

EFEITO DA FORMONONETINA (7 Hidroxi, 4'metoxi Isoflavona) NA COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA E CRESCIMENTO DO MILHO EM SOLO CONTENDO EXCESSO DE METAIS PESADOS⁽¹⁾

**J. O. SIQUEIRA⁽²⁾, M. A. M. PEREIRA⁽³⁾,
J. B. P. SIMÃO⁽⁴⁾ & F. M. S. MOREIRA⁽²⁾**

RESUMO

O excesso de metais pesados contamina o solo, exercendo impacto negativo sobre os microrganismos e ação tóxica sobre as plantas, dificultando a revegetação e reabilitação de áreas degradadas. No presente estudo, avaliou-se o efeito da aplicação do isoflavonóide formononetina (7 hidroxi, 4'metoxi isoflavona) no crescimento e absorção de metais pelo milho (*Zea mayz* L.) em mistura de solo com proporções crescentes de um solo contaminado que continha 16.904, 194, 219 e 836 mg dm⁻³ de solo de Zn, Cd, Pb e Cu, respectivamente. Esse solo foi diluído com solo não contaminado para obter misturas com 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% p/p do solo contaminado. Nas misturas de solo, infestadas com propágulos de fungos micorrízicos, foi plantado milho, com e sem a aplicação de solução de formononetina sintética (5 mg L⁻¹) equivalente a 400 µg kg⁻¹ de solo. Verificou-se um efeito depressivo acentuado da elevação da contaminação do solo na colonização micorrízica e no crescimento das plantas. A formononetina estimulou a colonização nos níveis mais baixos de contaminação e exerceu efeito positivo no crescimento do milho. A absorção dos metais, em especial de Zn e Cd, aumentou com a elevação da contaminação, sendo os teores de Zn menores nas plantas com formononetina, enquanto os teores de Fe foram maiores nestas plantas até 7,5% de solo contaminado. Os resultados indicam que a formononetina reduz, de modo indireto, por meio da micorriza, os efeitos adversos do excesso de metais no solo, especialmente de Zn no milho. O favorecimento da formação de micorriza diminui a absorção de Zn e aumenta a de Fe, podendo ser este o mecanismo responsável pela ação amenizante da formononetina na toxidez de metais pesados no milho. Conclui-se que o uso da formononetina pode facilitar a revegetação de solos contaminados com metais pesados.

Termos de indexação: poluição do solo, micorrizas, simbioses radiculares, flavonóides, absorção mineral, fitotoxidez.

⁽¹⁾ Trabalho financiado pelo convênio CMM/FAEPE e FAPEMIG. Apresentado na FertBIO'98 em Caxambú. Recebido para publicação em março de 1998 e aprovado em fevereiro de 1999.

⁽²⁾ Professores Titular e Adjunto do Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras (UFLA). CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsistas do CNPq.

⁽³⁾ Engenheiro-Agrônomo, ex-bolsista do Departamento de Ciência do Solo, UFLA.

⁽⁴⁾ Engenheiro-Agrônomo, Doutorando em Solos e Nutrição de Plantas, Departamento de Ciência do Solo, UFLA. Bolsista do CAPES-PICDT.

SUMMARY: *EFFECT OF FORMONONETIN (7 Hydroxy 4'methoxy Isoflavona) ON MYCORRHIZAL COLONIZATION AND GROWTH OF CORN IN SOIL WITH EXCESS OF HEAVY METALS*

*The excess of heavy metals contaminating soils is responsible for a negative impact on microorganisms and toxicity on plants, hence turning revegetation and rehabilitation of areas degraded by these metals very difficult. In the present study, the effects of the isoflavonoid formononetin (7 hydroxy 4'methoxy isoflavona) on growth and metal uptake by corn (*Zea mays L.*) were studied in soil-mixes with increasing proportions of a contaminated soil with 16.904; 194; 219 and 836 mg dm⁻³ of soil of Zn, Cd, Pb and Cu, respectively. A sample of soil was diluted in a non-contaminated soil at the rates of 0; 2.5; 5.0; 7.5 and 10.0% by weight of the contaminated soil. Soil-mixes were infested with propagules of arbuscular mycorrhiza fungi (AMF), sown with corn either in presence or absence of formononetin solution at 5 mg L⁻¹, applied at an equivalent rate of 400 mg kg⁻¹ soil. A depressive effect of soil contamination on AMF colonization and plant growth was found. Application of formononetin enhanced root colonization at low to moderate levels of contamination and also affected corn dry matter yield. Uptake of Zn and Cd increased markedly with increasing levels of soil contamination. Zn uptake was lower in formononetin-treated plants, whereas Fe uptake was enhanced by this treatment up to 7.5% of contaminated soil. These results indicate that formononetin growth effect on corn under a heavy metal-stressed condition is mediated by its effects on mycorrhiza formation. Formononetin's indirect decrease of Zn uptake and enhancement of Fe uptake seems to be the mechanism by which this compound ameliorates heavy metal toxicity on corn. In conclusion, the use of formononetin may facilitate revegetation on heavy-metal polluted soils.*

