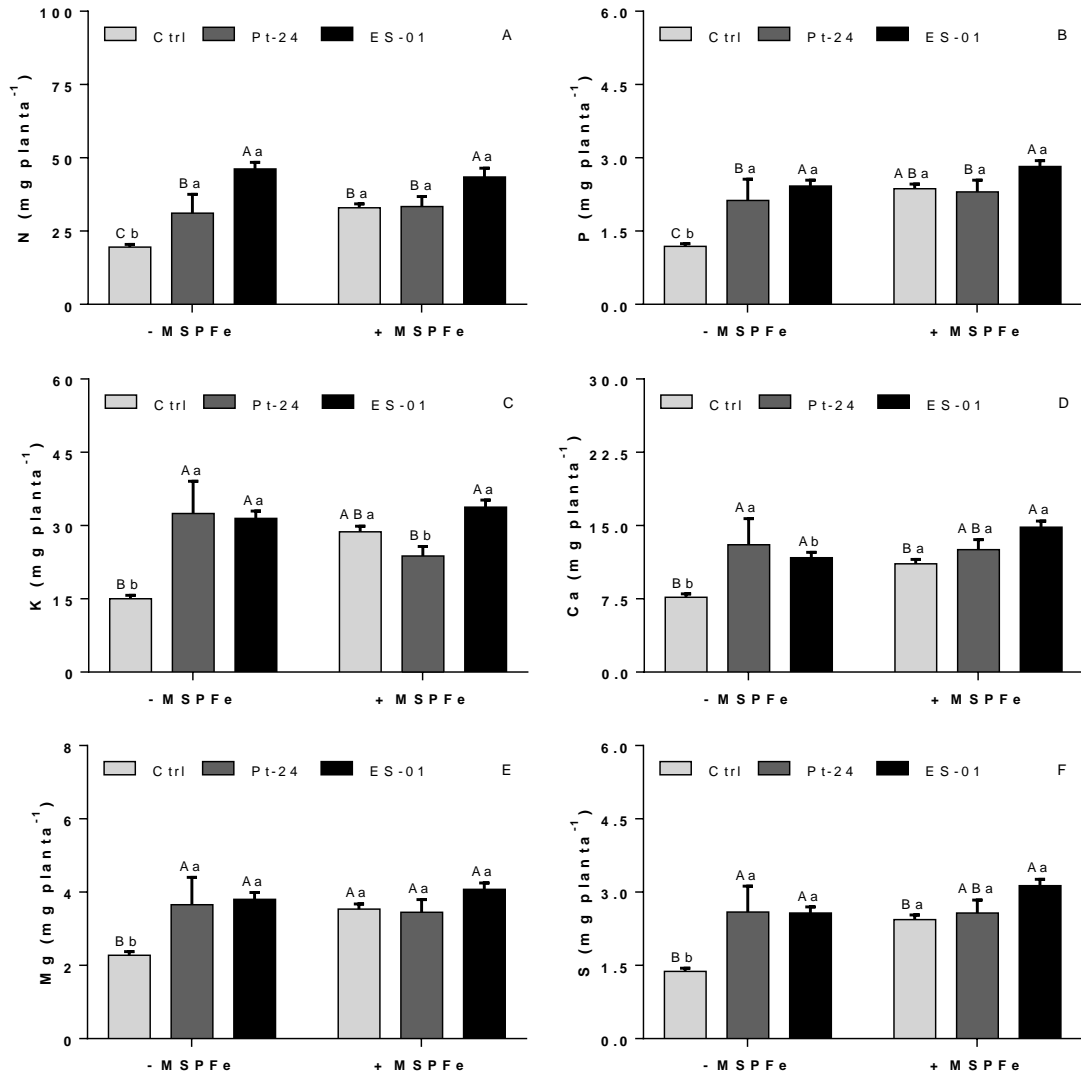


Figura 8. Conteúdo de macronutrientes na raiz de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

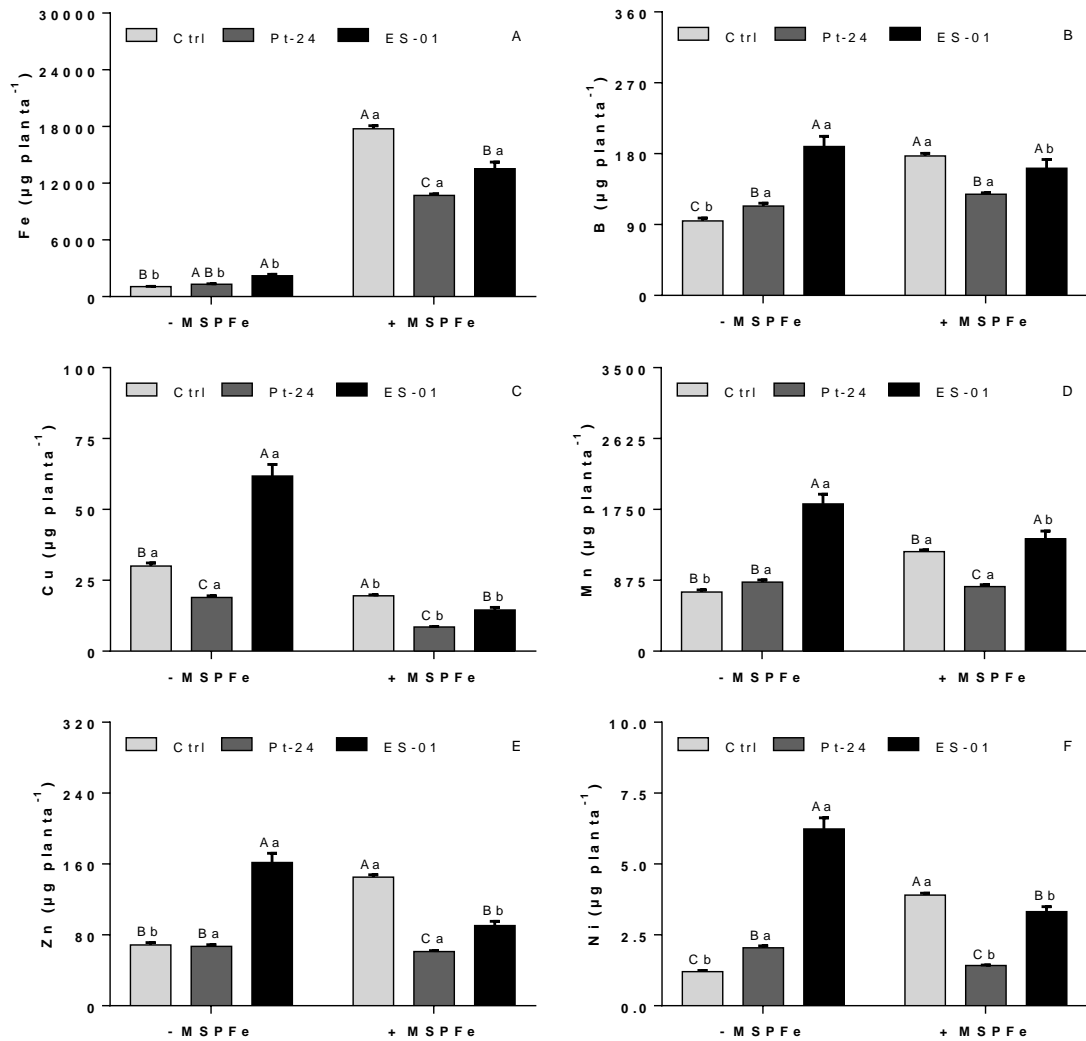


Figura 9. Conteúdo de micronutrientes na parte aérea de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

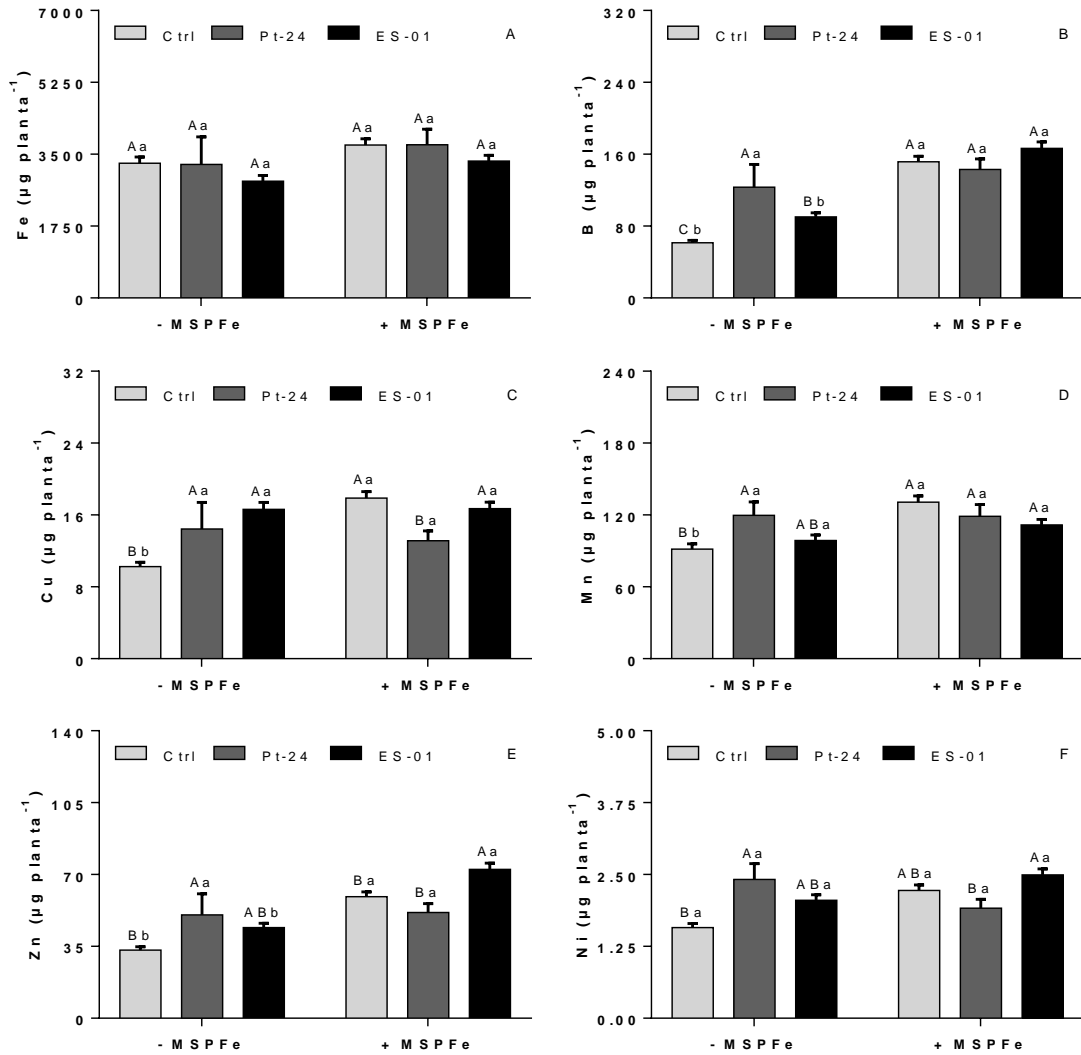


Figura 10. Conteúdo de micronutrientes na raiz de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

4.4 Respostas ecofisiológicas das plantas de areia

Na parte ecofisiológica do presente estudo foram mensurados os parâmetros de taxa fotossintética líquida (P_N), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E), eficiência na carboxilação (P_N/C_i), eficiência máxima do processo

fotoquímico no PSII (F_v/F_0) e rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) (Figura 11).

