

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CAMPUS FREDERICO WESTPHALEN – RS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: AGRICULTURA E
AMBIENTE

Sinara Barros

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *Azospirillum brasilense* NO
DESENVOLVIMENTO DE SORGO E MILHO CULTIVADOS EM SOLO
CONTAMINADO COM COBRE**

Frederico Westphalen, RS
2022

Sinara Barros

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *Azospirillum brasilense* NO
DESENVOLVIMENTO DE SORGO E MILHO CULTIVADOS EM SOLO
CONTAMINADO COM COBRE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof.º Dr.º Rodrigo Ferreira da Silva

Frederico Westphalen, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Barros, Sinara
Fungos micorrízicos arbusculares e Azospirillum
brasileiro no desenvolvimento de sorgo e milho
cultivados em solo contaminado com cobre / Sinara
Barros.- 2022.
100 p.; 30 cm

Orientador: Rodrigo Ferreira da Silva
Coorientador: Clóvis Orlando da Ros
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós
Graduação em Agronomia - Agricultura e Ambiente, RS, 2022

1. Metal pesado 2. Gramíneas 3. Microrganismos
promotores de crescimento vegetal 4. Tolerância I.
Ferreira da Silva, Rodrigo II. da Ros, Clóvis Orlando
III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, SINARA BARROS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Sinara Barros

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *Azospirillum brasilense* NO
DESENVOLVIMENTO DE SORGO E MILHO CULTIVADOS EM SOLO
CONTAMINADO COM COBRE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Aprovada em 23 de junho de 2022:

Rodrigo Ferreira da Silva, Dr. (UFSM)
Presidente/Orientador

Vanderlei Rodrigues da Silva, Dr. (UFSM)

Lisandra Pinto Della Flora, Dr. (IFFAR)
(Por parecer)

Frederico Westphalen, RS
2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Leocídio e Edenir e meu irmão Silvio
por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem
nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e estar ao meu lado em todos os momentos.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente (PPGAAA) pela oportunidade.

Aos meus pais Leocídio e Edenír e meu irmão Silvío, por todo carinho e atenção e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Ao meu orientador e professor Rodrigo Ferreira da Silva pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

Aos professores Clovío Orlando da Ros, Genésio Mário da Ros e Vanderlei R. da Silva pelos ensinamentos e por disponibilizarem equipamentos e laboratórios para avaliações.

Aos membros da banca examinadora

Aos técnicos laboratoriais Andreia da R. Giovenardi, Lucindo Somavilla e Marcela de M. Torchelsen pela orientação, auxílio e concessão de equipamentos para o desenvolvimento de análises.

Ao Ricardo Turchetto, pelo carinho, atenção e por estar sempre ao meu lado durante essa caminhada.

Aos amigos e colegas de laboratório de Biologia e Microbiologia do solo pela ajuda e apoio na realização deste trabalho: Ana Paula da Silva, Eduardo Canepelo, Juliano B. Magalhães, Daniel Fontanive, Domenico M. Raffaele, Rafaela, Kétoni.

Ao demais amigos, professores e funcionários da UFSM/FW.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa.

Muito obrigado!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia”

(Robert Collier)

RESUMO

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *Azospirillum brasilense* NO DESENVOLVIMENTO DE SORGO E MILHO CULTIVADOS EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE

AUTOR: Sinara Barros

ORIENTADOR: Rodrigo Ferreira da Silva

O cobre é um elemento essencial para o desenvolvimento dos vegetais, porém em excesso no solo, se torna um grande problema para as plantas. Algumas plantas são capazes de tolerar estresses causados pelo cobre, bem como alguns microrganismos, como fungos e bactérias podendo auxiliar as plantas a se desenvolverem em ambientes contaminados. Diante disso, o objetivo geral do trabalho foi analisar o efeito de fungos micorrízicos arbusculares e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e tolerância de sorgo e milho cultivados em solo contaminado com cobre. Foram desenvolvidos três estudos onde o primeiro teve como objetivo determinar a influência da inoculação de *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e na tolerância ao cobre em plantas de milho e sorgo, o segundo foi analisar o comportamento de fungos micorrízicos no crescimento e desenvolvimento de milho e sorgo em solo contaminado com cobre e o terceiro analisar o efeito da coinoculação entre fungos micorrízicos e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho e sorgo em solo contaminado com cobre. Os resultados evidenciam que a parte aérea e radicular de plantas de milho e sorgo são reduzidas em altas concentrações de cobre no solo. A bactéria *Azospirillum brasilense* aumenta o desenvolvimento de milho e sorgo e a tolerância das plantas em solo contaminado com cobre e diminui a translocação do metal para parte aérea e grão. A inoculação dos fungos micorrízicos aumenta o fator de bioconcentração e índice de tolerância do milho e sorgo ao cobre. O milho foi mais responsivo a colonização micorrízica em raízes com a espécie *Acaulospora scrobiculata*. A inoculação de *Acaulospora scrobiculata* promoveu maior massa seca de raiz, volume de raiz e colonização micorrízica de sorgo em solo contaminado com cobre. A inoculação de *Acaulospora scrobiculata* e a coinoculação com *Azospirillum brasilense* aumentam massa seca, volume de raiz, área foliar de milho em solo não contaminado com cobre. A inoculação com *Acaulospora scrobiculata* e as coinoculações de fungos micorrízicos com *Azospirillum brasilense* reduzem o teor de cobre na parte aérea e radicular de plantas de sorgo.

Palavras-chave: Metal pesado. Gramíneas. Microrganismos promotores do crescimento vegetal. Tolerância.

ABSTRACT

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND *Azospirillum brasilense* IN THE DEVELOPMENT OF SORGHUM AND CORN CULTIVATED IN COPPER CONTAMINATED SOIL

AUTHOR: Sinara Barros

ADVISOR: Rodrigo Ferreira da Silva

Copper is an essential element for the development of vegetables, but in excess it becomes a major problem for the environment. Some plants are able to tolerate abiotic stresses, including those caused by copper and other heavy metals, in addition, some microorganisms such as fungi and bacteria can help plants to develop in contaminated environments. Therefore, the general objective of this work was to analyze the effect of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum brasilense* on the development and tolerance of sorghum and corn grown in soil contaminated with copper. Three studies were carried out, the first of which aimed to determine the influence of *Azospirillum brasilense* inoculation on the development and tolerance to copper in maize and sorghum plants, the second was to analyze the behavior of mycorrhizal fungi in the growth and development of corn and sorghum in soil contaminated with copper and the third to analyze the effect of co-inoculation between mycorrhizal fungi and *Azospirillum brasilense* on corn and sorghum in soil contaminated with copper. The results show that the aerial and root parts of maize and sorghum plants are reduced at high concentrations of copper in the soil. The bacterium *Azospirillum brasilense* increases the development of corn and sorghum and the tolerance of plants in soil contaminated with copper and decreases the translocation of the metal to shoots and grain. Inoculation of mycorrhizal fungi increases the bioconcentration factor and tolerance index of corn and sorghum to copper. Maize was more responsive to mycorrhizal colonization in roots with the species *Acaulospora scrobiculata*. Inoculation of *Acaulospora scrobiculata* promotes greater root dry mass, root volume and mycorrhizal colonization of sorghum in soil contaminated with copper. Inoculation of *Acaulospora scrobiculata* and co-inoculation with *Azospirillum brasilense* increase root dry mass, root volume, corn leaf area in soil not contaminated with copper. Inoculation with *Acaulospora scrobiculata* and co-inoculations of mycorrhizal fungi with *Azospirillum brasilense* reduce the copper content in shoots and roots of sorghum plants.

Keywords: Heavy metal. Grasses. Microorganisms that promote plant growth. Tolerance

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 - Altura de plantas (AP), diâmetro de colmo (DC) de sorgo e de milho e nº de perfilhos de sorgo submetido a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 28
- FIGURA 2 - Altura de planta (AP) e diâmetro de colmo (DC) de sorgo e de milho e nº de perfilhos de sorgo com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. 30
- FIGURA 3 - Massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) de plantas de sorgo e de milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 31
- FIGURA 4 - Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de sorgo e milho com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. 32
- FIGURA 5 - Volume de raiz (VR) e Área superficial específica (ASE) de plantas de milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹) com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. 33
- FIGURA 6 - Volume de raiz (VR) e Área superficial específica (ASE) de plantas de sorgo submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 34
- FIGURA 7 - Volume de raiz (VR) e Área superficial específica (ASE) de plantas de sorgo com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. 35
- FIGURA 8 - Teor de cobre na parte aérea (CuPA) de plantas de milho e sorgo e teor de cobre na raiz (CuR) de sorgo submetidos a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 36
- FIGURA 9 - Teor de cobre na parte aérea (CuPA) de plantas de milho e sorgo e teor de cobre na raiz (CuR) de sorgo com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. 37
- FIGURA 10 - Teor de cobre no grão (CuG) e na raiz (CuR) de plantas de milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹) com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. 38

CAPÍTULO 2

- FIGURA 11 - Teor pseudo-total e cobre disponível em solo cultivado com sorgo e milho com inoculação de fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizogloium clarum* e testemunha sem inoculação) e doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 51
- FIGURA 12 - Altura de planta (AP) e volume de raiz (VR) de sorgo e de milho submetidos a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 52
- FIGURA 13 - Massa seca de parte aérea (MSPA) de sorgo e massa seca de raiz (MSR) de sorgo e milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 55
- FIGURA 14 - Porcentagem de colonização micorrízica do sorgo e milho cultivado em diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹), inoculados com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizogloium clarum* e Testemunha sem inoculação. 58
- FIGURA 15 - Teor de cobre na raiz (CuR), na parte aérea (CuPA) de sorgo e milho e no grão (CuG) do milho, cultivado em solo com diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 59
- FIGURA 16 - Índice de tolerância (ITOL) e Índice de translocação (ITRA) de sorgo e milho cultivado em diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 61
- FIGURA 17 - Fator de bioconcentração e bioacumulação de sorgo e milho cultivado em diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹). 63

CAPÍTULO 3

- FIGURA 18 - Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de sorgo (A) e milho (B) cultivado sem e com adição de 400 mg kg⁻¹, com inoculação de *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizogloium clarum*, *Acaulospora*+*Azospirillum*, *Rhizogloium*+*Azospirillum*. 81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Análise física e química do solo utilizado para cultivo de sorgo e milho.26

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Análise física e química do solo utilizado para cultivo de sorgo e milho.48

TABELA 2 - Altura de planta (AP), Diâmetro de colmo (DC) e volume de raiz (VR) de sorgo e milho e número de perfilhos de sorgo inoculados com fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum*, testemunha, sem inoculação).
.....54

TABELA 3 - Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de sorgo e milho inoculadas com fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum* e testemunha, sem inoculação).56

TABELA 4 - Teor de cobre em raiz (TCR) e parte aérea (TCPA) de sorgo e milho e teor de cobre no grão (TCG) de milho inoculado com fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum* e Testemunha, sem inoculação).60

TABELA 5 - Índice de tolerância (ITOL), Índice de translocação (ITRA), Fator de bioconcentração e Fator de bioacumulação de sorgo e milho inoculados com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum* e testemunha sem inoculação.
.....64

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Análise física e química do solo utilizado para cultivo de sorgo e milho.73

TABELA 2 - Diâmetro de colmo (DC), Número de perfilhos, área foliar (AF), Clorofila a e b da cultura do sorgo e Altura de planta (AP), Diâmetro de colmo (DC), Massa seca de parte aérea (MSPA), Clorofila a e b na cultura do milho cultivadas em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ de cobre.....76

TABELA 3 - Diâmetro de colmo (DC), Nº perfilhos, Área foliar (AF), Clorofila a e b da cultura do sorgo e Altura de planta (AP), diâmetro de colmo (DC), Massa seca de parte aérea (MSPA), Clorofila a e b da cultura do milho inoculadas com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum*, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglyphus clarum* + *Azospirillum brasilense* e testemunha (sem inoculação).....77

TABELA 4 - Altura de planta (AP), Massa seca de raiz (MSR) do sorgo e Área foliar (AF), Massa seca de milho inoculados com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus*

clarum, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglosum* + *Azospirillum brasilense* e testemunha (sem inoculação), cultivados em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ de cobre....78

TABELA 5 - Massa seca de parte aérea (MSPA), Volume de raiz (VR) de sorgo e Volume de raiz (VR) de milho inoculadas com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum*, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglosum clarum* + *Azospirillum brasilense*, testemunha (sem inoculação) e cultivados em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ de cobre..80

TABELA 6 - Densidade (Número Mais Provável) de *Azospirillum brasilense* (UFC/g) em raízes de sorgo e milho cultivados em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ e com diferentes fontes de inóculo.83

TABELA 7 - Efeito simples para o tratamento sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ e efeito simples de fontes de inóculo (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum*, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora s.* + *Azospirillum b.*, *Rhizoglosum c.* + *Azospirillum b.*, testemunha sem inoculação) no teor de cobre na parte aérea (CuPA) e na raiz (CuR) de sorgo e no teor de cobre na parte aérea (CuPA) e na raiz (CuR) e no grão (CuG) de milho.84