Index terms: soil pollution, mycorrhizae, root symbiosis, flavonoids, mineral uptake, phytotoxicity.

INTRODUÇÃO

A poluição da biosfera com metais pesados, decorrente de ações antrópicas, representa, atualmente, sérios problemas ambientais e de saúde pública em várias regiões do mundo. No solo, o excesso de metais é causado por inúmeras fontes, sendo as atividades de mineração e transformação industrial de materiais que contêm esses metais exemplo das principais fontes de contaminação (Alloway, 1990). No solo, os diferentes metais ocorrem em formas distintas, como livres na solução, complexos solúveis, íons trocáveis ligados à matéria orgânica, precipitados ou fazendo parte da estrutura dos minerais e, quando em excesso, exercem enorme impacto sobre a vegetação, microrganismos e processos funcionais do ecossistema (Valsecchi et al., 1995). A toxidez de um metal no solo depende de sua disponibilidade a qual é controlada pelos fatores físico-químicos e biológicos do solo que regulam a concentração do metal em solução.

Dentre os vários fenômenos biológicos do sistema solo-planta, destacam-se as micorrizas arbusculares (MAs) que são partes integrantes e funcionais das plantas. Essa simbiose mutualista exerce grande influência na nutrição e tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos (Siqueira & Saggin Jr., 1995). Diante da necessidade de revegetar ou da

possibilidade de usar plantas no processo de descontaminação do solo (Baker et al., 1994), pelo emprego de tecnologias emergentes conhecidas como "remediação verde" ou "fitorremediação" (Salt et al. 1995), as interações de micorrizas e metais tornam-se de grande importância na restauração de ecossistemas (Diaz et al., 1996). Neste contexto, dois aspectos principais devem ser considerados. O primeiro trata dos efeitos dos metais sobre os fungos micorrízicos e sua simbiose, enquanto o segundo trata dos efeitos dos fungos na absorção e transferência de metais do solo para a planta e na própria planta e, de suas conseqüências para a tolerância das plantas ao excesso de metais pesados (Nogueira, 1996; Leyval et al., 1997).

As micorrizas arbusculares podem ocorrer mesmo em solo altamente contaminado com metais pesados, porém, em geral, a colonização é muito reduzida nessas condições. Vários metais pesados são fungitóxicos, reduzindo a germinação dos esporos, crescimento micelial e, conseqüentemente, a colonização micorrízica (Nogueira, 1996). Griffioen et al. (1994) verificaram que, em local próximo a uma refinaria de Zn e contaminado com Zn e Cd, a *Agrostis capilaris*, uma espécie empregada em programas de reabilitação de solos contaminados com metais pesados (Vangronsveld et al., 1995), encontrava-se bastante colonizada, devendo, portanto, beneficiar-se da simbiose.

Os efeitos das MAs na absorção e translocação de metais na planta são ainda pouco conhecidos, mas, dependendo da planta, da concentração do metal no meio de crescimento e possivelmente da espécie de fungo, essa simbiose pode aumentar ou diminuir a absorção de certos metais.

Segundo Weissenhorn et al. (1995), a colonização radicular do milho em solo contaminado aumentou a massa vegetal e reduziu a absorção de Cd, Zn e Cu na parte aérea e raízes, fato também relatado para outras espécies (Dueck et al., 1986; Schüepp et al., 1987; Nogueira, 1996; Leyval et al., 1997). Isto indica que as MAs podem aliviar os efeitos adversos da fitotoxidez induzida pelo excesso de metais no solo e se revestem de importância ecológica e, mais recentemente, tecnológica, considerando a necessidade de reabilitar áreas poluídas com metais pesados, espalhadas por todo o mundo. Maximizar a colonização radicular de plantas em ambientes adversos, como em solos poluídos com metais pesados, é de grande interesse. Isto pode ser conseguido por meio de inoculação em grande escala o que, com o atual nível de conhecimento, é inviável, em razão da falta de inoculante comercial de fungos MAs. No entanto, a descoberta de substâncias de origem vegetal, capazes de estimular a colonização radicular por fungos MAs, como no caso do isoflavonóide formononetina (Nair et al., 1991), oferece uma alternativa para aumentar a colonização e atividade desses fungos (Siqueira et al., 1991a; Silva Jr. & Siqueira, 1997).