A P_N das plantas com o MSPFe aumentou significativamente 85,5% quando inoculada com Pt-24 ($P=0,0007$), e 93,6% quando inoculada com ES-01 ($P=0,0002$) em relação ao controle sem Fe. Nas plantas sem a toxidez de Fe houve um aumento significativo da P_N de 91,3% nas plantas com o micro-organismo ES-01 em relação ao Pt-24 ($P=0,0002$) (Figura 11A). Observou-se também um aumento significativo de 85,4% na P_N das plantas inoculadas com Pt-24 e sob condição de estresse por Fe, quando comparada às plantas com o mesmo micro-organismo e sem o MSPFe, evidenciando que o Pt-24 consegue aumentar representativamente a P_N das plantas de aroeira em ambiente contaminado com MSPFe.

As plantas expostas ao excesso de Fe tiveram um aumento significativo na g_s (110,4%) e E (85,2%) após a inoculação com ES-01 (Figura 11B e 11C). Os parâmetros g_s e E não apresentaram diferença significativas nas plantas sem o MSPFe e inoculadas com Pt-24.

Houve um aumento representativo na P_N/C_i de 98,1% nas plantas com o fungo ES-01, comparadas ao Pt-24 na ausência de MSPFe ($P=0,0002$; Figura 11D). Quando submetidas ao MSPFe, as plantas de aroeira apresentaram incremento na P_N/C_i de 90,5% quando inoculadas com Pt-24 ($P=0,0004$) e de 96,2% quando inoculadas com ES-01 ($P=0,0002$). Observou-se um incremento significativo de 94,2% na P_N/C_i das plantas com Pt-24 quando comparadas as duas condições de MSPFe.

Nos parâmetros de fluorescência da clorofila houve um aumento significativo na F_v/F_0 (23,1%) quando observadas as plantas controle com e sem o MSPFe e nas plantas com Pt-24 (17,3%), nas condições com e sem o MSPFe (Figura 11E). Houve um aumento no F_v/F_m de 3,7% quando aplicado o MSPFe nas plantas controle. Não havendo diferença estatística entre os demais tratamentos (Figura 11F).

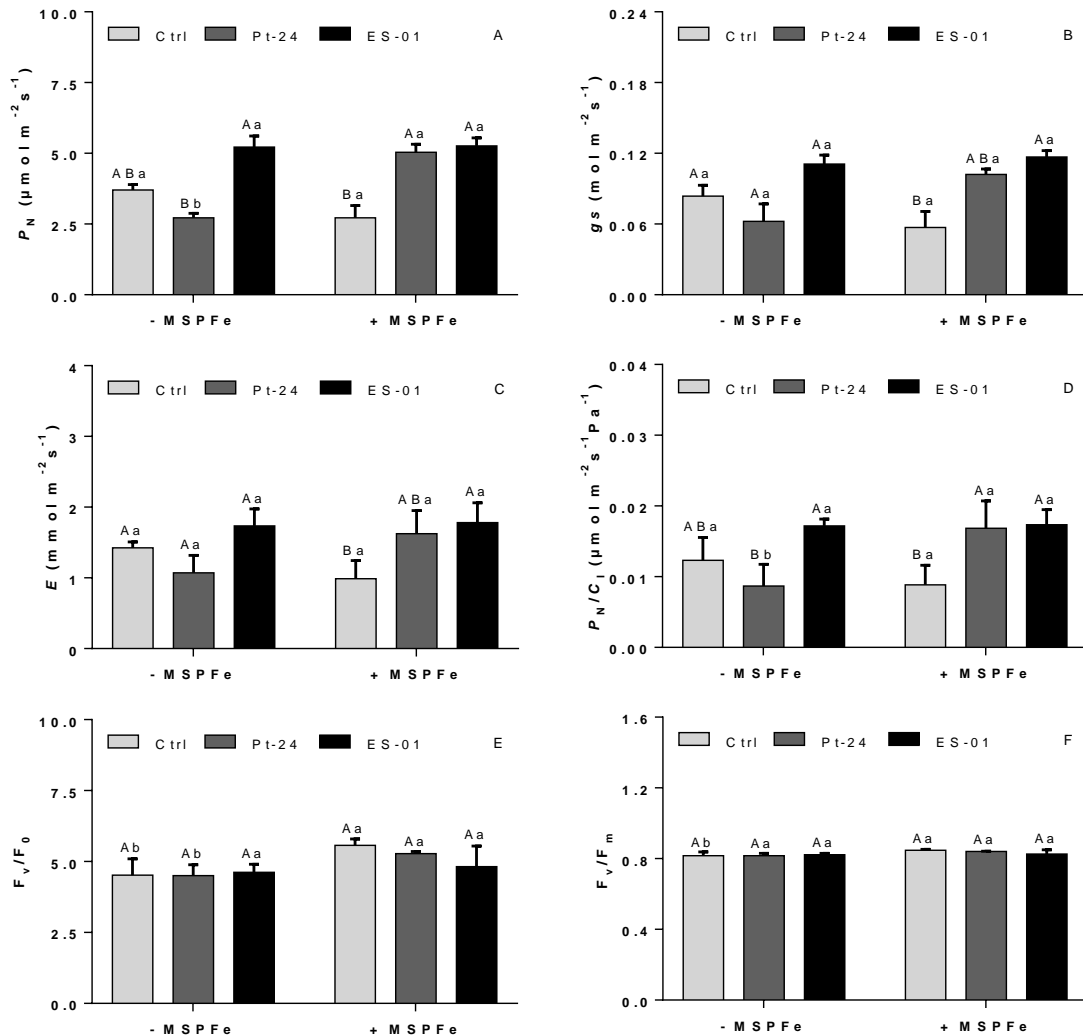


Figura 11. Taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C), eficiência na carboxilação (D), eficiência quântica efetiva do PSII (F_v/F_0) (E) e rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) (F) de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

O Índice SPAD aumentou significativamente ($P \leq 0,0001$) nas plantas inoculadas com Pt-24, quando comparadas às plantas controle. Nas condições sem o MSPFe houve um incremento de 26 % e com o MSPFe de 29,6% (Figura 12). A inoculação com ES-01 não influenciou significativamente na intensidade de verde. Ao submeter as plantas ao MSPFe houve uma redução significativa neste parâmetro em todas as plantas, quando comparadas as plantas sem o MSPFe. A

redução foi de 16,5% nas plantas controle, de 14,1% nas inoculadas com Pt-24 e de 25,1% nas plantas com ES-01. Neste experimento, a maior média desta variável foi observada nas plantas inoculadas com Pt-24 e sem o MSPFe, com índice SPAD de 40,7 e a menor média foi detectada nas plantas inoculadas com ES-01 com o MSPFe, com índice SPAD de 26,3.

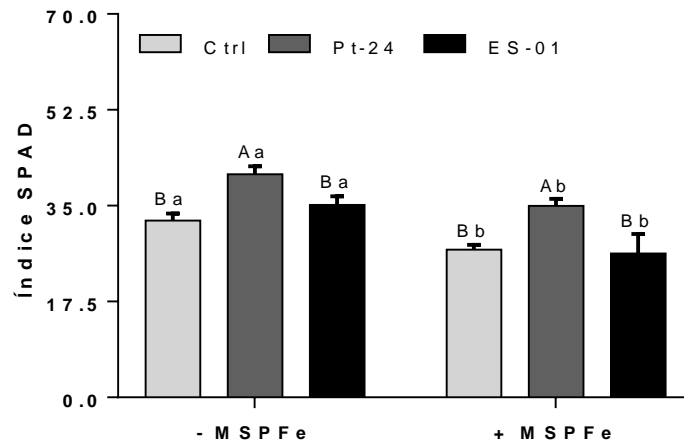


Figura 12. Intensidade de cor verde das folhas (Índice SPAD) de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

4.5 Atributos morfológicos das raízes

As características área superficial (ASR) e volume de raiz (VR) apresentaram diferenças significativas após a inoculação com *P. tinctorius* (Pt-24) e *P. albus* (ES-01), contudo observou-se um acréscimo maior destas variáveis nas plantas inoculadas com ES-01. O diâmetro médio radicular (DMR) das raízes apresentaram aumento significativo somente com ES-01 (Figura 13 e 14). Não houve diferença estatística no comprimento radicular (CR) (Figura 13A e 14).

Houve um aumento significativo na ASR e VR das plantas inoculadas com Pt-24 e ES-01, tratadas sem o MSPFe (Figura 13B e 13C). Na ASR este aumento correspondeu a 42,2% nas plantas com Pt-24 ($P=0,0384$), e 42,6% nas plantas micorrizadas com ES-01 ($P=0,0357$) (Figura 13B). O VR das plantas com Pt-24

aumentou ($P=0,0478$) em 72,5%, enquanto as raízes inoculadas com ES-01 incrementaram em 92,4% ($P=0,0060$) (Figura 13C). Detectou-se um aumento no VR das plantas com o MSPFe e com ES-01, porém não significativo.

Observou-se um aumento significativo de 36,2% no DMR ($P=0,0004$) das raízes inoculadas com ES-01, e sem a toxidez de metal pesado oriunda do MSPFe (Figura 13D). Quanto submetidas ao estresse do MSPFe, a presença das ectomicorrizas promoveram um acréscimo de 23,4% nas plantas tratadas com ES-01, em relação ao controle.