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 17 |
| 2.1 COBRE | 17 |
| 2.2 MILHO E SORGO | 18 |
| 2.3 MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL | 20 |
| 3 CAPÍTULO 1: <i>Azospirillum brasilense</i> E O DESENVOLVIMENTO DE SORGO E MILHO CULTIVADOS EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE | 23 |
| 3.1 RESUMO..... | 23 |
| 3.2 ABSTRACT..... | 23 |
| 3.3 INTRODUÇÃO | 24 |
| 3.4 MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 3.6 CONCLUSÃO | 39 |
| 3.7 REFERÊNCIAS..... | 39 |
| 4 CAPÍTULO 2: FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO DESENVOLVIMENTO DE MILHO E SORGO EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE | 46 |
| 4.1 RESUMO..... | 46 |
| 4.2 ABSTRACT..... | 46 |
| 4.3 INTRODUÇÃO | 47 |
| 4.4 MATERIAIS E MÉTODOS | 48 |
| 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 50 |
| 4.6 CONCLUSÃO | 65 |
| 4.7 REFERÊNCIAS..... | 65 |
| 5 CAPÍTULO 3: COINOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> E FMAs NO DESENVOLVIMENTO E TEORES DE COBRE EM MILHO E SORGO CULTIVADOS EM SOLO CONTAMINADO | 71 |
| 5.1 RESUMO..... | 71 |
| 5.2 ABSTRACT..... | 71 |
| 5.3 INTRODUÇÃO | 72 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 5.4 MATERIAL E MÉTODOS | 73 |
| 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 75 |
| 5.6 CONCLUSÃO | 85 |
| 5.7 REFERÊNCIAS | 85 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 91 |
| 7 CONCLUSÃO GERAL | 93 |
| REFERÊNCIAS | 94 |

1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para as plantas e requerido em pequenas quantidades, para a cultura do milho é necessário 12 g de cobre para cada tonelada de grãos produzidos por hectare. Atua em diversos processos metabólicos, transporte e sinalização celular, além de ser cofator de enzimas e auxiliar na estabilidade de proteínas. No entanto, é considerado um metal pesado e a sua presença em grandes quantidades no solo o torna tóxico tanto para as plantas como para o meio ambiente. A contaminação do solo por esse elemento tem aumentado nos últimos anos em decorrência do uso frequente de fertilizantes, corretivos e fungicidas a base de cobre na agricultura, além de áreas de mineração e industriais. Nas plantas, pode induzir o desfolhamento precoce, necrose foliar e principalmente causa redução da altura de plantas e do sistema radicular (FANCELLI, 2008; ANDREAZZA, 2013; AMBROSINI, 2016).

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é o quinto cereal mais plantado no globo, atrás somente do trigo, arroz, milho e cevada. Compõe a alimentação básica de milhões de pessoas principalmente na África e Ásia. No Brasil é usado basicamente para alimentação animal, por meio de silagem e ração. Possui grande importância devido a maior tolerância ao déficit hídrico, comparado com outras culturas como o milho e com isso tem sido uma opção de cultivo em épocas com baixo regime de chuvas (MENEZES *et al.*, 2021). O milho (*Zea mays*) tem sido considerado a maior cultura agrícola do mundo nas últimas décadas, sendo utilizado para diversos fins, como combustíveis, bebidas, alimentação humana e animal. Seu cultivo ocorre em todas as regiões do país e compõe diversos sistemas tanto sucessão, consórcio e rotação de culturas (CONTINI *et al.*, 2019).

Fungos micorrízicos arbusculares são microrganismos capazes de colonizar, inter e intracelularmente, as raízes das plantas, formando uma associação mutualística em 80% das espécies vegetais. Apresentam hifas que atuam como uma extensão do sistema radicular, aumentando a absorção de nutrientes especialmente os de pouca mobilidade como o fósforo. Entre os benefícios para as plantas, destaca-se o aumento da área de absorção do sistema radicular, maior crescimento, melhor nutrição e resistência a doenças. Algumas espécies de fungos apresentam capacidade de tolerar metais pesados, através da compartimentalização desses elementos em suas estruturas, diminuindo a disponibilidade às plantas e com isso protegendo-a da toxicidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal, assim como os fungos micorrízicos, são microrganismos capazes de promover o desenvolvimento dos vegetais por meio de diversos

mecanismos. Entre os grupos de bactérias, existem as rizobactérias que são aquelas que habitam a rizosfera e em associação com as raízes das plantas. O gênero *Azospirillum* é um dos mais conhecidos, especialmente relacionado com gramíneas, devido a sua capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio da atmosfera, no entanto, possui outras características que aumentam sua importância, como a produção de reguladores vegetais, solubilização de nutrientes, melhorias no sistema radicular das plantas, permitindo maior absorção de água e nutrientes (COHEN *et al.*, 2015).

Muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de encontrar maneiras de melhorar a utilização de solos contaminados com metais pesados, possibilitando que os mesmos voltem a ser agricultáveis. Uma das formas viáveis de ser implementada é a utilização de microrganismos que apresentam capacidade de proteger as plantas, dificultando a absorção de metais pelos vegetais. Porém, nem todos os microrganismos apresentam tal característica, diante disso, tornam-se necessários estudos que identifiquem espécies de microrganismos capazes de tolerar a presença de contaminantes e que impeçam a translocação dos mesmos pelas partes da planta. Neste sentido, foram estabelecidas algumas hipóteses para nortear o desenvolvimento do trabalho, que são: a inoculação de *Azospirillum brasilense* aumenta o crescimento de sorgo e milho em solo contaminado com cobre; Fungos micorrízicos arbusculares melhoram o desenvolvimento de sorgo e milho e reduzem a toxicidade de cobre nas plantas; A coinoculação de *Azospirillum brasilense* e fungos micorrízicos arbusculares aumentam o crescimento de sorgo e milho em solo contaminado com cobre. O objetivo geral do trabalho foi analisar a influência de fungos micorrízicos arbusculares e *Azospirillum brasilense* no crescimento e desenvolvimento de sorgo e milho cultivados em solo contaminado com cobre.

Para atender as hipóteses do trabalho, foram desenvolvidos três experimentos: o primeiro teve como objetivo determinar a influência da inoculação de *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e na tolerância ao cobre em plantas de milho e sorgo, o segundo analisar o comportamento de fungos micorrízicos no crescimento e desenvolvimento de milho e sorgo em solo contaminado com cobre e o terceiro analisar o efeito da coinoculação entre fungos micorrízicos e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e teores de cobre em milho e sorgo cultivados em solo contaminado com cobre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COBRE

O cobre (Cu) é um elemento químico que ocorre de forma natural no solo, sendo considerado um micronutriente essencial para as plantas, participando do metabolismo e atuando como parte estrutural de algumas enzimas (MARQUES *et al.*, 2018). Tem papel fundamental em processos como fotossíntese, respiração, desintoxicação de radicais superóxidos, na lignificação, conferindo maior resistência das plantas às doenças e também é importante na fase reprodutiva, na formação de grãos, frutos e sementes (KIRKBY; ROMHELD, 2007). A deficiência desse elemento pode provocar diversas alterações, inclusive a redução da produtividade (GONÇALVES *et al.*, 2019). Contudo, altas concentrações desse metal podem provocar distúrbios fisiológicos, bioquímicos e morfo-anatômicos, acarretando em diversas consequências para as plantas como inativação de enzimas citoplasmáticas, estresse oxidativo, redução dos processos de fotossíntese, comprometendo o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (MARQUES *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2016). Além disso, pode causar a contaminação da água e também ser tóxico para o ser humano, causando irritação e corrosão da mucosa, problemas hepáticos, renais e irritação do sistema nervoso (SANTANA, 2018; BASSO; KIANG, 2017).

De acordo com a legislação, existem limites de concentração de cobre, os quais não oferecem riscos a saúde e ao ambiente, no caso dos corpos hídricos superficiais é de 0,5 mg L⁻¹ pela resolução nº355 (CONSEMA, 2017). Para solo de áreas agrícolas, o limite máximo para cobre total é de 200 mg kg⁻¹ de solo sem que haja intervenção, de acordo com resolução nº420 (CONAMA, 2009). A fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) indica valores de referência de acordo com o tipo de solo para o estado do Rio Grande do Sul, sendo que, para solos originados de rochas vulcânicas do Planalto, o valor é de 203 mg kg⁻¹ (FEPAM, 2014).

A toxidez por cobre pode provocar algumas alterações na morfologia do sistema radicular como redução do crescimento, aumento do diâmetro médio e a lignificação das raízes. Essas alterações reduzem o volume de solo explorado pelas plantas, conseqüentemente, diminui a absorção de nutrientes e água, afetando o seu desenvolvimento (DE CONTI, 2018). Altos teores de cobre também causam redução na concentração de clorofilas, especialmente em folhas

jovens, além de diminuição da taxa fotossintética, devido ao efeito deste metal no transporte de elétrons no processo de fotossíntese (YANG *et al.*, 2011; CAMBROLLÉ *et al.*, 2012).

Uma das formas de minimizar os efeitos nocivos de metais pesados, em especial o cobre, é através da fitorremediação, que consiste no uso de plantas, formando um sistema solo-planta-contaminante (MENEGAES *et al.*, 2019). As plantas podem atuar nesse processo por meio de diversos mecanismos, como, a absorção e acumulação dos metais pesados nos tecidos vegetais (fitoextração), adsorção dos metais no sistema radicular (fitoadsorção), também pode liberar compostos no solo causando a imobilização os metais (fitoestabilização), além de estimular o trabalho de microrganismos nesse processo (ESTRELA *et al.*, 2018).

A maioria das plantas é capaz de tolerar estresses abióticos, entre eles, os causados por cobre e outros metais pesados. Os mecanismos de tolerância desses vegetais estão relacionados a resposta fisiológica e bioquímica de cada espécie, além da capacidade de translocar cobre na planta (COMIRAN, 2017). A capacidade de tolerar metais também irá depender da espécie a ser utilizada, neste sentido, são necessários estudos que identifiquem espécies vegetais tolerantes as características do local e também ao contaminante (MARQUES *et al.*, 2011; ZANCHETA *et al.*, 2011).

Tiecher *et al.* (2016), verificaram que plantas de milho cultivadas em solo com teor de 120,8 mg kg⁻¹ de cobre, tiveram seu desenvolvimento reduzido devido a diminuição da área fotossintética e desequilíbrio na atividade enzimática. Silva (2019), observou que doses acima de 160 mg kg⁻¹ reduziram o diâmetro de colmo, altura de planta, número de perfilhos e volume de raiz na cultura do sorgo, afetando seu potencial produtivo e evidenciou resultados similares para a cultura da soja, com redução do diâmetro de caule, altura de plantas e comprimento de raiz com o aumento das doses de cobre.

2.2 MILHO E SORGO

O milho (*Zea Mays* L.) é uma espécie anual pertencente à família Poaceae. É uma das plantas com maior interesse econômico no mundo e no Brasil, sendo cultivada em todas as regiões do país (COSTA, 2018). Na safra 2021/22, a estimativa de área plantada foi de 21,3 milhões de hectares, com produção de 115,6 milhões de toneladas, com produtividade média de 5443 kg ha⁻¹(CONAB, 2022).

É considerado uma boa fonte energética, sendo rico em vitaminas, proteínas, gorduras, amido e carboidratos (ABIMILHO, 2018). Sua utilização é muito variada, sendo utilizado tanto como alimento, quanto para uso industrial e energético, com mais da metade da produção

destinada para fabricação de rações de uso animal. Como alimento, pode ser usado na fabricação de fubás, farinhas, canjicas e óleos, além de ser empregado em produtos mais elaborados, como xarope de glicose (utilizado na produção de balas, doces em pasta). Outro produto elaborado a partir do milho, é o etanol, o qual possui importância global, sendo a principal fonte de bionergia nos Estados Unidos (SOLOGUREN, 2015).

Por ser uma cultura de grande interesse, tem-se cultivado em diversas regiões do mundo e em diferentes altitudes, estabelecendo-se desde as localidades situadas abaixo do nível do mar, como a Região do Mar Cáspio, até as regiões com mais de 2.500 m de altitude, como os Andes Peruanos. Isso é possível, devido à seleção de genótipos e aprimoramento das técnicas de manejo (FANCELLI, 2015). Segundo a ABIMILHO (2022), a produção de milho no mundo na safra 2020/21 foi de 1,133 bilhão de toneladas em uma área total de 196,39 milhões de hectares.

O milho é uma planta muito exigente em nutrientes, incluindo o Cobre (Cu), o qual está relacionado com o transporte de elétrons durante as reações químicas e, cuja a deficiência pode ser observada a partir da produção de folhas verdes escuras, com manchas necróticas que iniciam no ápice das folhas jovens, se estendendo para as demais áreas. As folhas também podem ficar retorcidas e mal formadas (TAIZ *et al.*, 2017). Contudo, quando o cobre está presente no solo em nível de contaminação, torna-se tóxico ao milho, provocando redução de altura de planta, área foliar, rendimento (BARBOSA *et al.*, 2013), massa seca de parte aérea e de raiz (SEIDEL *et al.*, 2009).