Como discutido em trabalhos já citados, a colonização micorrízica pode amenizar o estresse da fitotoxidez de metais e, à semelhança do que tem sido demonstrado para estresse induzido por resíduo de herbicida no solo (Siqueira et al., 1991b), a aplicação dessa substância pode favorecer o crescimento de plantas em solo com excesso de metais. Isto foi objeto do presente estudo, que utilizou o milho como planta-teste.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em casa de vegetação, do Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras (MG), no período de março a maio de 1996, em vasos com capacidade para 1,6 L de misturas de solo contaminado e não contaminado, que continham 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% em peso/peso de solo contaminado com metais pesados. O solo contaminado é remanescente de um Latossolo, bastante alterado, sem distinção de horizontes, proveniente de uma área de rejeito no pátio da Companhia Mineira de Metais (CMM) em Três Marias (MG), apresentando pH (água) = 6,0; V = 64%; matéria orgânica = 23 mg dm⁻³ e 28, 50, 16.904, 194, 219, 836 e 3 mg dm⁻³ de P, K, Zn, Cd, Pb,

Cu e Fe, respectivamente. Fósforo, potássio e metais pesados foram extraídos por Mehlich-1, e Ca, Mg e Al por KCl 1 N, conforme EMBRAPA (1979). O solo não contaminado empregado nas diluições é um Latossolo Vermelho-Escuro (LE) argiloso, coletado no município de São Sebastião da Vitória (MG), com pH (água) 4,8; V = 13%; matéria orgânica 25 mg dm⁻³ e 3, 41, 26, 9 e 64 mg dm⁻³ de P, K, Zn, Cu e Fe, respectivamente.

Visando equilibrar as propriedades entre os solos, o LE recebeu calagem com calcário dolomítico (PRNT = 100% e relação Ca:Mg = 4:1) para atingir 60% da saturação por bases. Vinte dias após a incubação, o solo recebeu também 100 mg kg⁻¹ de P na forma de superfosfato simples, deixando-se incubar por mais 14 dias. Vencido esse prazo, os solos foram misturados e devidamente homogeneizados com vistas em obter a proporção desejada, correspondente ao nível de contaminação. Em seguida, retiraram-se amostras para determinação dos teores de metais extraídos pelo Mehlich-1 (Quadro 1). A densidade de fungos micorrízicos nativos no LE era em torno de 1 esporo cm⁻³ de solo, sendo as espécies predominantes *Glomus occultum* Walker e *G. clarum* Nicolson e Schenck, enquanto o solo contaminado não apresentou esporos. Para contagem dos esporos, empregou-se o método de Gedermann & Nicolson, (1963) e centrifugação em sacarose diluída em água (50%), seguida de contagem em microscópio estereoscópico (20x).

O experimento constou de um fatorial 5 x 2 com cinco repetições, sendo cinco proporções de solo contaminado na mistura obtidas pela mistura de solo e aplicação ou não de solução de formononetina sintética fornecida pela Rhizotech, Inc. (Hopewell, New Jersey-EUA). A formononetina (7 hidroxi, 4 metoxi-isoflavona) foi pesada, dissolvida em metanol (Siqueira et al., 1991a) e diluída em 5 L de água destilada obtendo-se uma solução com 5 mg L⁻¹ de formononetina. Aplicaram-se 130 mL dessa solução por vaso, equivalente a 400 mg kg⁻¹ solo de

Quadro 1. Teores de metais extraídos pelo Mehlich-1 das misturas de solo antes do crescimento do milho

Metal	Proporção de solo contaminado na mistura, %				
	0	2,5	5,0	7,5	10,0
	mg dm ⁻³ de solo				
Zn	5	565	1.104	3.984	4.510
Cd	< 1	4	10	17	20
Cu	2	54	100	127	160
Pb	0	12	22	46	54

formononetina pura. No controle, foram adicionados 130 mL de água destilada que continham a mesma concentração de metanol aplicado na solução com formononetina. Em ambos os casos, as aplicações foram realizadas por meio de perfurações na superfície do solo, sendo feita uma única aplicação da substância antes da transferência das plântulas. Todas as misturas de solo foram inoculadas, aplicando-se, abaixo da semente, 5 mL de solo com 40 esporos mL⁻¹ de *G. etunicatum* Gedermann & Nicolson, multiplicado previamente em *Brachiaria decumbens* Stapf, cultivada em vasos.