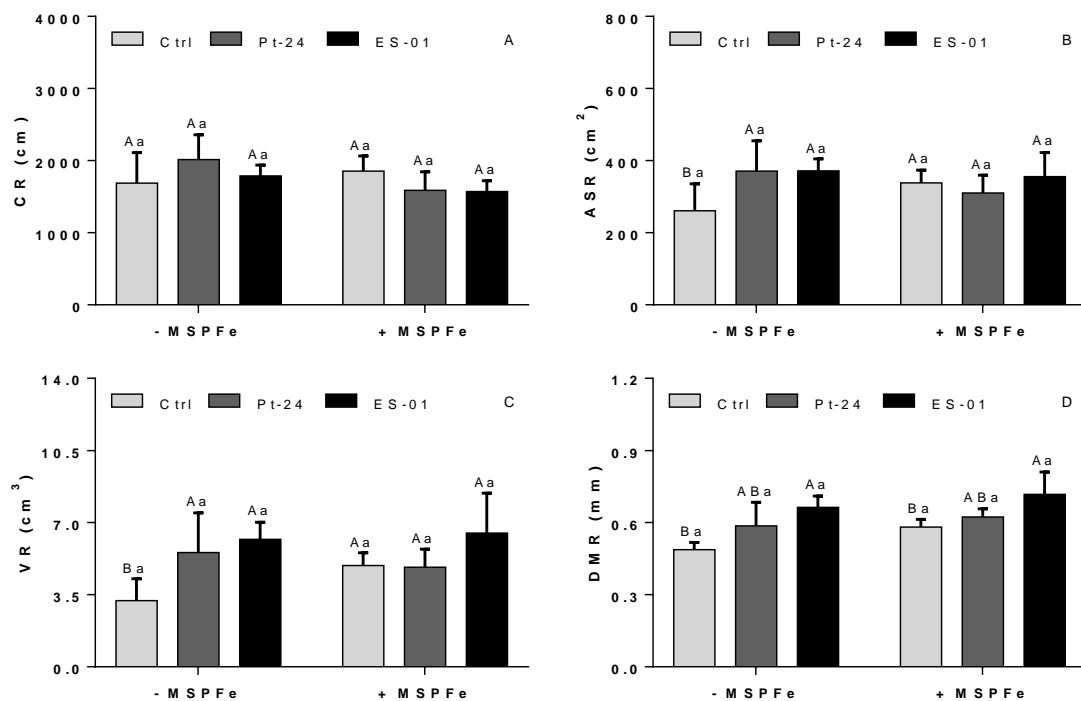


Figura 13. Comprimento radicular (CR) (A), área superficial radicular (ASR) (B), volume radicular (VR) (C) e diâmetro médio radicular (DMR) (D) de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P<0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

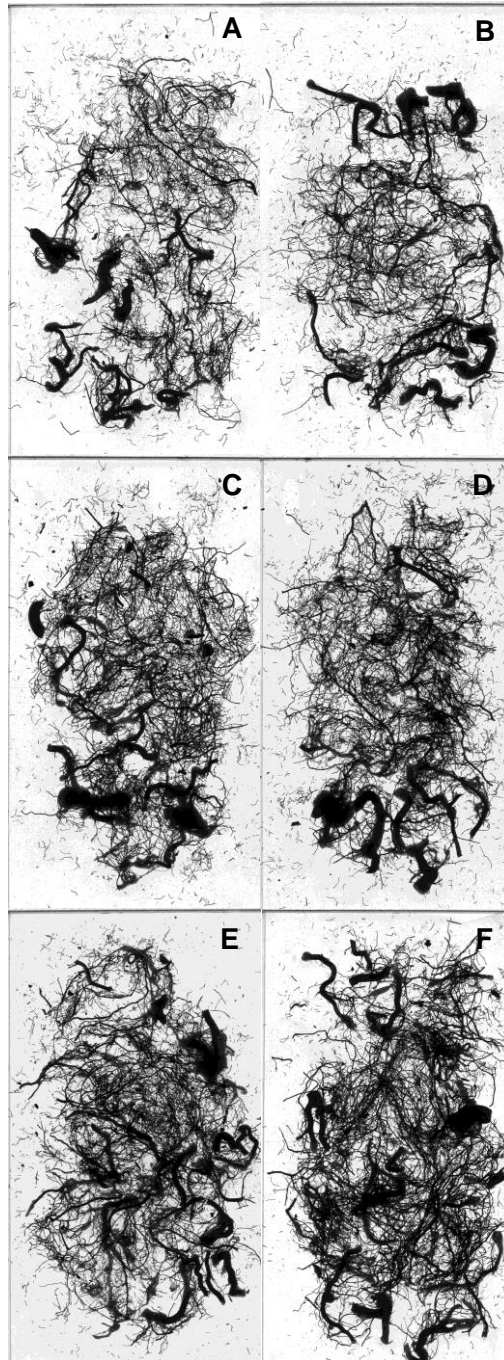


Figura 14. Scanner de raízes através do software “WhinRhizo” sendo Controle (A); Controle + MSPFe (B); Pt-24 (C); Pt-24 + MSPFe (D); ES-01 (E); e ES-01 + MSPFe (F) em plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01).

A determinação do comprimento, volume e área de raízes por classe de diâmetro foi realizada e classificada em: raízes finas (diâmetro <1,0 mm) e raízes grossas (diâmetro >1,0 mm).

Nesta pesquisa, a micorrização aumentou os atributos morfológicos das raízes sem o MSPFe. Houve aumento significativo no CRG de 82,4% (Pt-24) e de 97,4% (ES-01), na ASRG de 77,9% (Pt-24) e 110,8% (ES-01), e no VRG de 77% (Pt-24) e 132,8% (ES-01) das plantas micorrizadas sem o MSPFe (Tabela 2). As plantas com MSPFe e micorrizadas tiveram um aumento no CRG, ASRG e VRG e uma redução do CRF, ASRF e VRF, porém estas respostas não foram significativas estatisticamente.

Tabela 2. Comprimento de raízes finas (CRF), em cm; comprimento de raízes grossas (CRG), em cm; área superficial de raízes finas (ASRF), em cm²; área superficial de raízes grossas (ASRG), em cm²; volume de raízes finas (VRF), em cm³; volume de raízes grossas (VRG), em cm³, em plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01).

Atributos	- MSPFe			+ MSPFe		
	Controle	Pt-24	ES-01	Controle	Pt-24	ES-01
CRF	1568,9 Aa	1797,3 Aa	1551,1 Aa	1666,5 Aa	1396,2 Aa	1336,9 Aa
CRG	119,1 Ba	217,3 Aa	235,1 Aa	188,1 Aa	190,5 Aa	233,9 Aa
ASRF	145,6 Aa	180,6 Aa	157,3 Aa	169,8 Aa	144,1 Aa	144,9 Aa
ASRG	78,3 Ba	139,3 Aa	165,1 Aa	122,9 Aa	125,4 Aa	165,6 Aa
VRF	1,6 Aa	2,1 Aa	1,8 Aa	2,0 Aa	1,7 Aa	1,8 Aa
VRG	6,1 Ba	10,8 Aa	14,2 Aa	9,7 Aa	10,4 Aa	13,5 Aa

As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As linhas representam os valores médios de seis repetições.

4.6 Atividade das enzimas antioxidantes

Houve um aumento significativo de 63,23% na atividade da CAT nas folhas das plantas inoculadas com Pt-24 e + MSPFe, comparado às inoculadas com este simbionte, porém sem o particulado (Figura 15A). Os fungos ECM aumentaram a atividade da CAT das plantas sob excesso de metal pesado, porém este aumento não foi significativo.

A atividade da CAT nas raízes apresentou efeito contrário à CAT na folha. Após a aplicação do MSPFe nas plantas com Pt-24, a atividade da CAT nas raízes

reduziu significativamente (60,46%) (Figura 15B). De modo geral, houve uma redução na atividade da CAT nas raízes das plantas submetidas ao excesso de Fe.

Verificou-se uma redução significativa na atividade da POX nas folhas das plantas inoculadas e sem o MSPFe, sendo esta redução de 56,6% para Pt-24 e 26,6% para Es-01 (Figura 15C). Todas as plantas inoculadas, submetidas ao MSPFe, apresentaram uma maior atividade na POX das folhas, com uma diferença significativa de 81,4% nas plantas com ES-01, comparado ao controle. Ao comparar as plantas com e sem o MSPFe, detectou-se diferença significativa nas plantas controle, que reduziram a atividade da POX em 52,2% com a aplicação do Fe, e as plantas com Pt-24 aumentaram em 98,1%, após a aplicação deste particulado. Não houve diferença significativa nas plantas com ES-01 sem e com o MSPFe.

Nas plantas ausentes de MSPFe, a atividade da POX nas raízes reduziu em 23,4% com a inoculação ES-01 comparado ao controle (Figura 15D). As plantas expostas ao MSPFe também reduziram a sua atividade após a inoculação, sendo 31,7% nas plantas com Pt-24 e 48,1% nas plantas com ES-01. Observando as plantas do controle, em ambos os status de MSPFe, a atividade da POX aumentou significativamente (81,5%).

No geral, a atividade de enzimas antioxidantes foi maior nas raízes, todavia, as plantas com MSPFe e micorrizadas aumentaram a atividade das enzimas nas folhas e diminuíram nas raízes.

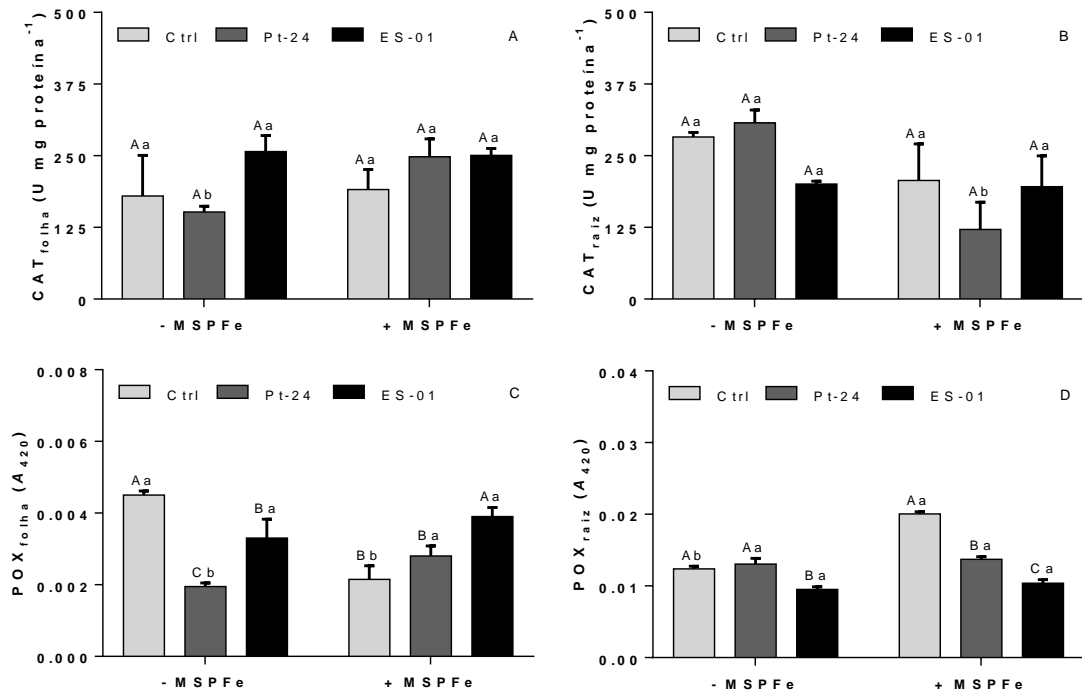


Figura 15. Atividade da catalase na folha (A), catalase na raiz (B), peroxidase na folha (C), e peroxidase na raiz (D) de plantas de *S. terebinthifolius* Raddi submetidas ao MSPFe e inoculadas com *P. tinctorius* (isolado Pt-24) e *P. albus* (isolado ES-01). As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos micorrizados e não micorrizados, sob a mesma exposição de MSPFe; e as letras minúsculas entre as duas exposições de MSPFe e sob mesma micorrização, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,05$). As colunas representam os valores médios de seis repetições, e as barras representam o desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

A simbiose com os fungos ECM melhorou o crescimento das plantas, em condição sem e com estresse provocado pela deposição de MSPFe. Este fato pode estar relacionado às plantas inoculadas com os fungos ECM liberarem moléculas complexadoras de metal como tióis livres e ácido oxálico, que atuam na regulação e desintoxicação de metais, reduzindo, dessa forma, os efeitos da toxidez de Fe provocada pelo MSPFe (Jourand et al., 2014).