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma planta pertencente à família Poaceae, nativo da África. Em todo o mundo, existem mais de 7 mil genótipos deste cereal, e o seu cultivo é de extrema importância nos continentes asiático e africano, e em outras regiões semiáridas do mundo, onde é utilizado na alimentação humana, além disso, é o quinto cereal mais produzido no mundo, ficando atrás somente das culturas do arroz, trigo, milho e cevada. No Brasil, o sorgo é cultivado principalmente para produção de grãos e forragem (FILHO; RODRIGUES, 2015; USDA, 2021). Segundo a Conab (2022), a área destinada ao plantio de sorgo no Brasil, na safra 2021/22 foi de 950,2 mil hectares, com uma produção de 3,04 milhões de toneladas e produtividade de 3201 kg ha⁻¹.

O sorgo se destaca no uso para a alimentação animal devido ao elevado potencial produtivo, fonte de energia para o arração animal, possui grande versatilidade para ensilagem, feno, pastejo direto, além de ser uma planta resistente a períodos prolongados de déficit hídrico. Além disso, se adapta a climas tropicais e temperados, possui elevada eficiência na utilização da água, tolerância a estiagens e pela capacidade de produzir grandes quantidades

de biomassa lignocelulósica (FILHO; RODRIGUES, 2015). Essa planta apresenta um sistema radicular vigoroso, capaz de explorar camadas profundas do solo, o que permite maior extração e reciclagem de nutrientes, além de contribuir com a descompactação do solo em sistemas de rotação de culturas (SODRÉ-FILHO, 2013).

Em regiões que possuem períodos de seca, a cultura do sorgo é uma boa opção de cultivo nessa época, justamente por ser mais resistente ao déficit hídrico que outras culturas como o milho, por exemplo. Também apresenta grande amplitude de semeadura e flexibilidade de implantação (AMADUCCI *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2021). A cultura do sorgo apresenta sensibilidade ao cobre, principalmente quando em elevada concentração no solo, podendo causar efeitos negativos como redução do diâmetro de colmo, altura de planta, número de perfilhos (SILVA, 2019) além de diminuição da massa seca de parte aérea e radicular (ZANCHETA *et al.*, 2011; TAIZ *et al.*, 2017).

2.3 MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

Os fungos micorrízicos arbusculares são organismos biotróficos obrigatórios pertencentes ao subfilo Glomeromycotina (SPATAFORA *et al.*, 2016) e estão presentes em quase todas as famílias de plantas cultivadas na agricultura, com exceção das Crucíferas (VALADARES *et al.*, 2016). O surgimento desses microrganismos coincide com o aparecimento dos primeiros vegetais, a cerca de 400 milhões de anos, porém, o estudo da associação de FMAs com plantas foi aprofundado apenas no século XIX. No Brasil, o primeiro trabalho documentado sobre micorrizas foi em 1970 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Esses fungos representam uma relação fundamental entre as plantas e os nutrientes minerais do solo e estão ganhando interesse como fertilizantes naturais (BERRUTI *et al.*, 2016). De acordo com Cristino *et al.* (2019), os fungos micorrízicos apresentam capacidade em realizar interações simbióticas mutualistas com as raízes das plantas favorecendo a absorção de água e nutrientes, além de aumentar a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos. Os FMAs quando associados aos vegetais, podem produzir estruturas variadas, como hifas (intra e extrarradiculares), esporos, vesículas e arbúsculos (MIRANDA, 2008).

O efeito dos fungos micorrízicos sobre o crescimento das plantas é especialmente significativo com relação aos nutrientes de baixa mobilidade no solo, que se movem preferencialmente por difusão, processo extremamente lento. Dentre estes nutrientes, destacam-se o macronutriente fósforo (P) e os micronutrientes zinco (Zn) e cobre (Cu) (VALADARES *et al.*, 2016).

Os fungos micorrízicos arbusculares também apresentam papel importante na proteção das plantas contra altas concentrações de cobre no solo, podendo atuar de diversas formas como através do acúmulo de metal em órgãos não vitais, retenção no micélio fúngico e nas paredes celulares (RUSCITTI *et al.*, 2017). No entanto, o efeito protetor dos fungos micorrízicos varia de acordo com a espécie fúngica e da sua compatibilidade com a espécie vegetal (MEIER *et al.*, 2011).

Ao inocular espécies de FMAs em videira cultivada em solo com altos teores de cobre, Rosa *et al.* (2016) evidenciaram maior produção de massa seca de folhas e caule e maior colonização micorrízica em raízes de plantas inoculadas com *R. clarus*. Turchetto (2021) trabalhando com trigo em solo contaminado com cobre, constatou maior altura de planta, comprimento de raiz e produtividade com a inoculação das espécies *Acaulospora colombiana* e *Gigaspora margarita*.

Na cultura do milho, diversos trabalhos já evidenciaram o benefício da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, como o aumento da parte aérea (SANTOS *et al.*, 2018), incremento nas variáveis área foliar, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e diâmetro de caule (NUNES *et al.*, 2019) e melhor desenvolvimento inicial na cultura do algodão e milho (SOUZA *et al.*, 2015). Na cultura do sorgo, a inoculação com *Glomus etunicatum* favoreceu a produção de matéria seca e de grãos, além de aumentar as concentrações foliares de N, P, K, Zn e Cu (BRESSAN *et al.*, 2001).

As Bactérias promotoras de crescimento vegetal são microrganismos que colonizam a rizosfera e/ou tecidos internos da planta (endofíticas) e promovem direta ou indiretamente o seu crescimento. Essas bactérias podem produzir fito-hormônios e substâncias osmorreguladoras, que levam à proteção e ao aumento do sistema radicular, e, conseqüentemente, maior absorção de água e nutrientes do solo (COHEN *et al.*, 2015).

Entre os diversos gêneros de bactérias promotoras de crescimento vegetal, *Azospirillum* spp. é um dos mais estudados principalmente na cultura do milho, trigo e outras gramíneas. Possui função de fixar biologicamente o nitrogênio da atmosfera, além de aumentar a superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, aumentar o volume de solo explorado por elas (MILLÉO; CRISTÓFOLI, 2016). Estudos mostram que a inoculação com *Azospirillum Brasilense* proporciona melhor nutrição e desenvolvimento da cultura do milho, com incremento na produtividade de grãos (SOUZA *et al.*, 2019). Esse aumento de produtividade está associado ao aumento do número de fileiras de grãos por espiga, números de grãos por fileira e massa de mil grãos (SCHAEFER, 2016). Em relação a cultura do sorgo, Nakao *et al.* (2018) evidenciaram que a inoculação de sementes com a bactéria *Azospirillum brasilense*

aumentou a produção de massa seca vegetal para ensilagem. Resultado semelhante foi obtido por Andreotti (2016), utilizando a cultivar Rancheiro e de dupla aptidão A9902.

Essas bactérias também são capazes de desenvolver mecanismos de resistência ao cobre, através da redução do transporte desse metal, complexação e acúmulo no interior das células (ANDREAZZA, 2009). Silva (2019), avaliando a bactéria *Azospirillum brasilense* na cultura do sorgo em solo contaminado com cobre, constatou redução na concentração de metal na parte aérea das plantas devido a inoculação da bactéria, a qual dificultou a translocação de cobre para as demais partes da planta. Resultado semelhante foi obtido por Turchetto (2021) com a cultura do trigo. Neste sentido, o uso de rizobactérias com resistência a metais pesados pode ser uma alternativa para o crescimento de espécies vegetais em solos contaminados (RAJKUMAR; FREITAS, 2008).

A coinoculação de rizobactérias e fungos micorrízicos arbusculares é capaz de modificar a rizosfera e as interações que ocorrem, potencializando os efeitos benéficos às plantas, por meio do aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes, maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, além de maior proteção contra patógenos (RAMASAMY *et al.*, 2011). Resultados positivos foram encontrados para mudas de oliveira, onde a coinoculação entre FMAs e rizobactérias proporcionou maior altura de planta, massa fresca de parte aérea e raiz (COSTA; MELLONI, 2019). Também afetou positivamente o teor nutricional e colonização micorrízica em plantas de *Zingiber spectabile* (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em plantas de milho, a coinoculação de fungos micorrízicos e rizobactérias aumentou a biomassa das plantas e a absorção de nutrientes (DHAWI; DATTA; RAMAKRISHNA, 2015).

3 CAPÍTULO 1: *Azospirillum brasilense* E O DESENVOLVIMENTO DE SORGO E MILHO CULTIVADOS EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE

3.1 RESUMO

O cobre é um micronutriente essencial para as plantas, porém, em alta concentração pode ser tóxico para o meio ambiente. Microrganismos como fungos micorrízicos e algumas bactérias melhoram o desenvolvimento das plantas e também possuem capacidade de tolerar elevadas concentrações de metais pesados. Objetivou-se avaliar a influência da bactéria *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e na tolerância ao acúmulo de cobre nas plantas de milho e sorgo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2x5, sendo testado a bactéria *Azospirillum brasilense*, testemunha sem inoculação e cinco doses de cobre (0 (teor natural do solo); 100; 200; 300 e 400 mg de cobre kg⁻¹) e sete repetições. Avaliou-se altura de planta, diâmetro de caule, número de perfilhos, volume de raiz, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, área superficial específica, teor de cobre no grão, parte aérea e raiz e cobre pseudo-total no solo. A parte aérea e radicular de plantas de milho e sorgo foram reduzidas em altas concentrações de cobre no solo. A bactéria *Azospirillum brasilense* melhorou o desenvolvimento de milho e sorgo, aumentou a tolerância das plantas ao cobre e diminuiu a translocação do metal para parte aérea e grão.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*. Cobre. Milho. Sorgo.

3.2 ABSTRACT

Copper is an essential micronutrient for plants, however, in high concentration it can be toxic to the environment. Some microorganisms have the ability to tolerate high concentrations of heavy metals, in addition to favoring plant development. The objective was to evaluate the influence of the bacterium *Azospirillum brasilense* on the development and tolerance to copper accumulation in corn and sorghum plants. The experimental design was completely randomized with a 2x5 factorial arrangement, testing the bacterium *Azospirillum brasilense*, a control without inoculation and five doses of copper (0 (natural soil content); 100; 200; 300 and 400 mg of copper kg⁻¹) and seven repetitions. Evaluated plant height, stem diameter, number of tillers, root volume, shoot dry mass, root dry mass, specific surface area, copper content in the grain, shoot and root and pseudo-total copper in the ground. The aerial and root parts of maize and sorghum plants were reduced at high concentrations of copper in the soil. The bacterium *Azospirillum brasilense* improved the development of corn and sorghum, increased the tolerance of plants to copper and decreased the translocation of the metal to shoots and grain.

Key words: *Azospirillum brasilense*. Copper. Corn. Sorghum.

3.3 INTRODUÇÃO

Na natureza, o cobre está presente em diferentes formas, principalmente combinado com enxofre originando sulfato de cobre (CIPOLETA *et al.*, 2019). Elevadas concentrações deste elemento geralmente são encontradas em áreas de viticultura, onde há aplicação de fungicida a base de sulfato de cobre (ANDREAZZA, 2013). Outras atividades que potencializam o acúmulo de cobre no solo são áreas de mineração, uso de fertilizantes, como dejetos de suínos e defensivos agrícolas (TURRA *et al.*, 2011).

O cobre em alta concentração no solo pode ser tóxico para as plantas, devido à inibição da atividade enzimática que causa redução no crescimento das raízes e conseqüentemente, diminuição da absorção de água e nutrientes (KELLER *et al.*, 2015). Altos teores de cobre também reduzem a concentração de pigmentos foliares como clorofila e carotenoides, os quais são responsáveis pela conversão de radiação luminosa em energia para o desenvolvimento das plantas (CAMBROLLÉ *et al.*, 2013; LASHBROOKE *et al.*, 2010).

Relatos na literatura demonstram que na cultura do milho, o excesso de cobre ocasiona redução na produção de matéria seca e danos no aparelho fotossintético (SEIDEL *et al.*, 2009; TASSINARI *et al.*, 2016). Na cultura do sorgo, Silva (2019) constatou diminuição da altura de plantas, diâmetro de colmo, número de perfilhos, redução dos teores de clorofila, massa seca de parte aérea e de raiz.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são organismos capazes de formar relações simbióticas com plantas, colonizando tanto a rizosfera como também os tecidos internos dos vegetais (GLICK, 2012; BALDANI; BALDANI, 2005). Estes microrganismos favorecem o crescimento das plantas por meio da produção e excreção de hormônios como gibelinas e citocininas, poliaminas, óxido nítrico, além da solubilização de fosfatos e fixação biológica de nitrogênio. As BPCV também captam aminoácidos exsudados da rizosfera da planta e excretam auxinas, favorecendo o crescimento e aumento do número de raízes secundárias e pelos radiculares (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Estes microrganismos também possuem capacidade de transformar contaminantes, como os metais pesados, em formas menos tóxicas, através de reações de mobilização, podendo ser por meio de lixiviação autotrófica e heterotrófica, de quelatção e metilação, além de reações de imobilização, por processos de biossorção, bioacumulação e precipitação (PÉREZ, 2006; GADD, 2004). Dentre alguns gêneros que apresentam tal característica pode-se destacar *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (MOREIRA *et al.*, 2008; MUNOZ-SILVA *et al.*, 2019).