Dois sementes de milho (*Zea mays* L., cultivar Ag 122), pré-germinadas, foram colocadas em cada vaso, com posterior desbaste, permanecendo uma planta por vaso. Durante o experimento, as plantas receberam 150 mg kg⁻¹ de K e 150 mg kg⁻¹ de N (em três vezes, em intervalos de 10 dias). A umidade dos vasos foi mantida ao redor de 60% do volume total de poros, por meio de pesagens periódicas e irrigação. Aos 45 dias, as plantas foram cortadas à altura da superfície do solo e avaliadas quanto à área foliar, peso da matéria seca da parte aérea e raízes e colonização micorrízica. Após a separação das raízes do solo, foram coletadas amostras de raízes finas para a avaliação da percentagem de colonização. Para isto, as raízes foram despigmentadas com KOH (10%), coloridas com Azul Tripiano e a percentagem de comprimento de raiz colonizada determinada conforme Giovannetti & Mosse (1980). A matéria seca das plantas foi obtida após secagem da parte aérea e raízes em estufa, com circulação de ar a 65°C até peso constante, sendo, em seguida, pesada e moída para análises de metais após digestão nítrico-perclórica. Os teores de Cu, Fe, Cd, Pb e Mn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e os teores de Zn por espectrometria de emissão atômica de plasma, induzido em argônio, nos laboratórios da Companhia Mineira de Metais, em Três Marias (MG).

Os resultados foram submetidos a análises de variância e regressão, utilizando os programas SANEST (Universidade Federal de Pelotas) e SAEG (Universidade Federal de Viçosa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento na proporção de solo contaminado na mistura causou redução acentuada na produção de massa seca da parte aérea e da área foliar do milho (Figura 1). No nível mais alto de contaminação, a inibição foi superior a 70% em relação ao solo sem contaminação. Os efeitos da formononetina dependeram do grau de contaminação e, embora significativos ($P \leq 0,05$) para todos os parâmetros, foram pequenos, exceto para matéria seca de raízes a 10% de contaminação, quando se mostraram mais

acentuados. Segundo os resultados, a aplicação de formononetina amenizou parte do impacto negativo causado pelo excesso de metais no solo para o milho inoculado. Como esta substância só é ativa no milho na presença de propágulos de fungos MAs (Siqueira et al., 1991a), seus efeitos no crescimento foram via estímulo à colonização micorrízica (Figura 2).

Tal como verificado para os parâmetros de crescimento, a contaminação do solo também exerceu efeito negativo na colonização micorrízica do milho (Figura 2). No nível mais alto de contaminação, a colonização foi reduzida em 75% em relação ao solo controle sem contaminantes, mesmo na presença de formononetina. No solo não contaminado, a aplicação dessa substância aumentou em quase 50% a colonização das raízes, confirmando os resultados de vários outros estudos com estes flavonóides em milho (Siqueira et al., 1991b; Silva Jr. & Siqueira, 1997). No entanto, esses incrementos diminuíram com a elevação da proporção de solo contaminado, sendo inexistente a 10%. Ainda assim, a aplicação de formononetina teve efeito sobre outros parâmetros avaliados.

O efeito adverso do excesso de metais sobre os microrganismos do solo já é bastante conhecido e evidenciado (Valsecchi et al., 1995), inclusive no solo utilizado no presente estudo (Dias Jr. et al., 1998). Altas concentrações de metais no solo reduzem a germinação dos esporos e o crescimento micelial (Nogueira, 1996; Leyval et al., 1997) e, como consequência, a colonização das raízes pelos fungos micorrízicos arbusculares, como já verificado para o milho por Vidal et al. (1996). Tais autores concluíram que o desenvolvimento da micorriza é mais sensível ao excesso de metais que o crescimento da planta.