O aumento nas variáveis altura, diâmetro do colo, número de folhas, área foliar massa seca da parte aérea e massa seca de raízes das plantas inoculadas, podem estar relacionados às melhorias na absorção de água e nutrientes provocada pelos micro-organismos promotores do crescimento vegetal (Dalong et al., 2011; Ruscitti et al., 2011). O aumento no diâmetro do colo é benéfico, uma vez que, é considerado um indicador do padrão de qualidade das mudas, minimizando as possibilidades de tombamento destas após o plantio. Dessa forma, o incremento do diâmetro do colo provocado pela inoculação ectomicorrízica possibilita maior sobrevivência das mudas após o plantio (Weirich, et al. 2018), mesmo sob efeito do MSPFe, como descrito por Turjaman et al. (2005), em que as mudas de *Shorea pinanga* inoculadas com esporos de *P. arhizus* e *Sclerotium* sp. apresentaram maior diâmetro do colo.

Para Smith e Read (2008), a simbiose pode aumentar a altura, número de folhas emitidas pela planta e a área foliar, por meio da influência direta exercida nas trocas gasosas. Slama et al. (2012) observaram um aumento na altura e número de folhas de *Helianthemum sessiliflorum* micorrizada com *Terfezia boudieri*, conforme reportado nesta pesquisa.

O incremento na MSPA e MSR das plantas micorrizadas está atribuído ao desenvolvimento ectomicorrízico. A inoculação com o gênero *Pisolithus* alterou a morfologia da raiz, possivelmente por ter estimulado a produção de raízes laterais, fornecendo, desta forma, maior aporte de água e nutrientes, aumentando a biomassa vegetal (Costa et al., 2010), conforme indicado por Jourand et al. (2014), em estudos com *Acacia spirorbis* e *Eucalyptus globulus* inoculados com *P. albus* em solo contaminado. Nesta mesma pesquisa os autores observaram melhorias no crescimento das plantas com aumentos na biomassa da parte aérea e da raiz.

Tratando-se dos aspectos nutricionais, sabe-se que as plantas micorrizadas são beneficiadas pelos fungos ectomicorrízicos, pois os nutrientes absorvidos pelas micorrizas se acumulam nos tecidos do fungo, e posteriormente podem ser transportados para a planta. Neste processo os nutrientes mais absorvidos pelos fungos micorrízicos são especialmente o N, P e K (Begum et al., 2019).

A presença dos fungos ECM modifica a absorção de N na solução do solo, aumentando sua absorção, uma vez que o N passa a ser absorvido na forma de amônio (N-NH_4^+), pois este íon é a forma de N inorgânico mais facilmente utilizável por fungos ECM. Neste sentido, sugere-se que houve um aumento na capacidade de captação de N-NH_4^+ das raízes micorrizadas, conseqüentemente contribuindo de forma quantitativa e qualitativa para a nutrição nitrogenada das plantas (Selle et al., 2005; Makarov, 2019). Este comportamento foi observado também nas plantas inoculadas e sob estresse do MSPFe, exceto para *P. tinctorius* na parte aérea, evidenciando a melhor atividade do inóculo de *P. albus* para aquisição de N.

O P associado à micorrizas possui alta correlação, uma vez que, a absorção de P é difundido pelas hifas até a rede de Hartig por meio de P_i , utilizando transportadores específicos dos fungos (Becquer et al., 2014; Garcés-Ruiz, 2017). Esta correlação é explicada pela característica micorrízica de aumentar a relação de crescimento da planta com os nutrientes de baixa mobilidade, e que se movem por difusão, como o P, Zn, Cu e N na forma de íon amônio (Marschner, 2012; Balliu et al., 2015). A inoculação com *P. albus* em plantas com particulado de ferro conseguiu aumentar o acúmulo de P, sugerindo que este inóculo consegue ter mais eficiência de absorção e distribuição de P na planta.

O aumento no conteúdo de K nas plantas micorrizadas e o conteúdo quantificado após a aplicação do MSPFe podem estar associados às melhorias na absorção de P, pois o incremento na absorção de K, e a sua atividade aprimorada

de transportador em plantas micorrizadas, pode ter efeito indireto, atribuindo a melhor condição nutricional em P. Normalmente o P limita o crescimento e desenvolvimento das plantas devido à sua baixa disponibilidade natural no solo, uma vez que incrementa o valor de K, a absorção do N e a *gs* também é beneficiada, pois o K está envolvido na fase final do metabolismo do nitrogênio e na alteração da abertura estomática (Xu et al., 2002; Begum et al., 2019; Ragel et al., 2019).

Logo, a disponibilidade do N, P e K na planta e a adequada proporção entre eles, são fatores importantes nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. Gandini et al. (2015) observaram um aumento no nível de N, P, K em *Eucalyptus urophylla* inoculando com *Amanita muscaria*, *Elaphomyces antracinus*, *Pisolithus microcarpus* e *Scleroderma areolatum*, assim como nesta pesquisa.

O conteúdo de Ca e Mg foram elevados em todas as plantas micorrizadas sem MSPFe, e nas raízes com MSPFe. Porém, este aumento foi maior no conteúdo de Ca. Este comportamento está associado à localização elementar dos nutrientes captados pelo fungo, em que as hifas absorvem e proporcionam altos teores de Ca, visto que fica contido inicialmente na parede celular fúngica, e em seguida, é fornecido à planta, enquanto que, o Mg fica acumulado no vacúolo dos fungos, para posterior absorção pela planta (Wallander et al., 2002; Seven e Polle, 2014). As micorrizas aumentando o conteúdo de Mg, influenciam no teor de clorofila, pois o Mg constitui o átomo central da clorofila, e dessa forma, este elemento possui correlação com a intensidade de verde na planta. No geral, as ectomicorrizas têm um papel importante na absorção de Ca e Mg e dos micronutrientes, já que o diâmetro das hifas permite o acesso aos microporos do solo, favorecendo a absorção (Jentschke et al., 2000).

Resultados semelhantes foram reportados por Egerton-Warburton (2015), que observou um aumento no conteúdo de N, P, Ca, Mg e K em mudas de *Eucalyptus*, inoculadas com *Pisolithus* sp.

As plantas micorrizadas com os dois fungos do gênero *Pisolithus* aumentaram o conteúdo de S na parte aérea e raízes das plantas sem o MSPFe. Possivelmente isso ocorreu devido à influência fúngica em uma maior incorporação deste elemento às proteínas e à auto-regulação na absorção de íons (KOPRIVA, 2006; Pandurangan et al., 2015), sugerindo que os fungos ECM promoveram uma

maior eficiência no uso de S. Entretanto, com o fornecimento do MSPFe às plantas, o aumento no conteúdo de S foi observado somente nas raízes.

Nas plantas com o MSPFe, o aumento do conteúdo de macronutrientes (K, Ca, Mg e S na parte aérea) das plantas sem micorrização, em comparação àquelas com os fungos ECM. O aumento do conteúdo de macronutrientes nas raízes micorrizadas das plantas com particulado de Fe, evidenciaram que além do benefício quantitativo no crescimento, as plantas micorrízicas lucraram com uma melhoria qualitativa na nutrição mineral (em particular o conteúdo de macronutrientes das raízes de todas as plantas com MSPFe inoculadas com *P. albus*). Silva et al. (2007), trabalhando com *Pisolithus* sp. em plantas de *Eucalyptus grandis* observaram um aumento no teor e na eficiência de uso do P, K, Ca e Mg.

O aumento no conteúdo de micronutrientes na parte aérea e raízes de plantas inoculadas e sem o MSPFe é atribuído à melhor relação fungo-planta, contudo, no geral, a quantificação do conteúdo de micronutrientes foi maior na parte aérea da planta, possivelmente atribuído à mobilidade dos próprios micronutrientes e à atividade metabólica (Bati et al., 2015), em que estes micronutrientes possuem papel essencial em vários sistemas enzimáticos e ações relacionadas à produção de energia, síntese de proteínas, constituinte de proteínas, síntese de clorofila, regulação do crescimento, atividade no aparato fotossintético e outros (Tripathi et al., 2015; Sidhu et al., 2019).

Em relação ao conteúdo de Fe, nas plantas com MSPFe os fungos ECM conseguiram minimizar os efeitos do excesso deste metal, possivelmente devido à relação simbiótica alterar a compartimentação subcelular e as formas químicas de metais pesados nas plantas (Huang et al., 2017). Resultados semelhantes foram reportados por Bati et al. (2015), em plantas de *Ascolana tenera* e *Nocellara del Belice* com micorrizas, em que o efeito protetor induzido pelos fungos contra a alta concentração de metais pesados foi atribuído à diluição do metal no tecido da planta e como resultado, um maior crescimento e melhor mecanismos de imobilização e retenção.

O conteúdo de B na parte aérea não variou nas plantas com Pt-24, nas plantas com e sem o MSPFe, em ambas as partições. Contudo, o fungo ECM ES-01 influenciou reduzindo o B na parte aérea e aumentando sua absorção na raiz, evidenciando uma possível influência intraespecífica (Glen et al., 2001; Kernaghan

et al., 2003), sugerindo que o ES-01 conseguiu uma melhor resposta na presença do estresse.

O conteúdo de Cu foi reduzido com a aplicação do MSPFe na parte aérea, assim como também, mesmo o MSPFe possuindo uma alta concentração de Mn, o alto conteúdo de Fe na parte aérea influenciou na absorção do Mn causando uma redução deste elemento. Esta redução nos micronutrientes é explicada pelo comportamento antagonista existente entre Cu x Fe e Mn x Fe, pois estes nutrientes competem pelo mesmo transportador (proteínas que transportam os íons metálicos), como observado por Ghasemi-Fasaei e Ronaghi (2008), em plantas de *Triticum aestivum* L. var. Ghods. Somado a isto, de acordo com Dučić et al. (2012), concentrações mais altas de P no tecido podem ter facilitado a precipitação interna de Mn em planta micorrizadas, reduzindo-o.

É válido ressaltar que a simulação da chuva ácida, influenciou na absorção do Fe, Cu, Mn, Zn e Ni, haja visto que, estes micronutrientes possuem um grau de disponibilidade maior em pH ácido ($\text{pH} < 5,0$) (Souza et al., 2007).

A redução do conteúdo de Zn e Ni na parte aérea das plantas micorrizadas e com MSPFe, pode estar associada à mobilidade moderada destes micronutrientes (Marschner, 2012). Contudo, a absorção de Zn pode também estar vinculado à contribuição do uso efetivo do Zn, via fungo micorrízicos, ser maior para a planta quando esta é submetida à deficiência de Zn (Coccina et al., 2019), como relatado por Watts-Williams et al. (2015) em plantas de *Solanum lycopersicum* L. micorrizadas em ambiente contaminado por Zn.