O gênero *Azospirillum* é um dos mais comuns e estudados, abrangendo um grande número espécies. Essas bactérias atuam diretamente através da modulação dos níveis de hormônios vegetais na planta, além disso, são capazes de aumentar a absorção de nutrientes, por atuarem na rizosfera de seus hospedeiros (VURUKONDA *et al.*, 2018). Entre as funções deste gênero, destaca-se a fixação biológica de nitrogênio, através da enzima dinitrogenase, a qual é capaz de romper a tripla ligação do N₂, reduzindo à amônia, que é absorvida pelas plantas, porém, essas bactérias excretam apenas parte do nitrogênio que é fixado, suprimindo parcialmente as necessidades dos vegetais (HUNGRIA, 2011). Estudos sugerem que 50% da adubação química pode ser substituída pela inoculação com *Azospirillum brasilense* no milho (CAMPO; HUNGRIA, 2009; MILLÉO; CRISTÓFOLI, 2016). Em trabalho realizado por Silva (2019) evidenciou-se aumento na área superficial específica de raízes e redução nos teores de cobre na parte aérea de plantas de sorgo com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, cultivado em solo com doses crescentes de cobre.

O milho (*Zea mays* L.) apresenta grande adaptabilidade a diferentes regiões, podendo ser cultivado em climas tropicais, subtropicais e temperados. Sua utilização pode ser tanto para alimentação humana como animal devido as elevadas qualidades nutricionais que possui (BARROS; CALADO, 2014). O sorgo (*Sorghum bicolor*) possui metabolismo C4 e apresenta um sistema radicular profundo, permitindo que explore camadas mais profundas do solo (MAGALHÃES *et al.*, 2014; SODRÉ-FILHO, 2013). Contudo, ainda há a necessidade de esclarecer se o uso de *Azospirillum* promove o desenvolvimento e a tolerância do milho e do sorgo em solo contaminado com cobre. Neste sentido, objetivou-se determinar a influência da inoculação de *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e na tolerância ao cobre em plantas de milho e sorgo.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, campus de Frederico Westphalen.

O solo utilizado no experimento foi coletado na camada de 0-20 cm e caracterizado como Latossolo Vermelho (SANTOS, 2018). Após a coleta, o solo foi peneirado em malha de 2 mm e esterilizado em autoclave a 121°C, em 3 ciclos de 30 min. Posteriormente, foi realizada uma mistura do solo original com areia média na proporção de 50% (v/v) para obtenção de

textura de 46 %, aproximadamente. Desta mistura, foi retirada uma amostra e encaminhada para análise dos atributos físicos e químicos, os quais estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Análise física e química da mistura de solo + areia utilizada para cultivo de sorgo e milho.

| -----Parâmetros----- | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|----------------|------|-----|-------------------|-----|------|
| Teor de Argila | pH | MO | P | K | Cu | Zn | Mg | Al+H |
| % | 1:1 | % | -----mg/L----- | | | -----Cmolc/L----- | | |
| 46 | 5,3 | 1,0 | 4,6 | 27,5 | 4,2 | 1,3 | 1,0 | 4,9 |

Fonte: Autor (2022)

Após interpretação da análise, foi corrigida a acidez do solo com o uso de calcário dolomítico, elevando o pH para 6,5 e a adubação foi realizada com o uso de adubo químico formulado NPK 10-20-10, de acordo com a recomendação do Manual de Calagem e Adubação para os Estados do RS e SC (2016), para sorgo e milho. A contaminação do solo com as doses de cobre ocorreu 30 dias antes da semeadura, com a utilização de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sendo homogeneizado por meio de agitação em saco plástico juntamente com o solo.

O inoculante utilizado no trabalho foi Azo Total Max, composto por bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6, na concentração de 2.000.000 UFC obtido na empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda de Curitiba, PR.

A cultivar de milho utilizada foi MORGAN 20A78 e a cultivar de sorgo foi AGROCERES 2501. As sementes foram inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense*, imediatamente antes da semeadura, a qual ocorreu na primeira quinzena de outubro. Foram semeadas quatro sementes por vaso e realizado o desbaste 10 dias após a semeadura, deixando apenas uma planta por vaso. As sementes foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% por 15 min e depois lavadas em água corrente. Os vasos utilizados no experimento possuíam capacidade de 5 litros, os quais foram preenchidos com 5 kg de solo. A irrigação das plantas foi realizada por meio de gotejamento, mantendo a umidade em 80% da capacidade de campo.

Estabeleceu-se, para cada espécie vegetal, um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2 x 5), sendo com e sem inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense*, e

cinco doses de cobre (0 (teor natural do solo), 100, 200, 300 e 400 mg de cobre kg⁻¹), com sete repetições.

Ao final do ciclo das plantas, o qual foi de 120 dias, foram realizadas avaliações morfológicas: altura de planta (AP), medida do colo da planta até a folha bandeira, por meio de fita métrica; diâmetro de caule (DC), com auxílio de paquímetro digital; número de perfilhos (sorgo); volume de raiz (VR), com auxílio de proveta graduada. Posteriormente, a planta foi dividida em parte aérea, raiz e grão, as partes foram colocadas em sacos e submetidas a secagem em estufa a 65°C até apresentarem massa constante. Após, a parte aérea, raízes e grãos foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de malha 10 mesh para extração de cobre, por meio de digestão nitro-perclórica (3:1) e quantificação em espectrofotometria de absorção atômica conforme Miyazawa *et al.*, (2009).

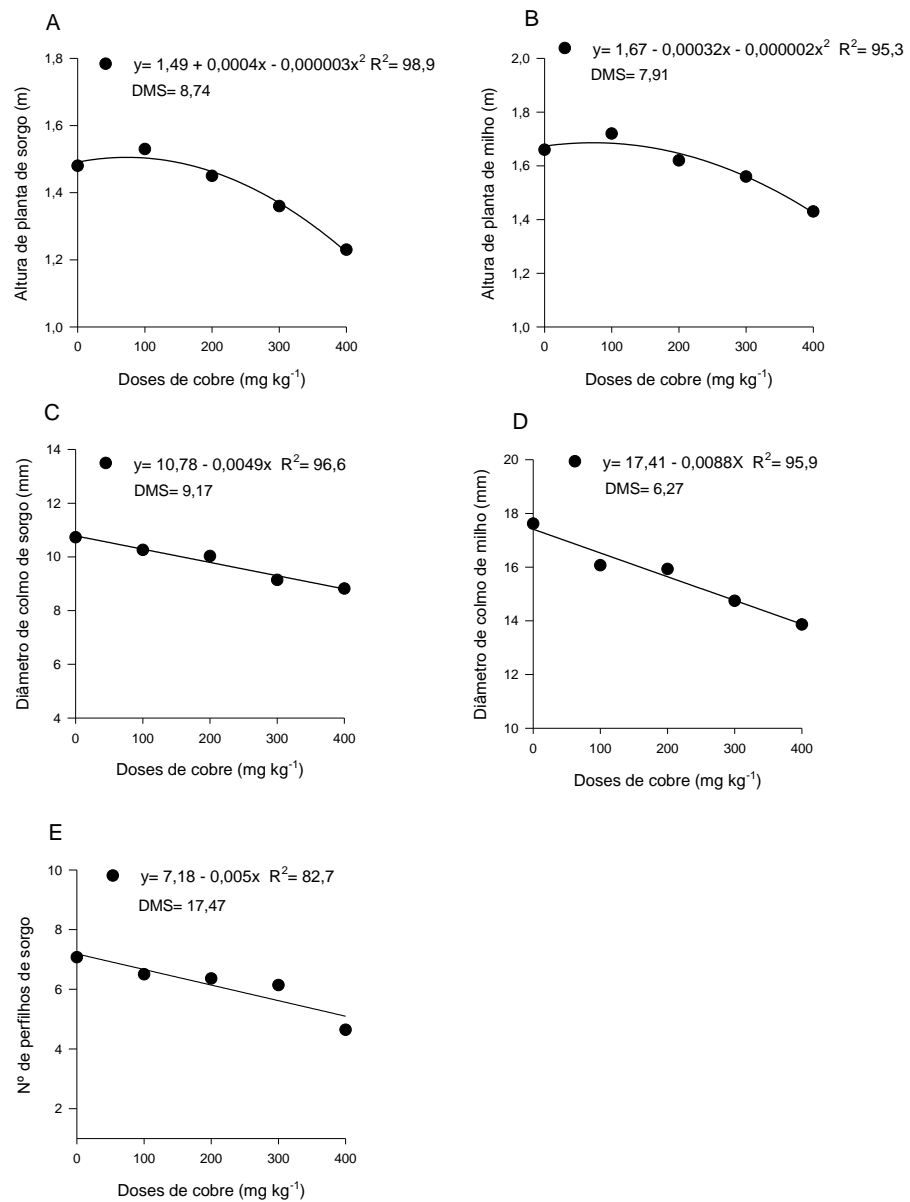
Os resultados foram submetidos a análise de variância com auxílio do programa estatística SISVAR (FERREIRA, 2011) e quando houve interação significativa, desdobrou-se os efeitos das doses em cada tratamento com inoculação através de análise de regressão e quando não significativo, o fator qualitativo (fonte de inóculo) foi avaliado por meio de comparação de médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro e o fator quantitativo (doses de cobre) avaliado por meio de análise de regressão.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que não houve interação significativa entre doses de cobre aplicadas no solo e o inóculo, para as variáveis altura de planta e diâmetro de colmo em nenhuma das espécies estudadas, apresentando somente efeito simples significativo para os fatores de variação.

A altura de plantas do sorgo aumentou de forma quadrática com as doses de cobre, com ponto de máxima na dose de 80 mg kg⁻¹ de cobre, com altura de 1,51 m. No milho, o ponto de máxima foi na dose de 66 mg kg⁻¹ de cobre, com altura de 1,63 m (Figura 1A e 1B). Esse efeito positivo, inicialmente observado na altura das plantas, é devido ao elemento cobre ser um micronutriente, sendo responsável por desempenhar funções importantes dentro da planta, principalmente em processos como fotossíntese, respiração, metabolismo de carboidratos e reprodução (KABATA-PENDIAS, 2010). Após o ponto de máxima, nota-se uma diminuição na altura de plantas conforme o aumento das doses de cobre no solo, que pode ser explicado pelo fato de moléculas de clorofila do fotossistema II serem inibidas por altas concentrações deste metal, diminuindo o crescimento das plantas (LIDON *et al.*, 1993).

Figura 1 - Altura de plantas (AP), diâmetro de colmo (DC) de sorgo e de milho e nº de perfilhos de sorgo submetido a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



Fonte: Autor (2022)

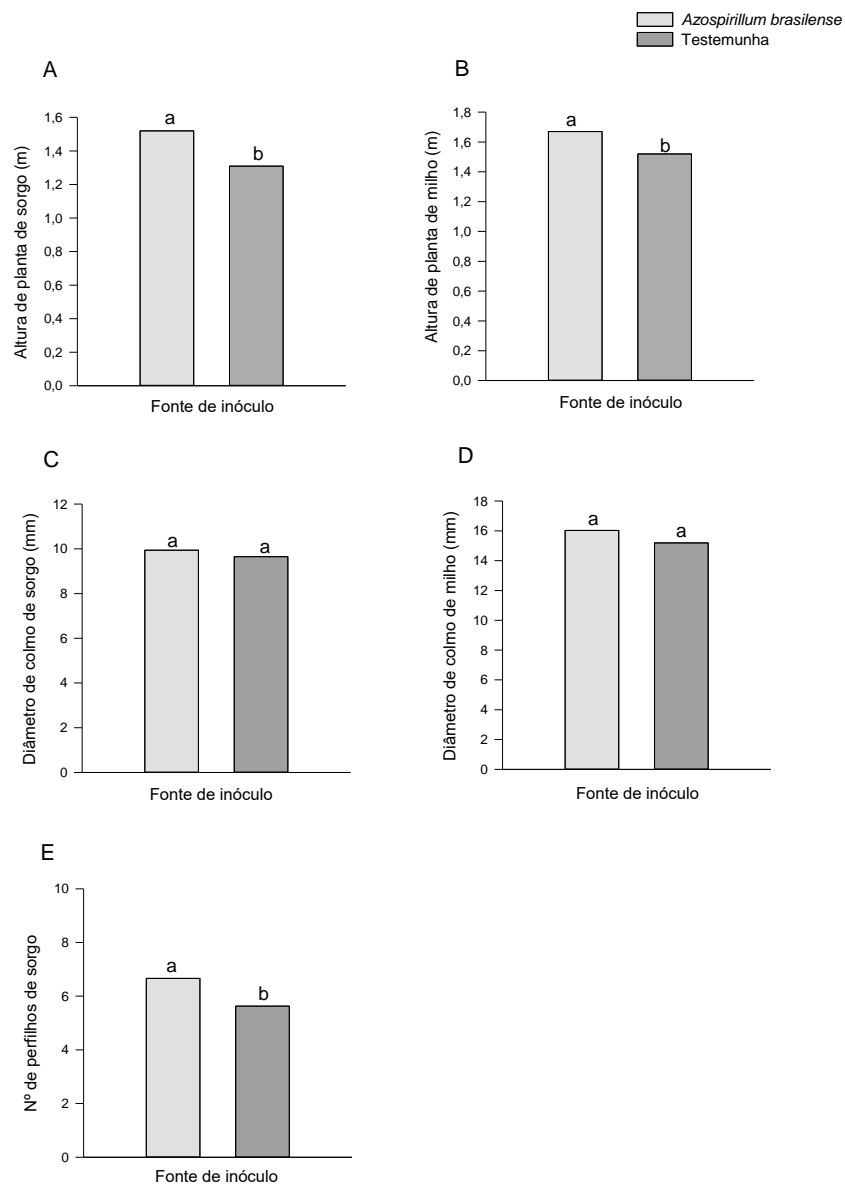
O diâmetro de colmo de sorgo e milho (Figura 1C e 1D) e número de perfilhos de sorgo (Figura 1E) apresentaram redução linear em função das doses de cobre aplicadas no solo. Resultados semelhantes para essas variáveis são encontrados na literatura para diversas espécies (SOUZA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; MENEGAES *et al.*, 2017; BARBOSA *et al.*, 2013). Altas concentrações de cobre em plantas podem interferir no processo de trocas gasosas pelos vegetais, reduzindo assim, a taxa de fotossíntese e consequentemente causando redução do crescimento das plantas (CAMBROLLÉ *et al.*, 2013).