Os teores dos diversos metais na massa seca da parte aérea e raízes do milho aumentaram proporcionalmente com elevação da contaminação, especialmente o Zn e Cd (Figura 3). Plantas de milho com formononetina apresentaram teores mais baixos de Zn tanto nas raízes quanto na parte aérea. Em solo contaminado, as plantas que receberam o isoflavonóide continham em torno de 20% menos Zn na parte aérea do que aquelas que não receberam a substância. Em termos gerais, o milho apresentou duas vezes mais Zn nas raízes que na parte aérea. Verificou-se que as plantas que cresceram em baixa contaminação já apresentavam teores desse elemento na matéria seca acima daqueles considerados críticos para toxidez, 400 mg kg⁻¹ de Zn na massa seca, conforme Barceló & Poschieder (1992). Isto corrobora os resultados de crescimento, cujos efeitos depressivos já são evidentes neste nível de contaminação. Tem sido sugerido que a redução na absorção de metais ou retenção destes nas raízes colonizadas pelos fungos micorrízicos confere proteção das plantas ao excesso de metais no solo (Leyval et al., 1997).

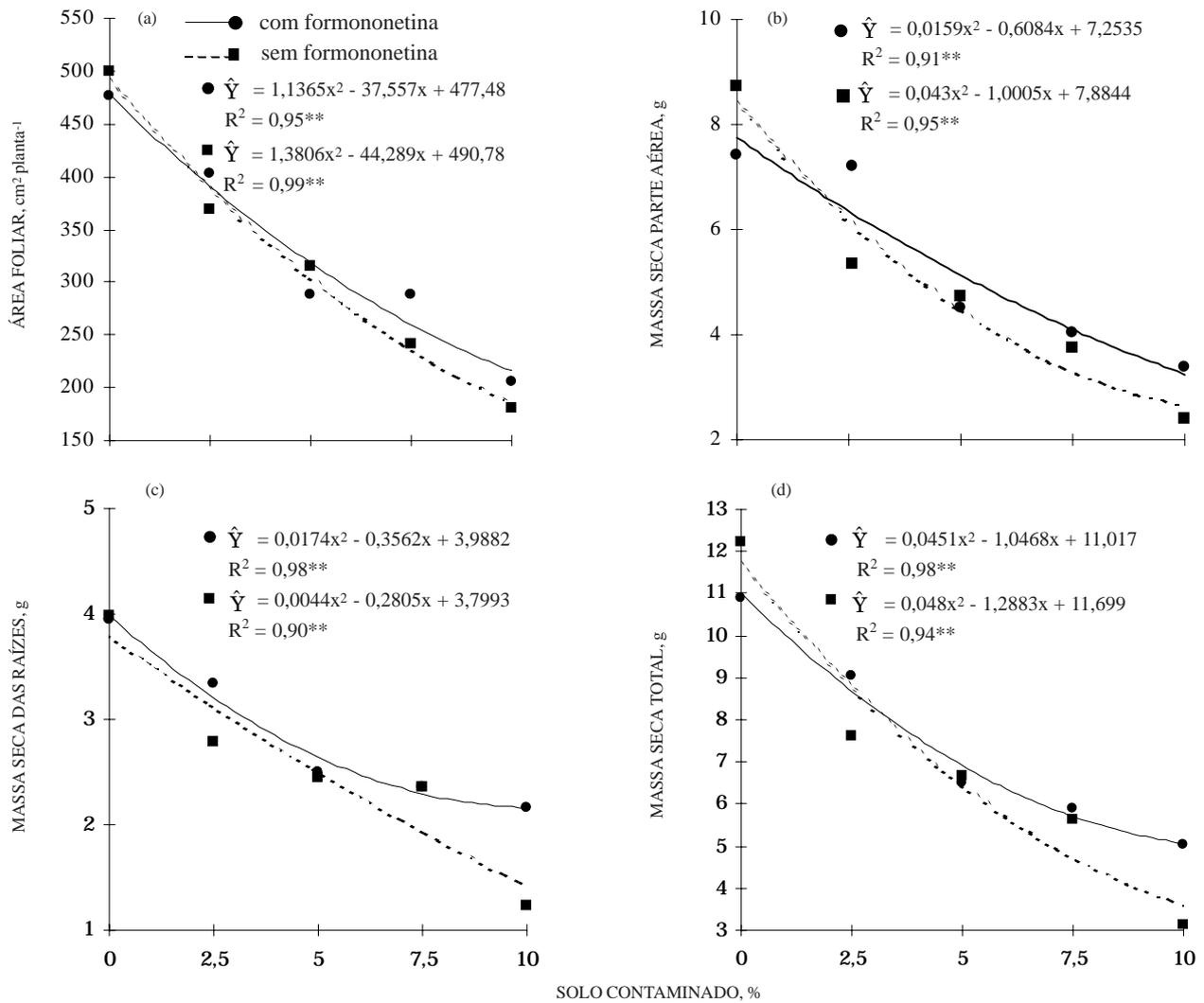


Figura 1. Crescimento do milho em função da proporção de solo contaminado com metais pesados e aplicação de formononetina no solo.