Os metais Cu, Mn, Zn e Ni nas raízes reduziram possivelmente devido ao fato de os fungos micorrízicos precipitarem e quelarem os metais advindos da solução do solo, quelando-os fora do micélio se dá por meio da produção de vários ácidos orgânicos e enzimas, pigmentos e a glicoproteína glomalina (Gonzalez-Chavez et al., 2004; Amir et al., 2014; Shakeel e Yaseen, 2015). Porém este comportamento não foi observado no conteúdo de Zn e Ni das plantas inoculadas com ES-01, sugerindo que atividade do fungo ES-01 no processo de captura e transferência de nutriente no sistema solo-fungo-raízes teve maior influência metabólica comparado ao Pt-24.

O aumento na P_N , gs , E e P_N/C_i das plantas com os fungos ECM Pt-24 e ES-01, e sob condição de estresse, está possivelmente relacionada ao fato de os micro-organismos do gênero *Pisolithus* minimizarem o efeito da toxicidade de Fe

nas plantas, evitando o comprometimento da partição de energia luminosa e o dano oxidativo (Pinto et al., 2016). Na ausência dos micro-organismos a superprodução das espécies reativas de oxigênio, a partir da toxicidade de metais pesados, provavelmente iria deteriorar o sistema intrínseco de defesa antioxidante das células e causar estresse oxidativo, e, conseqüentemente, interferir negativamente nas trocas gasosas (Shahid et al., 2014).

A variação nas trocas gasosas, em função do inóculo fúngico nas plantas sem o MSPFe, pode ser explicada pela afinidade existente entre fungo e planta (Mello e Balestrelli, 2018). Neste trabalho o fungo *P. albus* mostrou-se mais compatível com as mudas de *S. terebinthifolius*, expressando maior P_N , g_s , E e P_N/C_i . Nguyen et al. (2006) descreveram que há uma influência direta entre fungo ectomicorrízico e as trocas gasosas, assim como nesta pesquisa.

O desenvolvimento ectomicorrízico aumenta a superfície de absorção da raiz, por meio das ramificações das hifas. Essas alterações provocadas pelas extensões das hifas permitem maior condutividade hidráulica, disponibilidade de água e nutrientes como o N, P e K, e, conseqüentemente, aumentam a g_s e influenciam a P_N , E e P_N/C_i (Chandrasekaran et al., 2019), o aumento da g_s indica aumento do P_N (Sebastiana et al., 2013), sugerindo que o aumento da g_s tem um papel importante no incremento da P_N das plantas submetidas ao estresse do excesso de Fe. Estas alterações no aparato fotossintético são reguladas pela capacidade da RuBP C/O de fixar o CO₂, e pela capacidade de regenerar o RuBP (Farquhar et al., 1980; Farquhar e Sharkey, 1982), que sob condição de estresse podem ser influenciadas positivamente pelas ectomicorrizas.

Choi et al. (2005) trabalhando com *Pinus densiflora* inoculado com *P. tinctorius* detectaram uma resposta fisiológica vigorosa para os parâmetros P_N e P_N/C_i . Sebastiana et al. (2013) observaram um aumento na P_N , g_s , E e P_N/C_i em *Quercus suber* L. inoculada com *P. tinctorius*. Shi et al. (2017) verificaram que o basidiomiceto *Pisolithus* sp. incrementou a P_N em *Pinus thunbergii*, bem como, Plett et al. (2014) observaram um aumento na P_N de *Eucalyptus grandis* inoculado com *Pisolithus* sp.

A nível fisiológico, a medição dos parâmetros de fluorescência da clorofila (F_v/F_0 e do F_v/F_m) são úteis e eficazes para avaliar o status fotossintético das plantas, sob condições de estresse por metais pesados (Sbihi et al., 2012).

Neste estudo, mesmo com o aumento da F_v/F_0 e do F_v/F_m observado nas plantas com o particulado de Fe e sem o fungo ectomicorrízico, verificou-se que todas as plantas mantiveram-se próximas dos valores da F_v/F_0 e F_v/F_m considerados ótimos, sendo estes entre 4 e 6 para a F_v/F_0 e 0,83 para o F_v/F_m (Bjorkman e Demmig, 1987; Zanandrea et al., 2006). Estes resultados mostram que o estresse (MSPFe) não causou danos fotoinibitório representativos nas plantas de *S. terebinthifolius*, ou seja, as plantas conseguiram manter uma conversão de energia efetiva.

O aumento do índice SPAD detectado nas plantas com os fungos ectomicorrízicos pode estar associado ao fato de que os fungos micorrízicos beneficiam as plantas com o fornecimento de água e nutrientes, influenciando a atividade fotossintética, clorofila e o fornecimento de nutrientes como N, P e K (Mathur e Vyas, 2000; Plett et al., 2014). Segundo Xiong et al. (2015), o índice SPAD é altamente correlacionado ao teor de clorofila na folha, sendo possível identificar também o desbalanço nutricional. Nesta pesquisa o basidiomiceto Pt-24 apresentou uma maior correlação com a intensidade de verde comparado ao ES-01.

A presença do MSPFe diminuiu o Índice SPAD de todas as plantas. Este fato pode estar relacionado ao excesso de Fe, e às condições ácidas do solo. Nestas condições ocorre a redução da disponibilidade de recursos para a planta, acarretando alterações no teor de N, declínios no crescimento, e concentrações reduzidas de clorofila (Chatterjee et al., 2006; Odiyi e Bamidele, 2013). Contudo, mesmo com as reduções no índice SPAD para as plantas sob estresse, as plantas inoculadas com *P. tinctorius* mostraram-se resistente ao estresse quando comparadas às inoculadas com *P. albus*. Hendrix et al. (1985) relataram em seus estudos que o fungo *P. tinctorius* apresenta bom crescimento em ambientes ácidos, assim como nesta pesquisa. Maltz et al. (2019) descreveram que a inoculação *P. tinctorius* pode melhorar o desempenho de *Pinus massoniana* e promover a recuperação do ecossistema.

Os parâmetros ASR e VR foram favorecidos pela associação ectomicorrízica nas plantas sem o MSPFe, enquanto o DMR das plantas com o simbionte aumentou em ambas as condições de MSPFe. O aumento destes parâmetros favorecem a arquitetura radicular, o desempenho da planta e sua plasticidade quando submetidas à condições adversas, pois o incremento na área superficial de

absorção se traduz em um incremento no volume de solo explorado pelas raízes, sendo estes dependentes do desenvolvimento e do diâmetro da raiz (Smith e De Smet, 2012; Koevoets et al., 2016).

Esta resposta à micorrização pode sugerir o uso da aroeira em solos sob estresse. Estima-se que a superfície da área explorada por micorrizas seja 100 a 1000 vezes superior àquelas de raízes sem a presença do micro-organismo simbiote (Larcher, 2003). Assim, as plantas de *S. terebinthifolius* inoculadas com os isolados do gênero *Pisolithus* poderiam apresentar um melhor estado nutricional, em relação às plantas que apresentam menor área de absorção, podendo este ser um fator condicionante para a taxa de sobrevivência desta espécie. O acréscimo da ASR, VR e DMR observado nas plantas inoculadas com ES-01 com MSPFe, sugere que este micro-organismo consegue influenciar os atributos morfológicos da aroeira sob estresse.

A influência da inoculação nos atributos morfológicos radiculares e nas classes de diâmetro das plantas está possivelmente associado ao aumento no diâmetro radial das células da epiderme radicular, provocado pelo gênero *Pisolithus*, e associado à produção de reguladores de crescimento, como observado por Silva et al. (2007), trabalhando com isolados de *Pisolithus* sp. em *Eucalyptus grandis*. Dessa forma, a associação mutualística dos fungos ectomicorrízicos pode levar a modificações representativas no desenvolvimento da arquitetura radicular, com a formação de inúmeras raízes laterais curtas e inchadas, envoltas pelo manto fúngico (Vayssières et al., 2015), bem como raízes finas quando sob alto fornecimento de Fe.

O aumento da atividade da CAT e POX nas folhas das plantas com o MSPFe, sobretudo as plantas com fungos ECM, mostrou que a expressão das enzimas foi amplamente influenciada pelos fungos micorrízicos. Porém, apesar da natureza simbiótica, a indução de enzimas antioxidantes foi atribuída a uma resposta defensiva da planta ao estresse oxidativo para eliminar o H₂O₂, gerado pelo excesso de Fe, haja visto que, o estresse oxidativo aumenta o conteúdo de ROS, e simultaneamente, para evitar danos às células, o sistema de defesa enzimático aumenta a expressão das enzimas protetoras (Ding et al., 2007; Latef et al., 2011). Isso sugere que níveis tóxicos de Fe poderiam ser responsáveis por alterações quantitativas e qualitativas nas enzimas das folhas (Fang e Kao, 2000). Xing et al.

(2010) observaram um aumento na CAT e POX em plantas de *Elodea nuttallii* com excesso de Fe, assim como nesta pesquisa.

A redução da atividade da CAT no tecido radicular de todas as plantas com o MSPFe, pode estar associado a uma redução da síntese destas enzimas nas raízes, que pode ser atribuído às alterações no equilíbrio do metabolismo de radicais livres, decorrente de toxidez de metais (Mehraban et al., 2008; Onyango et al., 2020), sugerindo que a aplicação do MSPFe inferiu em uma menor produção e expressão desta enzima nas raízes. Porém, todas as plantas cultivadas com MSPFe apresentaram um aumento na atividade da POX das raízes, indicando que, nestas condições, esta enzima é menos sensível que a CAT, pois conseguiu responder ao estresse oxidativo. Mehraban et al. (2008) observaram uma redução na atividade da CAT e um aumento POX em plantas de *Oryza sativa* L. expostas à alta concentrações de Fe.

Diferente das folhas, as raízes das plantas micorrizadas e com o MSPFe não incrementaram na atividade e/ou produção da POX. Este fato pode estar relacionado ao efeito direto dos fungos sob as raízes, fazendo com que os microorganismos atenuem os efeitos do excesso de elementos contido no particulado (Gil-Martínez et al., 2018) e dessa forma, minimizem a produção de ROS, reduzindo a produção de enzimas antioxidantes no tecido radicular.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A simbiose com os fungos ECM *P. tinctorius* e *P. albus* favoreceu o crescimento e o balanço nutricional em ambas as partições (parte aérea e raiz) das plantas de *S. terebinthifolius*, em condição sem e com a deposição de MSPFe. Os parâmetros ecofisiológicos de trocas gasosas e índice SPAD, bem como os atributos morfológicos das raízes foram influenciados pela presença dos fungos ECM em ambos os status de MSPFe, uma vez que favoreceu a arquitetura de raízes. A fluorescência da clorofila manteve-se nas condições ideais, mostrando que o estresse do MSPFe não comprometeu a conversão de energia efetiva nos fotossistemas, enquanto que, a atividade das enzimas antioxidantes (CAT e POX) nas plantas aumentou nas folhas e diminuiu nas raízes, decorrente do fornecimento do MSPFe ser na parte aérea.