O tratamento com *Azospirillum brasilense* proporcionou aumento na altura das plantas, alcançando média de 1,52 m para sorgo (Figura 2A) e 1,67 m para o milho (Figura 2B). Resultados semelhantes foram encontrados por (MUMBACH *et al.*, 2017; QUADROS *et al.*, 2014 e NAKAO, 2018) onde a inoculação com *Azospirillum brasilense* também aumentou a altura de plantas de milho e sorgo. Essas bactérias possuem a capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio da atmosfera, promovendo maior capacidade de absorção e assimilação de nutrientes pelas plantas (DOBBELAERE *et al.*, 2001). Além disso, fitohormônios como o ácido indol-acético, excretados por essas bactérias, são essenciais na promoção do crescimento das plantas (BASHAN *et al.*, 2004).

Para diâmetro de colmo, a inoculação com *Azospirillum brasilense* não se diferiu da testemunha em nenhuma das espécies avaliadas (Figura 2C e 2D), estando de acordo com o observado por Rockenbach *et al.*, (2017) e Wagatsuma *et al.*, (2012), onde também não evidenciaram resultado positivo de *Azospirillum* para esta variável. O diâmetro de colmo é considerado um parâmetro importante para determinação do potencial de crescimento das raízes das plantas, além de estar relacionado com a produção de grãos, visto que, é no colmo que se acumula grande parte do amido utilizado no enchimento de grão (SOUZA *et al.*, 2006; ROCKENBACH *et al.*, 2017).

Em relação ao nº de perfilhos do sorgo, o tratamento com *Azospirillum brasilense* promoveu aumento desta variável comparado com a testemunha (Figura 2E). Maior número de perfilhos com a inoculação de *Azospirillum brasilense* também foi verificado por Bonadiman *et al.*, (2018) trabalhando com a cultura do azevém e por Rocha e Costa (2018) utilizando a gramínea da espécie *Urochloa brizantha*.

Figura 2 - Altura de planta (AP) e diâmetro de colmo (DC) de sorgo e de milho e nº de perfilhos de sorgo com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*.

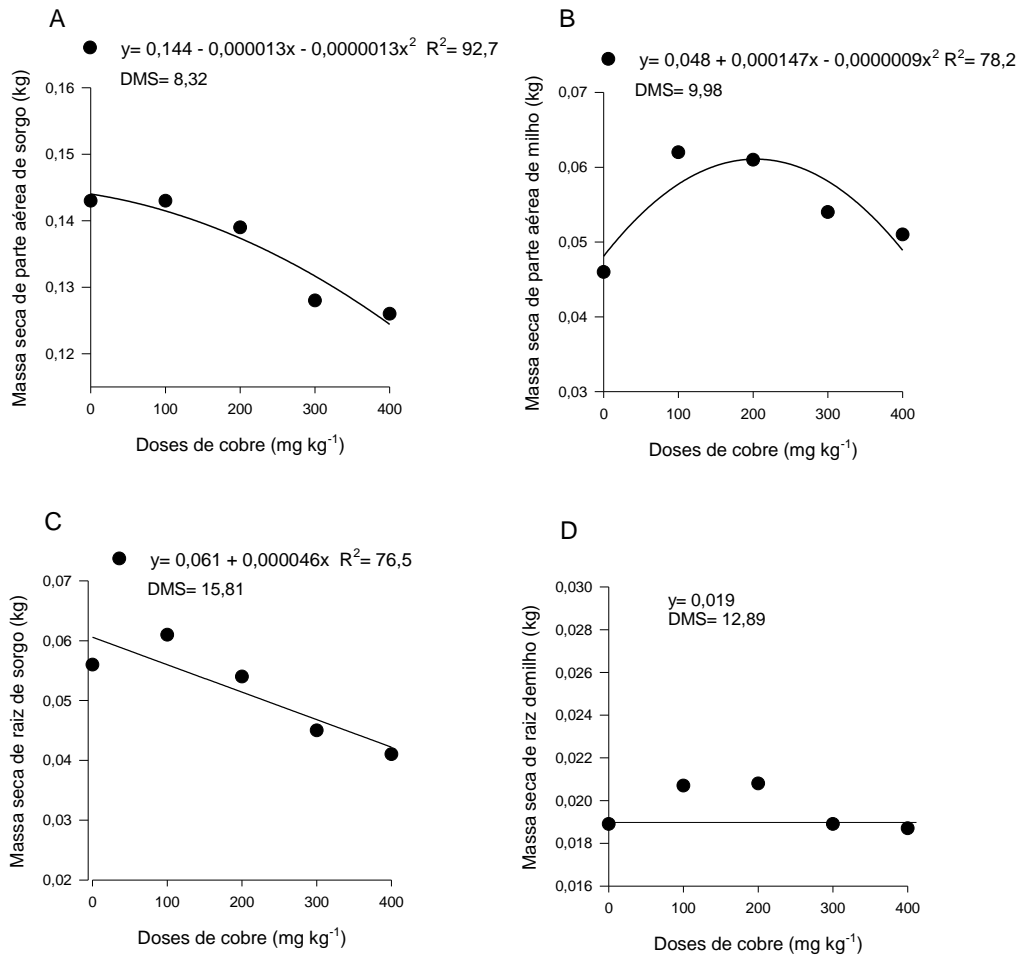


Fonte: Autor (2022)

Médias seguidas de mesma letra minúscula entre fontes de inóculo não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ($P > 0,05\%$) de probabilidade de erro.

A massa seca de parte aérea do sorgo foi reduzida com o aumento das doses de cobre partir de 5 mg kg^{-1} (Figura 3A). No milho, a aplicação de cobre favoreceu a massa seca de parte aérea até a dose de 190 mg kg^{-1} (Figura 3B). Nota-se que altas doses de cobre no solo afetam o desenvolvimento de diversas culturas como relatado na literatura (SEIDEL *et al.*, 2009; DELLAI *et al.*, 2018; MENDONÇA, 2020) sendo que a redução da biomassa é uma resposta comum entre os vegetais (THOUNAOJAM *et al.*, 2012).

Figura 3 - Massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) de plantas de sorgo e de milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).

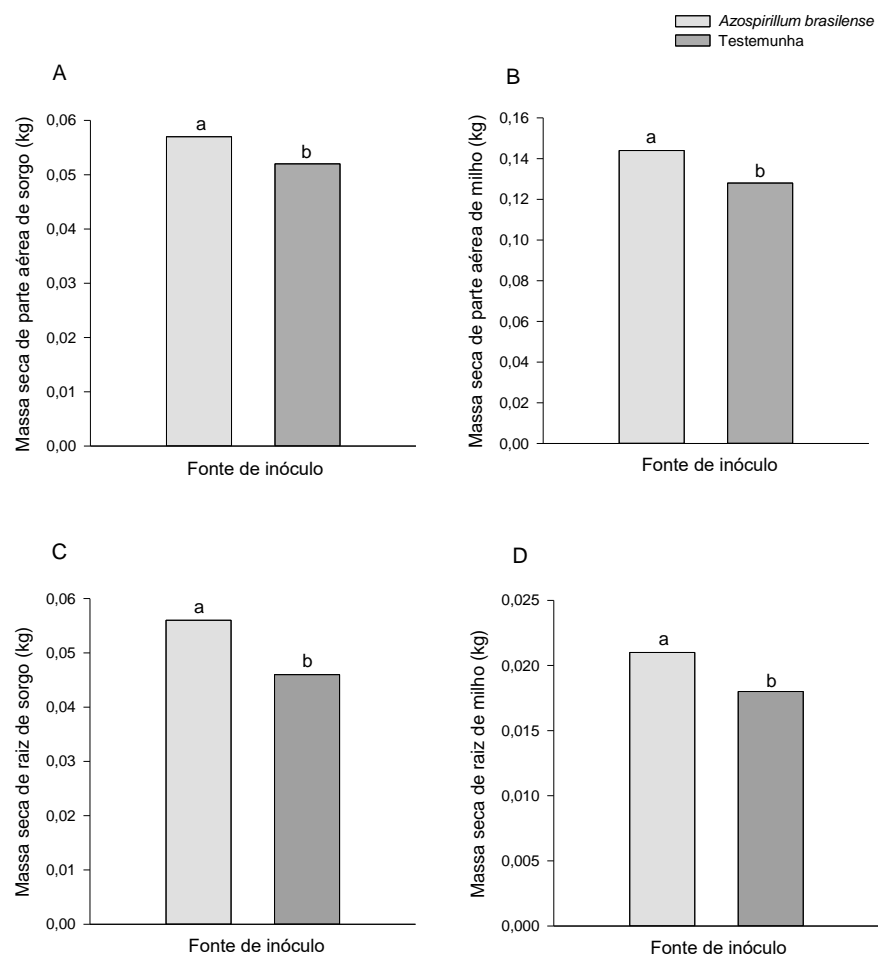


Fonte: Autor (2022)

Os resultados evidenciaram regressão linear negativa para massa seca de raiz de plantas de sorgo em função das doses de cobre aplicadas no solo e o milho não houve ajuste de nenhum grau de polinômio para esta variável (Figura 3C e 3D). Resultados semelhantes foram obtidos para diversas culturas (MANTOVANI, 2009; DE MARCO *et al.*, 2017a; DE MARCO *et al.*, 2017b). Os sintomas de toxidez por cobre mais comuns de serem observados no sistema radicular é a ausência de formação de raízes, causando conseqüentemente, redução na capacidade de absorção de água e nutrientes, reduzindo o crescimento dos vegetais (TAIZ *et al.*, 2017).

Em relação a massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, a inoculação com *Azospirillum brasilense* foi benéfica para sorgo e milho, proporcionando valores acima dos encontrados para a testemunha (sem inoculação) (Figura 4A e 4B). Esses resultados corroboram com diversos estudos na literatura onde *Azospirillum brasilense* se destaca por aumentar variáveis como biomassa de raízes e parte aérea (BRASIL *et al.*, 2021; MAIDANA *et al.*, 2020; ALBERTO-CASAS *et al.*, 2019; QUATRIN *et al.*, 2019). Essa bactéria apresenta capacidade de reduzir o nitrato nas raízes e com isso diminui o gasto de energia pela planta, promovendo maior crescimento vegetal (DUARTE *et al.*, 2020).

Figura 4 - Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de sorgo e milho com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*.

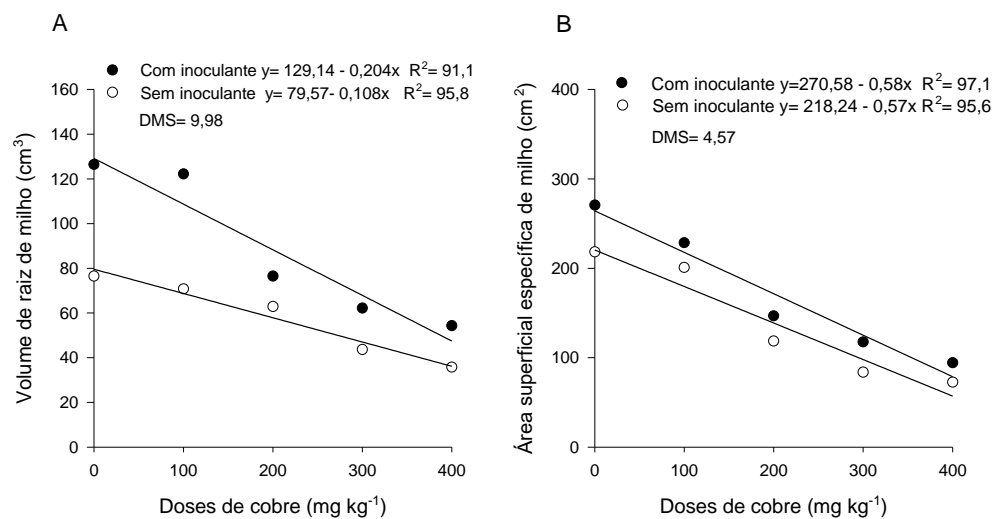


Fonte: Autor (2022)

Médias seguidas de mesma letra minúscula entre fontes de inóculo não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ($P > 0,05\%$) de probabilidade de erro.