Os resultados deste trabalho indicam que o efeito da formononetina resulta de seu efeito indireto na absorção de Zn, considerando que houve redução nos teores de Zn igualmente na massa seca de raízes e da parte aérea. Os teores de Cd são da ordem de 1.000 vezes menores que aqueles observados para Zn. Estes aumentaram quase que linearmente na parte aérea em função da contaminação e praticamente não foram influenciados pela formononetina. Concentrações críticas de Cd iguais a 5 mg kg⁻¹ de matéria seca (Barceló & Poschieder, 1992) só foram verificadas com 5% ou mais de solo contaminado na mistura. Apesar dos elevados teores no solo, os teores de Pb e Cu na planta foram pouco afetados pelos tratamentos e por isto não são apresentados ou discutidos.

Os teores de Fe na parte aérea das plantas sem formononetina foram pouco influenciados pela contaminação do solo. Nas plantas com essa

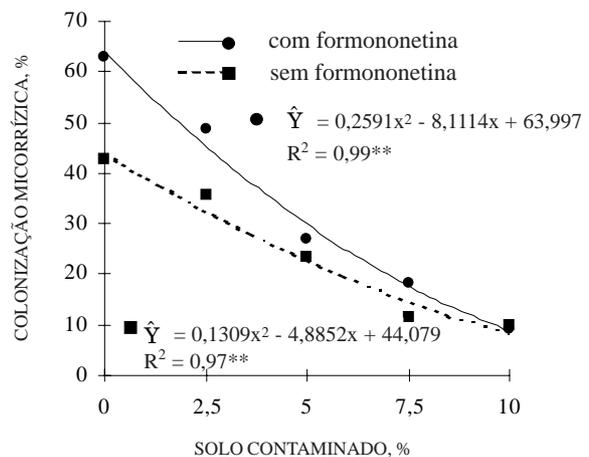


Figura 2. Colonização micorrízica do milho em função da proporção de solo contaminado com metais pesados e aplicação de formononetina.