O isolado Pt-24 apresentou uma melhor resposta na altura, diâmetro do colo, número de folhas, área foliar e índice SPAD. O isolado ES-01 provocou uma melhor resposta na MSPA e MSR, no conteúdo de macro e micronutrientes em ambas as partições. Ambos os inóculos, melhoraram as trocas gasosas, atributos morfológicos das raízes e a atividade das enzimas antioxidantes dos tecidos foliares.

Em síntese, este trabalho sugere, através dos parâmetros de crescimento, ecofisiológicos e nutricionais, que a inoculação com *P. tinctorius* e *P. albus* apresentam uma resposta eficiente em minimizar o efeito do MSPFe em plantas de *S. terebinthifolius* Raddi, evidenciando que esta essência florestal possui afinidade com estes micro-organismos e que esta associação simbiótica possibilita uma resposta positiva no crescimento vegetal em áreas contaminadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal S., Sairam R.K., Srivastava G.C., Meena R.C. (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49:541-550.
- Aggangan, N.S., Aggangan, B.J.S. (2012) Selection of ectomycorrhizal fungi and tree species for rehabilitation of Cu mine tailings in the Philippines. *Journal of Environmental Science and Management*, 15 (1):59-71.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A. (2008) Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2):377-390.
- Alvarez, M., Huygens, D., Olivares, E., Saavedra, I., Alberdi, M., Valenzuela, E. (2009) Ectomycorrhizal fungi enhance nitrogen and phosphorus nutrition of *Nothofagus dombeyi* under drought conditions by regulating assimilative enzyme activities. *Physiologia Plantarum*, 136 (4):426-436.
- Amir, H., Jourand, P., Cavaloc, Y., Ducouso, M. (2014) Role of mycorrhizal fungi in the alleviation of heavy metal toxicity in plants. In *Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration*. Springer, Berlin, Heidelberg. 241-258.
- Ando, T., Yoshida, S., Nishiyama, I. (1983) Nature of oxidizing power of rice roots. *Plant and Soil*, 72:57-71.

- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase – hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85:235-241.
- Audebert, A., Fofana, M. (2009) Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 195:66-76.
- Audebert, A., Sahrawat, K.L. (2000) Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition*, 23:1877-1885.
- Aung, M.S., Masuda, H., Nozoye, T., Kobayashi, T., Jeon, J.-S., An, G., Nishizawa, N.K. (2019) Nicotianamine synthesis by OsNAS3 is important for mitigating iron excess stress in rice. *Frontiers in Plant Science*, 10:1-16.
- Balliu, A., Sallaku, G., Rewald, B. (2015) AMF Inoculation enhances growth and improves the nutrient uptake rates of transplanted, salt-stressed tomato seedlings. *Sustainability*, 7:15967-15981.
- Ban, Y., Xu, Z., Zhang, H., Chen, H., Tang, M. (2015) Soil chemistry properties, translocation of heavy metals, and mycorrhizal fungi associated with six plant species growing on lead-zinc mine tailings. *Annals of Microbiology*, 65 (1):503-515.
- Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J., Clemente, A.D., Paula, V.F.D., Ismail, F. (2007) Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Química Nova*, 30 (8):1959-1965.
- Bati, C.B., Santilli, E., Lombardo, L. (2015) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and on micronutrient and macronutrient uptake and allocation in olive plantlets growing under high total Mn levels. *Mycorrhiza*, 25 (2):97-108.
- Becker, M., Asch, F. (2005) Iron toxicity in rice: Conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168 (4):558-573.
- Becquer, A., Trap, J., Irshad, U., Ali, M. A., Claude, P. (2014) From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. *Frontiers in Plant Science*, 5, 548.
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M.A., Raza, S., Khan, Ashraf, M., Ahmed, N., Zhang, L. (2019) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1068.

- Beutler, E. (1975) Catalase. In: Beutler E. (ed) Red cell metabolism – a manual of biochemistry methods. Grune and Straton, New York, pp 89-90.
- Bjorkman, O., Demmig, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170 (4):489-504.
- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., Martínez-Estévez, M. (2017) Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science*, 8:1767.
- Bonfante, P, Genre A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 27:1-48.
- Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T., Malajczuk N. (1996) *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Monograph, Australian Centre for International Agricultural Research, Australia, 374p.
- Campos, M.C.C. (2011) Soil attributes and risk of leaching of heavy metals in tropical soils. *Ambiência*, 6 (3):547-565.
- Canton, G.C., Bertolazi, A.A., Cogo, A.J., Eutrópio, F.J., Melo, J., Souza, S.B., Krohling, C.A., Campostrini, E., Silva, A.G., Façanha, A.R., Sepúlveda, N., Cruz, C., Ramos, A.C. (2016) Biochemical and ecophysiological responses to manganese stress by ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and in association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*, 26 (5):475-487.
- Cataldo, D.A., Mcfadden, K.M., Garland, T.R., Wildung, R.E. (1988) Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II) and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiology*, 86:734-739.
- Cesário, L.F., Gaglianone, M.C. (2008) Floral biology and reproductive phenology of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) in the restinga of northern Rio de Janeiro State. *Acta Botanica Brasilica*, 22 (3):828-833.
- Chandrasekaran, M., Chanratana. M., Kim, K., Seshadri, S., Sa, T. (2019) Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, water status, and gas exchange of plants under salt stress—a meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, 10:457.

- Chatterjee, C., Gopal, R., Dube, B.K. (2006) Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Scientia Horticulturae*, 108:1-6.
- Chen, C.C., Dixon, J.B., Turner F.B. (1980) Iron coatings on rice leaves: Morphology and models of development. *Soil Science Society of America Journal*, 44:1113-1119.
- Choi, D.S., Quoreshi, A.M., Maruyama, Y., Jin, H.O., Koike, T. (2005) Effect of ectomycorrhizal infection on growth and photosynthetic characteristics of *Pinus densiflora* seedlings grown under elevated CO₂ concentrations. *Photosynthetica*, 43 (2):223-229.
- Clark, R.B. (1975) Characterization of phosphates in intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23:458-460.
- Clasen, B.E., Silveira, A.D.O., Baldoni, D.B., Montagner, D.F., Jacques, R.J., Antonioli, Z.I. (2018). Characterization of ectomycorrhizal species through molecular biology tools and morphotyping. *Scientia Agricola*, 75 (3):246-254.
- Coccina, A., Cavagnaro, T.R., Pellegrino, E., Ercoli, L., McLaughlin, M.J., Watts-Williams, S.J. (2019) The mycorrhizal pathway of zinc uptake contributes to zinc accumulation in barley and wheat grain. *BMC Plant Biology*, 19 (1):133.
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J.-Z., Pinton, R., Cesco, S. (2013) Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments*, 14(3):538-548.
- Connolly, E.L, Guerinot, M.L. (2002) Iron stress in plants. *Genome Biology*, 3:1024.1-1024.4.
- Costa, L.S.D., Graziotti, P.H., Silva, A.C., Fonseca, A.J., Gomes, Â.L.F., Graziotti, D.C.F.S., Rossi, M.J. (2019) Alginate gel entrapped ectomycorrhizal inoculum promoted growth of cuttings of *Eucalyptus* clones under nursery conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, 48 (8):978-985.
- Costa, M.D., Campos, A.N.R., Santos, M.L., Borges, A.C. (2010) In vitro ectomycorrhiza formation by monokaryotic and dikaryotic isolates of *Pisolithus microcarpus* in *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, 34 (3):377-387.

- Curie, C., Briat, J.F. (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54:183-206.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F., Walker, E.L. (2001) Maize *Yellow Stripe 1* encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature*, 409:346-349.
- Dai, Y.C., Cui, B.K., Si, J., He, S.H., Hyde, K.D., Yuan, H.S., Liu, X.Y., Zhou, L.W. (2015) Dynamics of the worldwide number of fungi with emphasis on fungal diversity in China. *Mycological Progress*, 14 (8):62.
- Dalong, M., Luhe, W., Guoting, Y., Liqiang, M., Chun, L. (2011) Growth response of *Pinus densiflora* seedlings inoculated with three indigenous ectomycorrhizal fungi in combination. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (3):1197-1203.
- Davar, R., Darvishzadeh, R., Majd, A. (2013) Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biologia*, 68(5).
- Dawkins, K., Esiobu, N. (2017) Arbuscular and ectomycorrhizal fungi associated with the invasive Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*) and two native plants in south Florida. *Frontiers in Microbiology*, 8:665.
- Dawkins, K., Esiobu, N. (2018) The invasive brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*) is colonized by a root microbiome enriched with *Alphaproteobacteria* and unclassified *Spartobacteria*. *Frontiers in Microbiology*, 9:876.
- Dechen, A.R., Nachtigall, G.R. (2006) Micronutrientes. In: Fernandes, M.S. *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 326-354.
- Ding, B., Shi, G., Xu, Y., Hu, J., Xu, Q. (2007) Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. *Environmental Pollution*, 147 (3):800-803.
- Dobbss L.B., Santos, T.C, Pittarello, M., Souza, S.B., Ramos, A.C., Busato, J.G. (2018) Alleviation of iron toxicity in *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) by humic substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (10):9416-25.

- Domínguez-Núñez, J.A., Albanesi, A.S. (2020) Ectomycorrhizal fungi as biofertilizers in forestry. *In: Mirmajlessi, S.M. (ed.) Biostimulants in Plant Science*. London: IntechOpen, p. 1-18.
- Dučić, T., Thieme, J., Polle, A. (2012) Phosphorus compartmentalization on the cellular level of Douglas fir root as affected by Mn toxicity: a synchrotron-based FTIR approach. *International Journal of Spectroscopy*, 27:265-272.
- Egerton-Warburton, L. (2015) Aluminum-tolerant *Pisolithus* ectomycorrhizas confer increased growth, mineral nutrition, and metal tolerance to *Eucalyptus* in acidic mine spoil. *Applied and Environmental Soil Science*, 1-9.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J.P., Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transport from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science*, 93:5624-5628.
- Ennigrou, A., Casabianca, H., Laarif, A., Hanchi, B., Hosni, K. (2017) Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. *South African Journal of Botany*, 108:407-415.
- Epstein, E., Bloom, A.J. (2006) *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. 2. ed. Londrina: Planta, 404p.
- Fang, W., Wang, J., Lin, C., Kao, C. (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 35: 75-80.
- Fang, W.C., Kao, C.H. (2000) Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science*, 158 (1-2):71-76.
- Farquhar, G.D., Caemmerer, S.V., Berry, J.A. (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149:78-90.
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 33:317-345.
- Fashola, M.O., Ngole-Jeme, V.M. and Babalola, O.O. (2016) Heavy metal pollution from gold mines: environmental effects and bacterial strategies for

- resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13 (11):1047.
- Finlay, R.D. (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59 (5):1115-1126.
- Franco, A.R., Castro, P.M. (2015) Inoculation of *Pinus pinea* seedlings with *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bellinii* promotes plant growth in benfluralin contaminated soil. *Plant and soil*, 386 (1-2):113-123.
- Gadd, G.M. (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111 (1):3-49.
- Gadd, G.M. (1993) *Tansley Review No. 47. Interaction of Fungi with Toxic Metals. New Phytologist*, 124:25-60.
- Gandini, A.M.M., Graziotti, P.H., Rossi, M.J., Graziotti, D.C.F.S., Gandini, E.M.M., Silva, E.D. B., Ragonezi, C. (2015) Growth and nutrition of eucalypt rooted cuttings promoted by ectomycorrhizal fungi in commercial nurseries. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39 (6):1554-1565.
- Garcés-Ruiz, M., Calonne-Salmon, M., Plouznikoff, K., Misson, C., NavarreteMier, M., Cranenbrouck, S., Declerck, S. (2017) Dynamics of short-term phosphorus uptake by intact mycorrhizal and non-mycorrhizal maize plants grown in a circulatory semi-hydroponic cultivation system. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1471.
- García, A.N., Árias, S.D.P.B., Morte, A., Sánchez-Blanco, M.J. (2011) Effects of nursery preconditioning through mycorrhizal inoculation and drought in *Arbutus unedo* L. plants. *Mycorrhiza*, 21 (1):53-64.
- Ghasemi-Fasaei, R., Ronaghi, A. (2008) Interaction of iron with copper, zinc, and manganese in wheat as affected by iron and manganese in a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition*, 31 (5):839-848.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930.