Houve interação entre os fatores doses de cobre aplicadas no solo e fonte de inóculo para as variáveis volume de raiz e área superficial específica do milho, sendo que a inoculação de *Azospirillum brasilense* se mostrou superior ao tratamento controle, promovendo maior volume de raiz e ASE, em todas as doses de cobre aplicadas, embora tenha ocorrido redução linear destas variáveis com o aumento das doses. (Figura 5A e 5B). Silva (2019), trabalhando com o sorgo, também evidenciou que a inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu maior volume de raiz e ASE, mesmo em doses elevadas de cobre. A estimulação do crescimento das raízes de plantas inoculadas com *Azospirillum* possibilita maior absorção de água e nutrientes, além de aumentar o fornecimento de exsudatos radiculares para a rizosfera, favorecendo a população bacteriana associada as raízes (CASSÁN *et al.*, 2020). De acordo com Paludo (2020), essa bactéria também proporciona maior tolerância das plantas a estresses abióticos, como por exemplo, por metais pesados, comportamento este, observado neste estudo.

Figura 5 - Volume de raiz (VR) e Área superficial específica (ASE) de plantas de milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹) com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*.

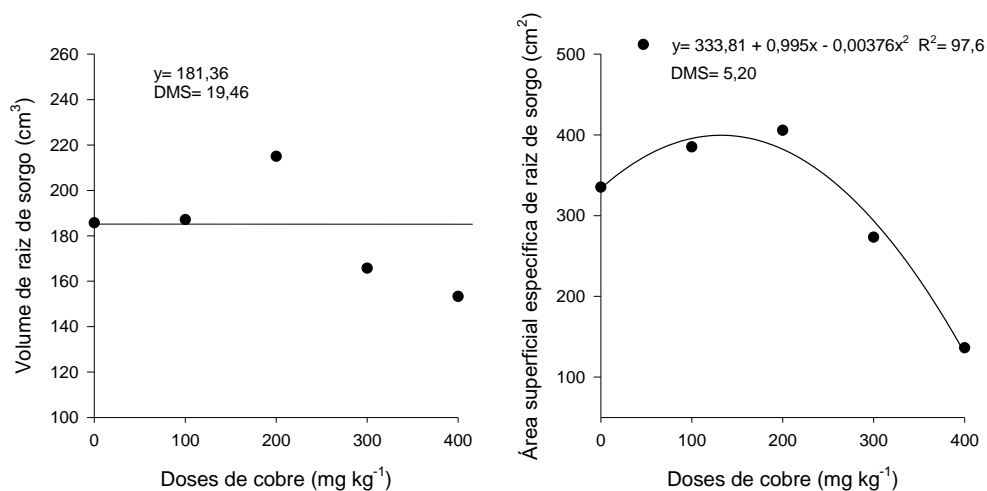


Fonte: Autor (2022)

Não houve ajuste de nenhum grau de polinômio para volume de raiz do sorgo, o qual apresentou uma média de 181,36 cm³ (Figura 6A). A área superficial específica de raiz de sorgo evidenciou resposta quadrática, com ponto de máxima na dose 132,3 mg kg⁻¹ e área de 399,64

cm², decaindo em seguida com o aumento das doses de cobre (Figura 6B). Esse maior volume de raiz obtido está relacionado ao fato do cobre ser considerado um micronutriente, o qual atua como constituinte e cofator de enzimas, além de participar do metabolismo de proteínas e carboidratos (SANTOS *et al.*, 2021). Contudo, após o aumento das doses de cobre, ocorreu redução na área superficial específica, devido ao efeito tóxico deste metal. Resultados semelhantes são relatados na literatura para diversas espécies de vegetais (SILVA *et al.*, 2016; MARQUES, 2016; DE MARCO *et al.*, 2017b).

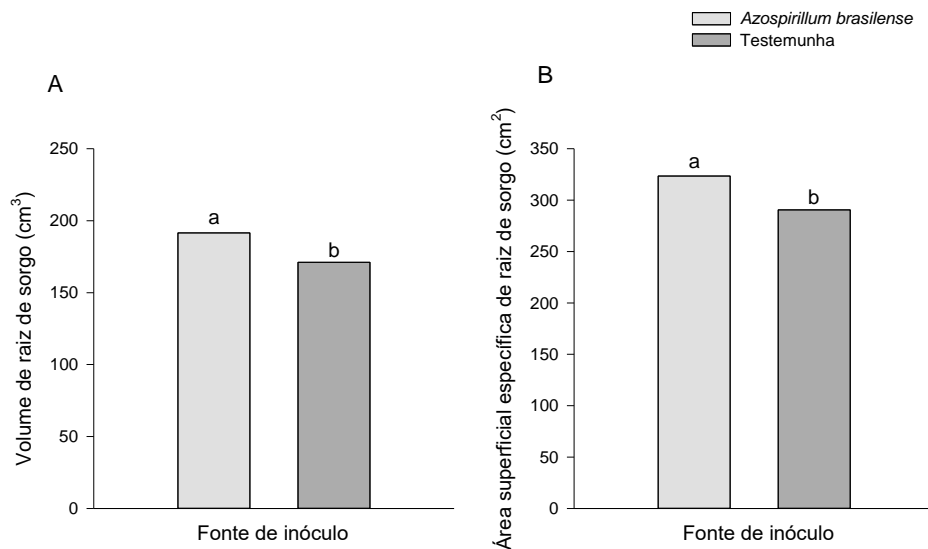
Figura 6 - Volume de raiz (VR) e Área superficial específica (ASE) de plantas de sorgo submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



Fonte: Autor (2022)

O uso de *Azospirillum brasilense* favoreceu o aumento do volume de raiz e área superficial específica do sorgo, obtendo média de 191,57 cm³ e 323,53 cm², respectivamente (Figura 7A e 7B). Uma característica importante de bactérias do gênero *Azospirillum* é a capacidade de produzir substâncias promotoras de crescimento, como o ácido indol-acético (AIA), que promove o crescimento de raízes por meio de divisão celular e diferenciação de tecidos do meristema (REIS JUNIOR *et al.*, 2008; GALEANO *et al.*, 2019). O crescimento do sistema radicular é fundamental para o desenvolvimento dos vegetais, pois é através das raízes que ocorre o transporte de água e nutrientes para as demais partes da planta (GUIMARÃES *et al.*, 2021).

Figura 7 - Volume de raiz (VR) e Área superficial específica (ASE) de plantas de sorgo com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*.

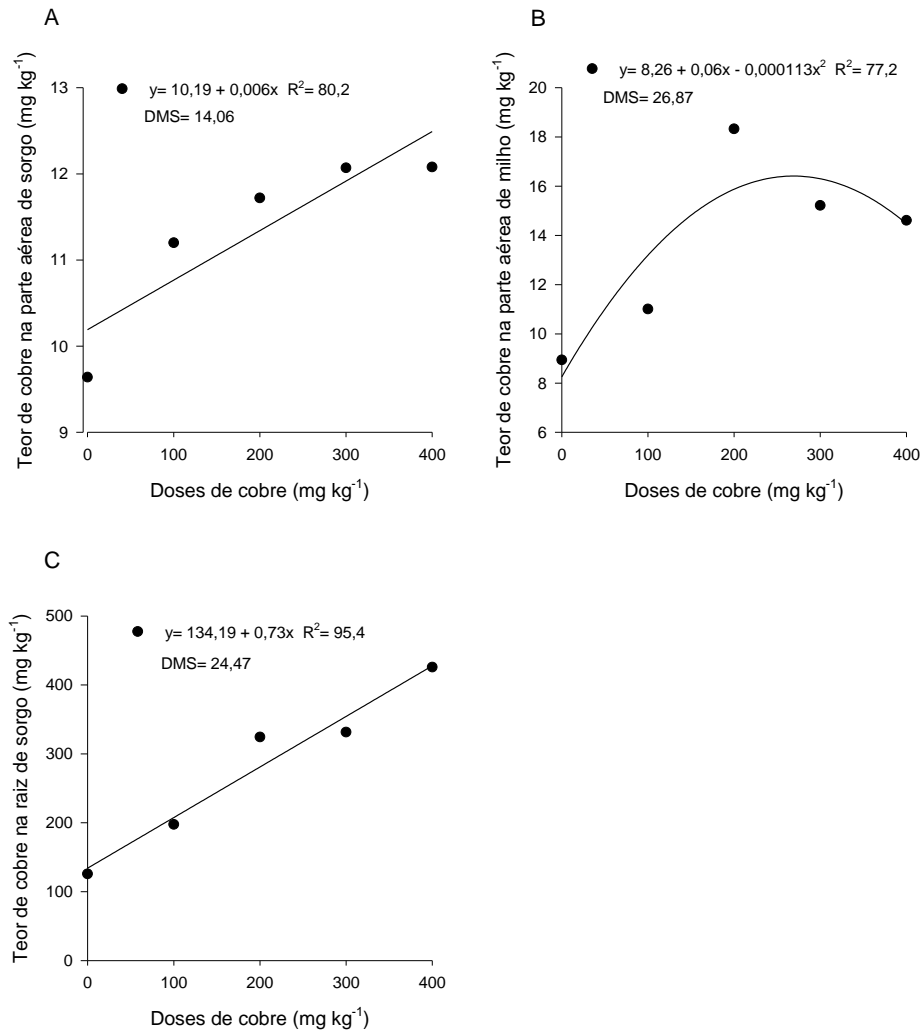


Fonte: Autor (2022)

Médias seguidas de mesma letra minúscula entre fontes de inóculo não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ($P > 0,05\%$) de probabilidade de erro.

O teor de cobre na parte aérea (CuPA) de milho e sorgo e o teor de cobre na raiz (CuR) de sorgo não evidenciaram interação significativa entre doses de cobre e fontes de inóculo, havendo somente efeito simples significativo para as fontes de variação (Figura 8). Para o sorgo houve aumento linear do teor de cobre na parte aérea com o aumento das doses de cobre (Figura 8A), e no milho ocorreu um aumento de forma quadrática, com ponto de máxima na dose de $265,5 \text{ mg kg}^{-1}$ com teor de cobre na parte aérea de $16,22 \text{ mg kg}^{-1}$ (Figura 8B). Também se observa que os teores de cobre encontrados foram maiores no milho em relação ao sorgo, porém, independente da espécie, os valores estão abaixo do limite máximo tolerável para alimentos (matéria seca) que é de 30 mg kg^{-1} proposto pela ANVISA (1965). Acúmulo de cobre de forma crescente na parte aérea de plantas também foi evidenciado por diversos autores (CHAVES *et al.*, 2010; CAIRES *et al.*, 2011; VENDRUSCULO, 2013). Altas concentrações de cobre na parte aérea e especialmente nas folhas podem interromper o transporte de elétrons entre os fotossistemas, inibindo também o processo fotossintético (BURDA *et al.*, 2003; BIBI e HUSSAIN, 2005).

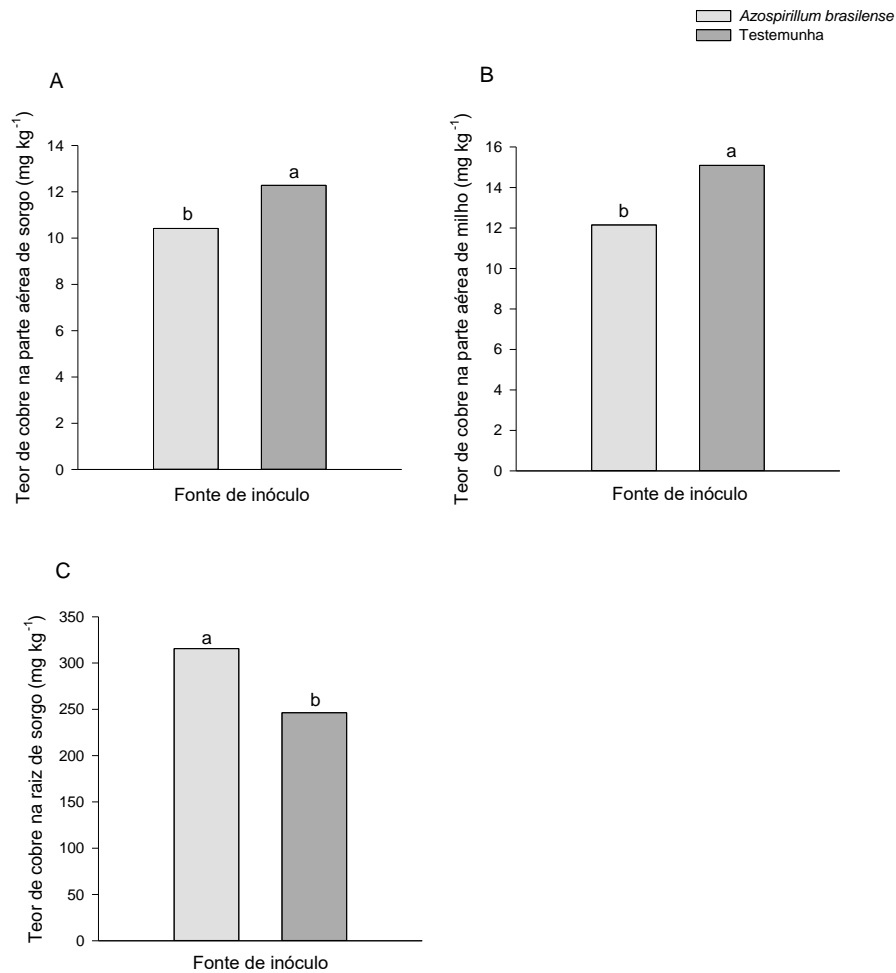
Figura 8 - Teor de cobre na parte aérea (CuPA) de plantas de milho e sorgo e teor de cobre na raiz (CuR) de sorgo submetidos a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



Fonte: Autor (2022)

O uso de *Azospirillum brasilense* promoveu redução dos teores de cobre na parte aérea de 15,14 e 14,18% para sorgo e milho, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação (Figura 9A e 9B). Essa capacidade de reduzir os teores de cobre e de outros metais nas plantas está relacionado com mecanismos de resistência e tolerância desenvolvidos por esses microrganismos ao longo do tempo, entre eles pode-se citar, a redução do transporte do elemento cobre, a complexação pelos componentes celulares e o acúmulo de cobre internamente na célula, dificultando seu transporte no interior da planta (CAMARGO *et al.*, 2007; ANDREAZZA *et al.*, 2013).