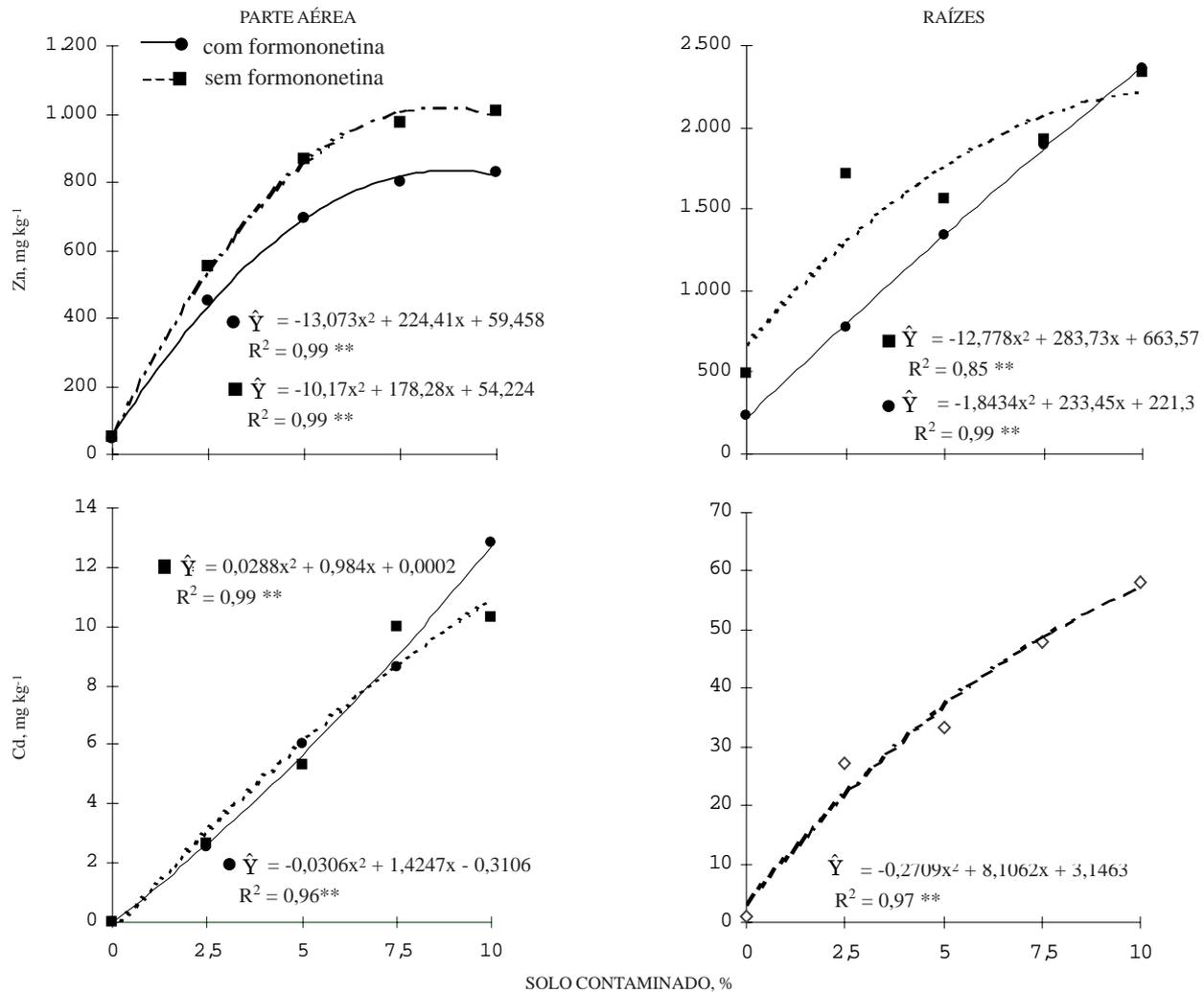


Figura 3. Teores de Zn e Cd na matéria seca da parte aérea das raízes do milho em função da proporção de solo contaminado com metais pesados e aplicação da formononetina.

substância, esses teores aumentaram até proporções intermediárias (em torno de 4%) de solo contaminado, decrescendo nas doses mais elevadas (Figura 4). A formononetina aumentou em até 60% o teor de Fe do milho, em decorrência do efeito positivo dessa substância na colonização micorrízica e de descobertas recentes que mostram ser as hifas fúngicas capazes de absorver o Fe do solo e translocá-lo para plantas de sorgo (Caris et al., 1998). O milho apresentou concentrações elevadas de Fe nas raízes, em média 4.000 mg kg⁻¹ de matéria seca. Observou-se tendência de queda no teor de Fe nas raízes com elevação da contaminação e não houve efeito significativo ($P \leq 0,05$) para a formononetina. O excesso de Zn tem efeito antagônico sobre o Fe, podendo até se manifestar como deficiência induzida de Fe (Alloway, 1990). De fato, a elevação na proporção de solo contaminado reduziu a razão Fe/Zn na parte aérea. Os valores desta razão são 1,4; 0,17; 0,12; 0,08 e 0,06 para plantas com

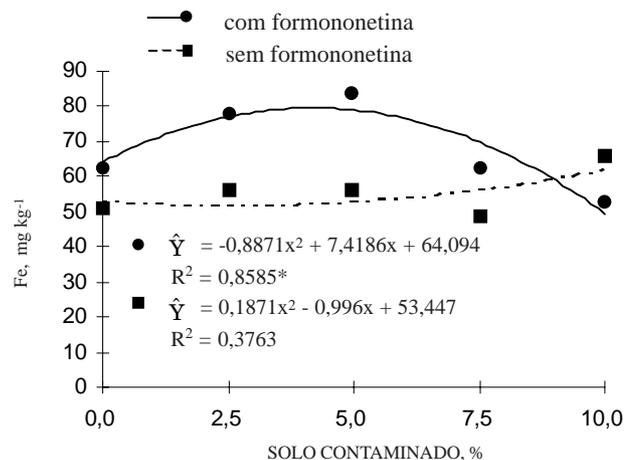


Figura 4. Teor de Fe na matéria seca da parte aérea do milho em função da proporção de solo contaminado com metais pesados e aplicação da formononetina.