- Gil-Martínez, M., López-García, Á., Domínguez, M.T., Navarro-Fernández, C.M., Kjøller, R., Tibbett, M., Marañón, T. (2018) Ectomycorrhizal fungal communities and their functional traits mediate plant–soil interactions in trace element contaminated soils. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Giovannetti, M., Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84:489-500.
- Girard, J.E., Girard, J. (2013) *Principles of environmental chemistry*. 3ed. Jones & Bartlett Publishers. 712p.
- Gonzalez-Chavez, M.C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S.F., Nichols, K.A. (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130 (3):317-323.
- Grace, C., Stribley D.P. (1991) A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 95 (9):1160-1162.
- Gross, J., Stein, R.J., Fett-Neto, A.G., Fett, J.P. (2003) Iron homeostasis related genes in rice. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4):477-497.
- Gurzau, E.S., Neagu, C., Gurzau, A.E. (2003) Essential metals — case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56:190-200.
- Hendrix, J.W., Hurt, C.S., Maronek, D.M. (1985) Relationship between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* associated with loblolly pine and acid-generating *Thiobacillus* spp. on an acidic strip mine site. *Canadian Journal of Microbiology*, 3:878-879.
- Huang, L., Zhang, H., Song, Y., Yang, Y., Chen, H., Tang, M. (2017) Subcellular compartmentalization and chemical forms of lead participate in lead tolerance of *Robinia pseudoacacia* L. with *Funneliformis mosseae*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 517.
- Husson, O. (2013) Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant and Soil*, 362 (1-2):389-417.
- Jackson, M.L. (1965) *Soil chemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 498p.

- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Becker, S., Godbold, D.L. (2000) The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant Soil*, 220:243-246.
- Jin, H., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Piotrowski, E., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y. (2005) The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 168 (3):687-696.
- José, A.C., Davide, A.C., Oliveira, S.L., 2015. Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) seedling production for recuperating bauxite mined areas. *Cerne*, 11 (2):187-196.
- Jourand, P., Hannibal, L., Majorel, C., Mengant, S., Ducouso, M., Lebrun, M. (2014) Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. *Journal of Plant Physiology*, 171 (2):164-172.
- Jucoski, G.O., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J.A. (2016) Excess iron on growth and mineral composition in *Eugenia uniflora* L. *Revista Ciência Agronômica*, 47(4):720-728.
- Kabata-Pendias, A. (2010) *Trace elements in soils and plants*. 4. ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group, 548p.
- Kampfenkel, K., Van Montagu, M.V., Inzé, D. (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 225:165-167.
- Kar, M., Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319.
- Kaur, R., Singh, A., Kang, J.S. (2014) Influence of different types mycorrhizal fungi on crop productivity. *Current Agriculture Research Journal*, 2 (1):51-54.
- Kernaghan, G., Widden, P., Bergeron, Y., Légaré, S., Paré, D. (2003) Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed-woods. *Oikos*, 102 (3):497-504.

- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G. (2008) Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 152 (3):686-692.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. (2008) *Dictionary of the fungi*. CABI, Wallingford, UK.
- Koevoets, I.T., Venema, J.H., Elzenga, J.T.M., Testerink, C. (2016) Roots withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 07:1-19.
- Koske, R.E., Gemma, J.N. (1995) Fungal reactions to plants prior to mycorrhizal formation. In: Allen, M.F. (ed.) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant fungal processes*. New York: Chapman and Hall, p. 3-36.
- Krohling, C.A., Eutrópico, F.J., Bertolazi, A.A., Dobbss, L.B., Campostrini, E., Dias, T., Ramos, A.C. (2016) Ecophysiology of iron homeostasis in plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62 (1):39-47.
- Larcher, W. (2003) *Physiological Plant Ecology*. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag. 513p.
- Latef, A.A.H., Chaoxing, H. (2011) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127 (3):228-233.
- Lebel, T., Pennycook, S., Barrett, M. (2018) Two new species of *Pisolithus* (Sclerodermataceae) from Australasia, and an assessment of the confused nomenclature of *P. tinctorius*. *Phytotaxa*, 348 (3):163-186.
- Li, G., Kronzucker, H. J., Shi, W. (2015) Root developmental adaptation to Fe toxicity: Mechanisms and management. *Plant Signaling e Behavior*, 11(1):e1117722.
- Liu, H., Yuan, M., Tan, S., Yang, X., Lan, Z., Jiang, Q., Ye, Z., Jing, Y. (2015) Enhancement of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus versiforme*) on the growth and Cd uptake by Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum*. *Applied Soil Ecology*, 89:44-49.

- Lorenzi, H. (2014) *Árvores Brasileiras - Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. v.1, 6. ed, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 384p.
- Mahender, A., Swamy, B., Anandan, A., Ali, J. (2019) Tolerance of iron-deficient and -toxic soil conditions in rice. *Plants*, 8 (2):1-31.
- Majerus, V., Bertin, P., Lutts, S. (2007) Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentration in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud). *Plant Science*, 173:96-105.
- Majerus, V., Bertin, P., Lutts, S. (2009) Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. *Plant Soil*, 324:253-265.
- Makarov, M.I. (2019) The role of mycorrhiza in transformation of nitrogen compounds in soil and nitrogen nutrition of plants: a review. *Eurasian Soil Science*, 52 (2):193-205.
- Malajczuk, N., Lapeyrie, F., Garbaye, J. (1990) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro: 1. Mycorrhiza formation in model systems. *New Phytologist*, 114 (4):627-631.
- Maltz, M. R., Chen, Z., Cao, J., Arogyaswamy, K., Shulman, H., Aronson, E. L. (2019) Inoculation with *Pisolithus tinctorius* may ameliorate acid rain impacts on soil microbial communities associated with *Pinus massoniana* seedlings. *Fungal Ecology*, 40:50-61.
- Marschner H., Rohmëld V. (1994) Strategies of plant for acquisition of iron. *Plant and Soil*, 165:375-388.
- Marschner, H. (2012) *Marschner's mineral nutrition of higher plant*. 3ed, New York: Academic Press, 672p.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Veneault-Fourrey, C., Hibbett, D.S. (2016) Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (12):760.
- Marx, D.H. (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59:153-163.

- Mathur, N., Vyas, A. (2000) Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. *Journal of Arid Environments*, 45 (3):191-195.
- Mcbride, M.B. (1994) *Environmental chemistry of soils*. New York: Oxford University Press, 416p.
- Mehraban, P., Zadeh, A.A., Sadeghipour, H.R. (2008) Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7 (3):251-259.
- Mello, A., Balestrini, R. (2018) Recent insights on biological and ecological aspects of ectomycorrhizal fungi and their interactions. *Frontiers in Microbiology*, 9:216.
- Moore, R.T. (1980) Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. *Botanica Marina*, 23:361–373.
- Morag, G.L.E.N., Tommerup, I.C., Bougher, N.L., O'Brien, P.A. (2001) Interspecific and intraspecific variation of ectomycorrhizal fungi associated with Eucalyptus ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR–RFLP. *Mycological Research*, 105 (7):843-858.
- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. (2006) *Soil microbiology and biochemistry*. 2. ed. UFLA, Lavras, MG, 729p. Brazil (in Portuguese).
- Mori, S. (1999) Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:250-253.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C. (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30:521-528.
- Nguyen, H., Calvo Polanco, M., Zwiazek, J.J. (2006) Gas exchange and growth responses of ectomycorrhizal *Picea mariana*, *Picea glauca*, and *Pinus banksiana* seedlings to NaCl and Na₂SO₄. *Plant Biology*, 8 (5):646-652.
- Odiyi, B.O., Bamidele, J.F. (2013) Effect of simulated acid rain on the growth and yield of cassava *Manihot esculenta* (Crantz). *Journal of Agricultural Sciences*. 6:97-101.
- Onyango, D.A., Entila, F., Egdane, J., Pacleb, M., Katimbang, M.L., Dida, M.M., Ismail, A.M., Drame, K.N. (2020) Mechanistic understanding of iron toxicity

- tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 2. Root oxidation ability and oxidative stress control. *Functional Plant Biology*, 47 (2):145-155.
- Pagano, M.C., Utidab, M.K., Gomes, E.A., Marriel, I.E., Cabello, M.N., Scotti, M.R. (2011) Plant-type dependent changes in arbuscular mycorrhizal communities as soil quality indicator in semi-arid Brazil. *Ecological Indicators*, 11 (2):643-650.
- Pandurangan, S., Sandercock, M., Beyaert, R., Conn, K.L., Hou, A., Marsolais, F. (2015). Differential response to sulfur nutrition of two common bean genotypes differing in storage protein composition. *Frontiers in Plant Science*, 6, 92.
- Patocka, J., Almeida, J.D. (2017) Brazilian pepper tree: Review of pharmacology. *Military Medical Science Letters*, 86 (1):32-41.
- Pereira, E.G, Oliva, M.A., Kuki, K.N., Cambraia, J. (2009) Photosynthetic changes caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*, *Trees-Structure and Functions*, 23:277.
- Peters, J.B. (ed.) (2005) *Wisconsin procedures for soil testing, plant analysis and feed & forage analysis: Plant Analysis*. Madison: Department of soil science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin – Extension, 304p.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Lewis, H., Melville, L.H. (2004) *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Oxford: Oxford University Press, 196p.
- Peyronel, B., Fassi, B., Fontana, A., Trappe, J.M. (1969) Terminology of mycorrhizae. *Mycologia*, 61 (1):410-411.
- Pinto, S.D.S., Souza, A.E.D., Oliva, M.A., Pereira, E.G. (2016) Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Scientia Agricola*, 73 (3):217-226.
- Plett, J.M., Kohler, A., Khachane, A., Keniry, K., Plett, K.L., Martin, F., Anderson, I.C. (2014) The effect of elevated carbon dioxide on the interaction between *Eucalyptus grandis* and diverse isolates of *Pisolithus* sp. is associated with a complex shift in the root transcriptome. *New Phytologist*, 206 (4):1423-1436.
- Queires, L.C.S., Fauvel-Lafève F., Terry, S., De la Taille, A., Kouyoumdjian, J.C., Chopin, D.K., Vacherot, F., Rodrigues, L.E.A., Crepin, M. (2006) Polyphenols

purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Research*, 26 (1A):379-387.