Figura 9 - Teor de cobre na parte aérea (CuPA) de plantas de milho e sorgo e teor de cobre na raiz (CuR) de sorgo com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*.



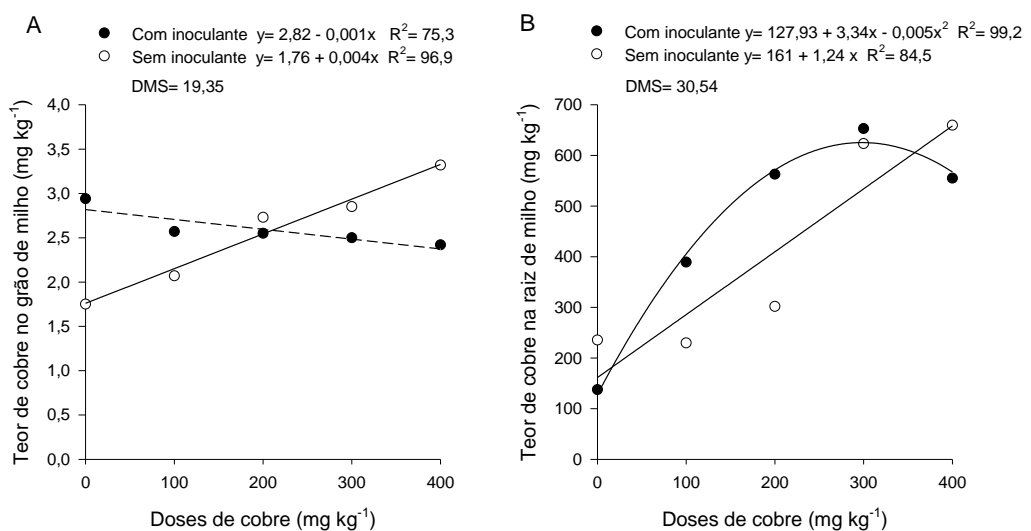
Fonte: Autor (2022)

Médias seguidas de mesma letra minúscula entre fontes de inóculo não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ($P > 0,05\%$) de probabilidade de erro.

Contudo, o teor de cobre na raiz do sorgo aumentou quando se utilizou a bactéria *Azospirillum brasilense* (Figura 9C). Esse comportamento pode ser explicado pois esses microrganismos podem formar compostos metal-fosfato, onde ocorre a complexação dos metais nas raízes, causando um acúmulo do metal nesse local, evitando seu transporte para a parte aérea (ANDREAZZA *et al.*, 2013). Pereira e Castro (2010) salientam que a associação entre microrganismos e o sistema radicular das plantas pode contribuir com a redução da toxicidade por metais pesados e auxiliar no crescimento e desenvolvimento dos vegetais.

Para teor de cobre no grão e na raiz de plantas de milho, houve interação significativa entre as doses de cobre aplicadas no solo e as fontes de inóculo (Figura 10). A inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu redução linear dos teores de cobre no grão de milho, ao contrário do tratamento sem inoculação, o qual proporcionou um aumento linear, com valores abaixo de $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (Figura 10A). Esse valor é considerado abaixo do limite máximo de tolerância proposto pelo Regulamento Técnico do Ministério da Saúde, que é de 10 mg kg^{-1} de cobre em grãos (Brasil, 1998). Silva *et al.* (2007), analisando a concentração de cobre no grão das culturas do arroz e soja, observou teores de $3,25$ e $10,04 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, quando a contaminação de cobre no solo foi de 166 mg kg^{-1} . Alguns microrganismos como bactérias, algas e fungos são capazes de remover metais pesados do meio ambiente ou apenas transformá-los em substâncias menos tóxicas (LEMOS *et al.*, 2008). Neste sentido, o uso de *Azospirillum brasilense* poderá ser uma alternativa para o cultivo de milho em solo com excesso de cobre.

Figura 10 - Teor de cobre no grão (CuG) e na raiz (CuR) de plantas de milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo ($0, 100, 200, 300, 400 \text{ mg kg}^{-1}$) com e sem inoculação de *Azospirillum brasilense*.



Fonte: Autor (2022)

Ao analisar o teor de cobre na raiz de milho, observa-se aumento quadrático em função das doses de cobre aplicadas no solo com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, onde o ponto de máxima foi na dose $298,25 \text{ mg kg}^{-1}$ correspondendo a um teor de cobre de $625,35 \text{ mg kg}^{-1}$,

já para o tratamento controle, houve aumento linear do teor de cobre, sendo observado, na maior dose aplicada, teores mais elevados que o tratamento com *Azospirillum*. O aumento dos teores de cobre na raiz também foi observado em espécies florestais por (SILVA *et al.*, 2011; DE MARCO *et al.*, 2017a), em mamoneira (CHAVEZ *et al.*, 2010) e em milho (SEILDEL *et al.*, 2009). Nota-se também que os maiores teores de cobre permaneceram no sistema radicular das plantas, demonstrando a capacidade de retenção de metais por essas espécies, sendo que a cultura do milho teve maior absorção de cobre nas raízes em relação ao sorgo.

3.6 CONCLUSÃO

A parte aérea e radicular de plantas de milho e sorgo são reduzidas em altas concentrações de cobre no solo.

A bactéria *Azospirillum brasilense* melhora o desenvolvimento de milho e sorgo e aumenta a tolerância das plantas ao cobre.

3.7 REFERÊNCIAS

ALBERTO-CASAS, Mario *et al.* Respuesta de soya (*Glycine max* (L) Merr) a la inoculación con *Azospirillum* y *Bradyrhizobium*. *Cultivos Tropicales*, v. 40, n. 1, 2019.

ANDREAZZA, Robson *et al.* Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.

ANVISA. **Decreto nº 22.688, de 27 de Agosto de 1965**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm>. Acesso em: 10 novembro de 2021.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549–579, 2005

BARBOSA, Rogério Hidalgo *et al.* Absorção foliar de cobre por plantas de milho: Efeitos no crescimento e rendimento. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1561-1568, 2013.

BARROS, José F. C.; CALADO, José G. **A cultura do milho**. Escola de Ciências e Tecnologia – Universidade de Évora, 2014.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Review: *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, 50:521-577, 2004.

BRASIL. Portaria nº 685, de 27 de Agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1998.

BIBI, M.; HUSSAIN, M. Effect of Copper and Lead on Photosynthesis and Plant Pigments in Black Gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 74, n. 6, p. 1126-1133, 2005.

BONADIMAN, Rafael *et al.* Efeito da adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre as características estruturais de azevém. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 1-12, 2018.

BRASIL, Marivaine da Silva *et al.* Initial development of upland rice plants inoculated with the MAY12 strain of *Azospirillum* spp. *Ciência Rural*, v. 51, 2021.

BURDA, K.; KRUK, J.; SCHMID, G. H.; STRZALKA, K. Inhibition of oxygen evolution in Photosystem II by Cu (II) ions is associated with oxidation of cytochrome b559. **The Biochemical Journal**, London, v. 371, n. Pt 2, p. 597-601, 2003.

CAIRES, Sandro Marcelo de *et al.* Desenvolvimento de mudas de cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. **Revista Árvore**, v. 35, p. 1181-1188, 2011.

CAMARGO, F. A. O. *et al.* Uso de microrganismos para a remediação de metais. **Tópicos Especiais em Ciência do Solo**, v. 5, p. 467-496, 2007.

CAMBROLLÉ, J. *et al.* Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 294-301, 2013.

CAMPO, J. R.; HUNGRIA, M. **Eficiência Agronômica do inoculante líquido composto de bactérias do gênero *Azospirillum***. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA - 2009, Londrina-PR, 2009.

CASSÁN, Fabricio *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 461-479, 2020.

CHAVES, Lúcia Helena Garófalo *et al.* Acúmulo e distribuição de cobre e zinco em mamoneira cultivar BRS Paraguaçu e crescimento da planta. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 7, n. 3, p. 263-277, 2010.

CIPOLETA, Nathalia Sprovieri *et al.* Uso de resíduos orgânicos na atenuação de contaminação por cobre de calda bordalesa. **AMBIÊNCIA**, v. 15, n. 2, p. 289-307, 2019.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. SBCS – NRS, f376, 2016.

DELLAI, Alex; SILVA, Rodrigo Ferreira da; ANDREAZZA, Robson. Ectomicorriza no crescimento de *eucalyptus saligna* em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 624-631, 2018.

DE MARCO, Rudinei *et al.* Amenizante Orgânico e *Eucalyptus grandis* para fitoestabilização de solo contaminado com cobre. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017a.

DE MARCO, Rudinei *et al.* *Senna multijuga* and peat in phytostabilization of copper in contaminated soil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 421-426, 2017b.

DOBBELAERE, S. *et al.* Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, East Melbourne, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.

DUARTE, Camila Fernandes Domingues *et al.* *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 11, n. 1, p. 223-240, 2020.

FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância. Versão 5.3.** Lavras-MG: UFLA, 2011.

GADD, G. M.; Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma** 122, 109-119, 2004.

GALEANO, Rodrigo Mattos Silva *et al.* Desenvolvimento inicial e quantificação de proteínas do milho após inoculação com novas estirpes de *Azospirillum brasilense*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 6, n. 2, p. 95-99, 2019.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

GUIMARÃES, Salomão Lima *et al.* Cultivo de arroz de terras altas sob disponibilidades hídricas e inoculado com *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 89403-89420, 2021.

GUIMARÃES, Vandeir Francisco *et al.* Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. **Ciências Agrárias: Ética Do Cuidado, Legislação e Tecnologia Na Agropecuária. Centro de Ciências Agrárias/Unioeste, Marechal Candido Rondon**, p. 193-212, 2017.

HUNGRIA, Mariangela. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina: Embrapa Soja, 2011.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants.** 4. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

KELLER, Catherine *et al.* Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 μ M Cu. **Planta**, v. 241, n. 4, p. 847-860, 2015.

- LASHBROOKE, J. G. *et al.* The development of a method for the extraction of carotenoids and chlorophylls from grapevine leaves and berries for HPLC profiling. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, n. 2, p. 349-360, 2010.
- LEMOS, Judith Liliana Solórzano *et al.* **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.
- LIDON, Fernando C .; RAMALHO, José C .; HENRIQUES, Fernando S. Inibição do cobre na fotossíntese do arroz. **Journal of Plant Physiology** , v. 142, n. 1, pág. 12-17, 1993.
- MAGALHÃES PC *et al.* **Exigências edafoclimáticas e fisiologia da produção**. In: BORÉM A (Ed.). *Sorgo: do plantio à colheita*. Viçosa: UFV. p.58-88, 2014.
- MAIDANA, Ever *et al.* Características agronômicas del maíz inoculado con diferentes dosis de *Azospirillum brasiliense*. **Revista de la Sociedad Científica del Paraguay**, v. 25, n. 1, p. 49-57, 2020.
- MANTOVANI, Analú. **Composição química de solos contaminados por cobre: formas, sorção e efeito no desenvolvimento de espécies vegetais**. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- MARQUES, Daniele Maria. **Morfofisiologia de espécies arbóreas expostas ao cobre**. 2016. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.
- MENDONÇA, Gabriel Wanderley de. **Tolerância e potencial fitorremediador de *Crotalaria juncea* em solos contaminados por boro, cobre e manganês**. Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia – UNESP - Campus de Ilha Solteira, 2020.
- MENEGAES, JANINE FARIAS *et al.* Avaliação do potencial fitorremediador de crisântemo em solo com excesso de cobre. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 1, p. 63-71, 2017.
- MILLÉO, Marcos Vinicius Ribas; CRISTÓFOLI, Isadora. Avaliação da eficiência agrônômica da inoculação de *Azospirillum* sp. na cultura do milho. **Scientia Agraria**, v. 17, n. 3, p. 14-23, 2016.
- MIYAZAWA, M. *et al.* Análise química de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 2, p. 59-85.
- MOREIRA, Fátima *et al.* Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 4, p. 749-761, 2008.
- MUMBACH, Gilmar Luiz *et al.* Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. **Scientia Agraria**, v. 18, n. 2, p. 97-103, 2017.