formononetina que cresceram nas misturas com 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 de solo contaminado, respectivamente. Tais valores são 1,0; 0,10; 0,06; 0,05 e 0,07 para as mesmas misturas de solo e plantas sem formononetina. Portanto, decresceu a razão Fe/Zn com a elevação na contaminação com tendência para maiores valores nas plantas com formononetina nas contaminações mais baixas. Como a aplicação de formononetina aumentou a absorção de Fe e diminuiu a de Zn pelo milho no solo contaminado, este pode ser um mecanismo pelo qual esta substância ameniza a toxidez de Zn nesta espécie vegetal.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a formononetina, em razão de seu efeito na micorrização, proporciona, de modo indireto, uma nutrição mineral mais balanceada em solo contaminado, aliviando o estresse causado pelo excesso de Zn. O uso dessa substância pode facilitar a revegetação de solos com excesso de metais pesados e que contenham propágulos viáveis de fungos MAs, sendo, portanto, de grande interesse tecnológico atual.

LITERATURA CITADA

- ALLOWAY, B.J., ed. Heavy metals in soils. New York, John Wiley and Sons, 1990.339p.
- BAKER, A.J.M.; McGRATH, S.P.; SIDOLI, C.M.D. & REEVES, R.D. The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. Res. Conserv. Recycl., 11:41-49, 1994.
- BARCELÓ, J. & POSCHENRIEDER, Ch. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. Suelo Planta, 2:345-361, 1992.
- CARIS, C.; HORDT, W.; HAWKINS, H.J.; ROMHELD, V. & GEORGE, E. Studies of iron transport by arbuscular mycorrhizal hyphae from soil to peanut and sorghum plants. Mycorrhiza, 8:35-39, 1998.
- DIAZ, G.; AZCÓN-AGUILAR, C. & HONRUBIA, M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. Plant Soil, 180:241-249, 1996.
- DIAS Jr., H.E.D.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de industria de Zinco. R. Bras. Ci. Solo, 22:631-640, 1998.
- DUECK, Th.A.; VISSER, P.; ERNST, W.H.O. & SCHAT, H. Vesicular-arbuscular mycorrhizae decrease zinc toxicity to grasses growing in zinc-polluted soil. Soil Biol. Biochem., 18:331-333, 1986.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação dos Solos. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, 1979. Não paginado.
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc., 46:235-244, 1963.
- GRIFFIOEN, W.A.J.; IETSWAART, J.H. & ERNST, W.H.O. Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. Plant Soil, 158:83-89, 1994.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol., 84:482-500, 1980.
- LEYVAL, C.; TURNAU, K. & HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza, 7:139-153, 1997.
- NAIR, M.D.; SAFIR, G.R. & SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. Appl. Environ. Microbiol., 57:434-439, 1991.
- NOGUEIRA, A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. ed. Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1996. p.135-174.
- SALT, D.E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N.P.B.; DUSHENKOV, V.; ENSLEY, B.D.; CHET, I. & RASKIN, I. Phytoremediation: A novel strategy of the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology, 13:468-474, 1995.
- SCHÜEPP, H.; DEHN, B. & STICHER, H. Interaktionen zwischen VA-Mykorrhizen und Schwermetallbelastungen. Angew. Bot., 61:85-95, 1987.
- SILVA Jr., J.P. & SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorrizas no milho e na soja. R Bras. Fisiol. Veg., 9:35-41, 1997.
- SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. VA-micorrizae and mycorrhizal stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. Plant Soil, 34:233-242, 1991a.
- SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation and plant growth by flavonoid compounds. New Phytol., 118:87-93, 1991b.
- SIQUEIRA, J.O. & SAGGIN Jr., O.J. The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O milho em perspectiva, México, 1995. Anais. Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS/México, CIMMYT/UNDP, 1995. p.240-280.
- VALSECCHI, G.; GIGLIOTI, C. & FARINI, A. Microbial biomass, activity, and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals. Biol. Fertil. Soils, 20:253-259, 1995.
- VANGRONSVELD, J.; van ASSCHE, F. & CLIJTERS H. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. Environ. Pollut., 87:51-59, 1995.
- VIDAL, M.T.; ÁZCON-AGUILAR, C. & BAREA, J.M. Effect of heavy metals (Zn, Cd and Cu) on arbuscular mycorrhiza formation. In: ÁZCON-AGUILAR, C. & BAREA, J.M., eds. Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON MYCORRHIZAS, 4., Granada, 1994. Proceedings. Granada, European Commission, 1996. p.487-490.
- WEISSENHORN, I.; LEYVAL, C.; BELGY, G. & BERTHELIN, J. Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metals uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. Mycorrhiza, 5:245-251, 1995.