Quoreshi, A.M., Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S. Futai, K. (2008) The use of mycorrhizal biotechnology in restoration of disturbed ecosystem. *In: Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., Futai, K. (eds.) Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry.* Switzerland: Springer Dordrecht, p. 303-320.

Ragel, P., Raddatz, N., Leidi, E.O., Quintero, F.J., Pardo, J.M. (2019) Regulation of K⁺ nutrition in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10:1-21.

Rengel, Z. (2015) Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15 (2):397-409.

Roberts, L.A., Pierson, A.J., Panaviene, Z., Walker, E.L. (2004) Yellow stripe1: expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiology*. 135:112-120.

Robinson N.J., Procter C.M., Connolly E.L., Guerinot M.L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397:694-697.

Römheld, V. (1987) Different strategies for iron acquisition in higher plants. What's new in plant physiology. *Physiologia Plantarum*, 70:231-234.

Ruscitti, M., Arango, M., Ronco, M., Beltrano, J. (2011) Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23 (1):15-25.

Saaltink, R.M., Dekker, S.C., Eppinga, M.B., Griffioen, J., Wassen, M.J. (2017) Plant-specific effects of iron-toxicity in wetlands. *Plant and Soil*, 416 (1-2):83-96.

Sabbi, L.D.B.C., Ângelo, A.C., Boeger, M.R. (2010) Influência da luminosidade nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) implantadas em duas áreas com diferentes graus de sucessão, nas margens do Reservatório Iraí, Paraná, Brasil. *Iheringia. Série Botânica*, 65 (2):171-181.

- Sahrawat, K.L. (2005) Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients. *In: Toriyama, K., Heong, K.L., Hardy, B. (eds.) Rice is life: scientific perspectives for the 21st century*. Japan: Proceedings of the World Rice Research Conference, p. 452-454.
- Sattler, D., Raedig, C., Hebner, A., Wesenberg, J. (2019) Use of native plant species for ecological restoration and rehabilitation measures in Southeast Brazil. *In: Nehren, U., Schlüter, S., Raedig, C., Sattler, D., Hissa, H. (eds.) Strategies and Tools for a Sustainable Rural Rio de Janeiro*. Springer Cham, p. 191-204.
- Sbihi, K., Cherifi, O., El gharmali, A., Oudra, B. Aziz, F. (2012) Accumulation and toxicological effects of cadmium, copper and zinc on the growth and photosynthesis of the freshwater diatom *Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot: a laboratory study. *Journal of Materials and Environmental Science*, 3:497-506.
- Scalon, S.D.P., Scalon Filho, H., Masetto, T.E. (2012) Aspectos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de aroeira. *Cerne*, 18 (4):533-539.
- Schmidt, W. (1999) Mechanisms and regulation of reduction based iron uptake in plants. *New Phytology*, 141:1-26.
- Sebastiana, M., Pereira, V.T., Alcântara, A., Pais, M.S., Silva, A.B. (2013) Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* increases the performance of *Quercus suber* L. (cork oak) nursery and field seedlings. *New Forests*, 44 (6):937-949.
- Sebastiana, M., Silva, A.B., Matos, A.R., Alcântara, A., Silvestre, S., Malhó, R. (2018) Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* reduces stress induced by drought in cork oak. *Mycorrhiza*, 28 (3):247-258.
- Selle, A., Willmann, M., Grunze, N., Geßler, A., Weiß, M., Nehls, U. (2005) The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 168:697-706.
- Seven, J., Polle, A. (2014) Subcellular nutrient element localization and enrichment in ecto-and arbuscular mycorrhizas of field-grown beech and ash trees indicate functional differences. *PLoS One*, 9 (12):1-18.

- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E. (2014) Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 232:1-44.
- Shakeel, M., Yaseen, T. (2015) An insight into phytoremediation of heavy metals from soil assisted by ancient fungi from glomeromycota-arbuscular mycorrhizal fungi. *Science, Technology and Development*, 34 (4):215-220.
- Shi, L., Wang, J., Liu, B., Nara, K., Lian, C., Shen, Z., Xia, Y., Chen, Y. (2017) Ectomycorrhizal fungi reduce the light compensation point and promote carbon fixation of *Pinus thunbergii* seedlings to adapt to shade environments. *Mycorrhiza*, 27 (8):823-830.
- Sidhu, M.K., Raturi, H.C., Kachwaya, D.S., Sharma, A. (2019) Role of micronutrients in vegetable production: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8:332-340.
- Silva, E., Guilherme, M.F.S., Oliveira, H.M., Araújo, L.N., Viana, Z.C., Santos, V.L.C. (2017) Ecotoxicological effects of cadmium on the germination and initial development of *Schinus terebinthifolius*. *Revista de Ciências Agrárias*, 40 (2):311-318.
- Silva, M.A., Costa, M.D., Rocha, R.B., Borges, A.C. (2007) Formation of ectomycorrhizae by monokaryons and dikaryons of *Pisolithus* sp. and nutritional interactions in *Eucalyptus grandis*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31(5):917-929.
- Silva, M.D., Nogueira, R.J.M.C., Oliveira, A.D., Santos, V.D. (2008) Stomatal responses and dry matter yield in young aroeira plants submitted to different water levels. *Revista Árvore*, 32 (2):335-344.
- Silveira, A.P.D. (1992) Micorrizas. In: Cardoso, E.J.P.N., Neves, M.C.P. (eds.) *Microbiologia de solo*. Campinas-SP; Sociedade Brasileira de ciência do solo, cap. 19. p. 257-282.
- Siqueira, J.O., Franco, A.A. (1988) *Biotechnology do Solo: Fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ABEAS/Lavras: ESAL/FAEPE, 236p.

- Siqueira, J.O., Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (2010) *Mycorrhizae: 30 years of research in Brazil*. Lavras: UFLA, 716p.
- Slama, A., Gorai, M., Fortas, Z., Boudabous, A., Neffati, M. (2012) Growth, root colonization and nutrient status of *Helianthemum sessiliflorum* Desf. inoculated with a desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19 (1):25-29.
- Smith, D.S., Bell, R.A., Kramer, J.R. (2002) Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133 (1-2):65-74.
- Smith, S.E., Read, D. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. 3th ed. Academic Press, 787p.
- Smith, S., De Smet, I. (2012) Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367 (1595):1441-1452.
- Souza, D.M.G., Miranda, L.N. Oliveira, S.A. (2007) Acidez do solo e sua correção. *In: Novais, R.F., Alvarez V., V.H., Barros, N.F., Fontes, R.L.F., Cantarutti, R.B. Neves, J.C.L. (eds.) Fertilidade do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 205-274.
- Souza, L.R.R., Bernardes, L.E., Barbetta, M.F.S., Veiga, M.A.M.S. (2019) Iron oxide nanoparticle phytotoxicity to the aquatic plant *Lemna minor*: effect on reactive oxygen species (ROS) production and chlorophyll a/chlorophyll b ratio. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:1-11.
- Stephan, U.W., Scholz, G. (1993) Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Plant Physiology*, 88:522-529.
- Suh, H.J., Kim, C.S., Lee, J.Y., Jung, J. (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochemistry and Photobiology*, 75(5): 513-518.
- Tagu, D., Lapeyrie, E., Martin, F. (2002) The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil*, 244:97-105.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 819p.

- Tanaka, A., Loe, R., Navasero, S.A. (1966) Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 12:32-37.
- Tiwari, S., Lata, C. (2018) Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. *Frontiers in Plant Science*, 9, 452.
- Tlili, N., Yahia, Y., Feriani, A., Labidi, A., Ghazouani, L., Nasri, N., Saadaoui, E., Khaldi, A., (2018) *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: A comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. *Industrial Crops and Products*, 122:559-565.
- Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Mishra, S., Chauhan, D.K., Dubey, N.K. (2015) Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37 (7):139.
- Turjaman, M., Tamai, Y., Segah, H., Limin, S.H., Cha, J.Y., Osaki, M., Tawaraya, K. (2005) Inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. improves early growth of *Shorea pinanga* nursery seedlings. *New Forests*, 30 (1):67-73.
- Vayssières, A., Pěňčík, A., Felten, J., Kohler, A., Ljung, K., Martin, F., Legué, V. (2015) Development of the poplar-laccaria bicolor ectomycorrhiza modifies root auxin metabolism, signaling and response. *Plant Physiology*, 169 (1):890-902.
- Veronez, A.C.S., Salla, R.V., Baroni, V.D., Barcarolli, I.F., Bianchini, A., Reis Martinez, C.B., Chippari-Gomes, A.R. (2016) Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquatic Toxicology*, 174:101-108.
- Walker, D.J., Clemente, R., Bernal, M.P. (2004) Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste, *Chemosphere*, 57:215-224.
- Wallander, H., Johansson, L., Pallon, J. (2002) PIXE analysis to estimate the composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grow in contact with different minerals in forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2):147-156.

- Watts-Williams, S.J., Smith, F.A., McLaughlin, M.J., Patti, A.F., Cavagnaro, T.R. (2015) How important is the mycorrhizal pathway for plant Zn uptake?. *Plant and Soil*, 390 (1-2):157-166.
- Weirich, S.W., Silva, R.F.D., Perrando, E.R., Ros, C.O.D., Dellai, A., Scheid, D.L., Trombeta, H.W. (2018) Influence of ectomycorrhizae on the growth of seedlings of *Eucalyptus grandis*, *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus dunnii*. *Ciencia Florestal*, 28 (2):765.
- Whiting, S.N., Reeves, R.D., Richards, D., Johnson, M.S., Cooke, J.A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J.A.C., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ginocchio, R. (2004) Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology*, 12 (1):106-116.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E. (2011) Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*, 2011:1-20.
- Xing, W., Li, D., Liu, G. (2010) Antioxidative responses of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (10-11):873-878.
- Xiong, D., Chen, J., Yu, T., Gao, W., Ling, X., Li, Y., Huang, J. (2015) SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. *Scientific Reports*, 5 (1):1-12.
- Xu, G., Wolf, S., Kafkafi, U. (2002) Ammonium on potassium interaction in sweet pepper. *Journal of Plant Nutrition*, 25:719-734.
- Zanandrea, I., Nassi, F.L., Turchetto, A.C., Braga, E.J.B., Peters, J.A., Bacarin, M.A. (2006) Effect of salinity under fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris*. *Current Agricultural Science and Technology*, 12 (2):157-161.
- Zhang, M.K., Liu, Z.Y., Wang, H. (2010) Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41 (7):820-831.