MUÑOZ-SILVA, Loyer *et al.* Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). **Revista peruana de biología**, v. 26, n. 1, p. 109-118, 2019.

NAKAO, Allan Hisashi. **Consortiação de sorgo granífero ou de dupla aptidão com capim-paiaguás em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* para produção de silagem**. 2018. 141p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, SP, 2018.

PALUDO, Franciele *et al.* **Co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho (*Zea mays* L.)**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.

PEREIRA, Bianca de Aguiar; CASTRO-SILVA, Marcus Adonai. Rizobactérias formadoras de endósporos associadas à *Tibouchina urvilleana* de áreas impactadas por rejeitos da mineração do carvão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 563-567, 2010.

PÉREZ, O. C., Atenuación natural de suelos contaminados con residuos tóxicos de origen minero. Aislamento y caracterización microbiana. Relatório interno de atividades da Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Habana, Cuba, 2006.

QUADROS, Patricia Dörr de *et al.* Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, p. 209-218, 2014.

QUATRIN, Mauricio Pase *et al.* Response of dual-purpose wheat to nitrogen fertilization and seed inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, 2019.

REIS JUNIOR, Fábio Bueno dos *et al.* Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

ROCHA, Ana Flávia de Souza; COSTA, Raoni Ribeiro Guedes Fonseca. Desempenho de *Urochloa brizantha* cv Paiaguás inoculada com *Azospirillum brasilense* e diferentes doses nitrogênio. **Global Science and Technology**, v.11, n.03, p.177-186, 2018.

ROCKENBACH, Maicon Diego Altmayer *et al.* Eficiência da aplicação de *Azospirillum brasilense* associado ao nitrogênio na cultura do milho. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 1, p. 33-44, 2017.

SANTOS, H. G. dos. **Sistema Brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa, 2018, 356p.

SANTOS, Fernanda Dias dos *et al.* Fatores que afetam a disponibilidade de micronutrientes no solo. **Tecno-Lógica**, v. 25, n. 2, p. 272-278, 2021.

SEIDEL, Edleusa Pereira; COSTA, Antônio Carlos Saraiva da; LANA, Maria do Carmo. Fitodisponibilidade de cobre e produção de matéria seca por plantas de milho em resposta à aplicação de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1871-1878, 2009.

SHIN, W.; ISLAM, R.; BENSON, A.; JOE, M. M.; KIM, K.; GOPAL, S.; SAMADDAR, S.; BANERJEE, S.; SA, T. Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v.49, n.1, p.17-29, 2016.

SILVA, Juliano Cesar da. **Desenvolvimento e capacidade fitoextratora de plantas agrícolas cultivadas em solo com diferentes texturas e teores de cobre**. 2019. 86p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, RS, 2019.

SILVA, Rodrigo Ferreira da *et al.* Interferência de doses de cobre no crescimento e na qualidade de mudas de *Bauhinia forficata* Link, *Pterogyne nitens* Tul e *Enterolobium contortisiliquum* Vell. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 647-655, 2016.

SILVA, Rodrigo Ferreira da *et al.* Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, v. 21, p. 103-110, 2011.

SILVA, Rodrigo Ferreira da *et al.* Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) Inoculada com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. **Ciência Florestal**, v. 20, p. 147-156, 2010.

SILVA, Maria Ligia de Souza; VITTI, Godofredo Cesar; TREVIZAM, Anderson Ricardo. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 527-535, 2007.

SODRÉ FILHO, J. **Consórcio sorgo granífero braquiária: fitomassa, dinâmica de plantas daninhas e rendimento da soja em sucessão**. 2013. 188 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.

SOUZA, RS de; CHAVES, Lúcia Helena Garófalo; ESTRELA, Maria A. **Avaliação do desenvolvimento do girassol (*Helianthus annuus* L.), cultivado em solo contaminado por zinco, cobre e cádmio**. In: VII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE. 2010.

SOUZA, C.A.M.; OLIVEIRA, R.B.; FILHO, S.M.; LIMA, J.S.S. Crescimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubações. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.16, n.3, p.243-249, 2006.

TASSINARI, Adriele *et al.* **Respostas Fisiológicas de Milho Cultivado em Solo Derivado de Vinhedo Contaminado com Cobre e Submetido a Adição de Zinco**. XI Reunião Sul-Brasileira de Ciência do Solo, Frederico Westphalen-RS, 2016.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, Porto Alegre, 2017.

THOUNAOJAM, T. C. *et al.* Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiol Bioch** 53:33–39, 2012.

TURRA, C. *et al.* Evaluation on rare earth elements of Brazilian agricultural supplies. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 86-92, 2011.

VENDRUSCOLO, Diogo. **Seleção de plantas para fitorremediação de solo contaminado com cobre**. 2013. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

VURUKONDA, Sai Shiva Krishna Prasad; GIOVANARDI, Davide; STEFANI, Emilio. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. , v. 19, n. 4, p. 952, 2018.

WAGATSUMA, Eder *et al.* Influência de *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma harzianum* na cultura do milho. **Revista Cultivando o Saber**, v. 5, n. 3, p. 132-141, 2012.

4 CAPÍTULO 2: FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO DESENVOLVIMENTO DE MILHO E SORGO EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE

4.1 RESUMO

A concentração de cobre na natureza aumentou devido a intensificação de atividades industriais, agrícolas e mineração. Os fungos micorrízicos arbusculares compõem a biomassa microbiana do solo e aumentam a tolerância dos vegetais em ambientes estressantes. Objetivou-se analisar o comportamento de fungos micorrízicos no desenvolvimento de espécies agrícolas e na tolerância ao acúmulo de cobre nas plantas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3x5, utilizando os fungos *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum* e testemunha (sem inoculação) e cinco doses de cobre (0, 100, 200, 300 e 400 mg de cobre kg⁻¹) e sete repetições. Avaliou-se altura de planta, diâmetro de caule, número de perfilhos, volume de raiz, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, teor de cobre no grão, parte aérea e raiz, cobre disponível e pseudo-total no solo, porcentagem de colonização micorrízica, índice de tolerância e translocação, fator de bioconcentração e bioacumulação. Os resultados indicam que o aumento das doses de cobre no solo reduz variáveis morfológicas das plantas. A inoculação dos fungos micorrízicos possibilita tolerância das plantas ao cobre. O milho é mais responsivo na colonização micorrízica. A inoculação dos fungos micorrízicos aumenta o fator de bioconcentração e índice de tolerância das espécies.

Palavras-chave: Micorrizas arbusculares. Metal pesado. *Zea mays*. *Sorghum bicolor*.

4.2 ABSTRACT

The concentration of copper in nature has increased due to the intensification of industrial, agricultural and mining activities. Arbuscular mycorrhizal fungi make up soil microbial biomass and increase plant tolerance in stressful environments. The objective was to analyze the behavior of mycorrhizal fungi in the development of agricultural species and in the tolerance to copper accumulation in plants. The experimental design was completely randomized with a 3x5 factorial arrangement, using the fungi *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum* and control (without inoculation) and five doses of copper (0, 100, 200, 300 and 400 mg of copper kg⁻¹) and seven replications. Evaluated plant height, stem diameter, number of tillers, root volume, shoot dry mass, root dry mass, copper content in the grain, shoot and root, available and pseudo-total copper in the soil, percentage of mycorrhizal colonization, tolerance and translocation index, bioconcentration and bioaccumulation factor. The results indicate that the increase of copper doses in the soil reduces morphological variables of the plants. The inoculation of mycorrhizal fungi allows tolerance of plants to copper. The corn is more responsive to mycorrhizal colonization. Inoculation of mycorrhizal fungi increases the bioconcentration factor and tolerance index of cultures.

Key words: Arbuscular mycorrhizae. Heavy metal. *Zea mays*. *Sorghum bicolor*.

4.3 INTRODUÇÃO

O milho é uma espécie agrícola de grande importância no mundo pelos diversos produtos produzidos por meio de sua matéria-prima, como combustíveis, bebidas, polímeros, além de ser utilizada na alimentação humana e animal (CONTINI *et al.*, 2019; MIRANDA, 2018). O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é considerado o quinto cereal de maior importância no mundo, com cultivo destinado basicamente para consumo humano, animal e produção de etanol (GUEDES *et al.*, 2019). Em países da África e Ásia, o sorgo tem sido um dos alimentos básicos utilizado na alimentação de milhões de pessoas, com papel fundamental na segurança alimentar nessas regiões (MUTISYA *et al.*, 2009). No Brasil e em outros países ocidentais, a cultura do sorgo é cultivada basicamente para alimentação animal (TALEON *et al.*, 2012). Destaca-se pela rusticidade e pela possibilidade de seu cultivo fora do zoneamento agroclimático do milho, por ter maior tolerância ao déficit hídrico (DUARTE, 2010).

O cobre, assim como os demais metais pesados, compõe a estrutura de minerais que formam as rochas e estão presentes de forma natural no solo (SANTANA, 2020). Porém, sua concentração no solo, em algumas áreas, tem aumentado em decorrência de diversas atividades antrópicas, como a intensificação de atividades industriais, agrícolas e mineração (ANDREAZZA *et al.*, 2013), o que pode limitar o crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais. Sintomas como clorose, necrose, baixa produção de biomassa e até morte da planta são provocados pela toxidez ao cobre (SANTANA, 2020).

Em decorrência do aumento na concentração de cobre no solo, algumas alternativas, como o uso de plantas e microrganismos, estão sendo utilizadas, uma vez que certas espécies apresentam capacidade fitoextratora, podendo extrair ou metabolizar elementos tóxicos, tornando indisponíveis às plantas (MUGOUEI *et al.*, 2011). Nesse sentido, os fungos micorrízicos arbusculares merecem destaque pois são componentes importantes da biomassa microbiana do solo e estão envolvidos em diversos processos no sistema solo-planta (RODRIGUES *et al.*, 2018). Estes organismos apresentam estruturas conhecidas como hifas que, ao se associar as plantas, atuam como uma extensão do sistema radicular, possibilitando maior absorção de água e nutrientes, principalmente os pouco móveis, além de promover melhoria na estrutura do solo com a formação de macro e micro agregados, tolerância a estresses abióticos e a elementos tóxicos (VALADARES *et al.*, 2016). Na literatura existem estudos que indicam uma diversidade de plantas com potencial fitoextrator, tanto na presença como ausência de fungos micorrízicos. Entre elas destaca-se espécies florestais (De MARCO *et al.*, 2017; BONFIM, 2020), plantas de cobertura (VENDRUSCULO, 2013) e aveia

(ANDREAZZA *et al.*, 2010). Porém, espécies como o milho e o sorgo ainda são pouco exploradas. Neste sentido, necessita-se de mais estudos envolvendo estas culturas e a utilização de fungos micorrízicos arbusculares.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi analisar o comportamento de fungos micorrízicos no crescimento e desenvolvimento de milho e sorgo em solo contaminado com cobre.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, campus de Frederico Westphalen. O solo utilizado no experimento foi coletado na camada de 0-20 cm e caracterizado como Latossolo Vermelho (SANTOS, 2018). Após a coleta, o solo foi peneirado em malha de 2 mm e esterilizado em autoclave a 121°C em 3 ciclos de 30 min. Posteriormente foi realizada uma mistura do solo original com areia média na proporção de 50% (v/v) para obtenção de textura de 46 %, aproximadamente. Desta mistura, foi retirada uma amostra e encaminhada para análise dos atributos físicos e químicos, os quais estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Análise física e química da mistura de solo + areia utilizada para cultivo de sorgo e milho.

| -----Parâmetros----- | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|----------------|------|-----|-------------------|-----|------|
| Teor de Argila | pH | MO | P | K | Cu | Zn | Mg | Al+H |
| % | 1:1 | % | -----mg/L----- | | | -----Cmolc/L----- | | |
| 46 | 5,3 | 1,0 | 4,6 | 27,5 | 4,2 | 1,3 | 1,0 | 4,9 |

Fonte: Autor (2022)

Após interpretação da análise, foi feita a correção de pH elevando o mesmo para 6,5 com o uso de calcário dolomítico e a adubação foi realizada com o uso de adubo químico formulado NPK 10-20-10, de acordo com a recomendação do Manual de Calagem e Adubação para os Estados do RS e SC (2016), para as culturas do sorgo e milho. A contaminação do solo com as doses de cobre ocorreu 30 dias antes da semeadura, com a utilização de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O), sendo homogeneizado por meio de agitação em saco plástico juntamente com o solo.

Os isolados de fungos micorrízicos arbusculares (*Acaulospora scrobiculata* e *Rhizoglyphus clarum*) foram obtidos na Embrapa Agrobiologia localizada em Seropédica-RJ. A cultivar de milho utilizada foi MORGAN 20A78 e a cultivar de sorgo foi AGROCERES 2501.

A semeadura das espécies ocorreu na primeira quinzena de outubro de 2020, sendo semeadas 4 sementes por vaso, as quais foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% por 15 min e depois lavadas em água corrente. No momento da semeadura também foi inoculado 30 esporos de cada isolado de fungo micorrízico em cada vaso, correspondente ao tratamento. O desbaste das mudas ocorreu 10 dias após a semeadura, deixando-se apenas uma planta por vaso. Os vasos utilizados no experimento apresentavam capacidade para 5 litros, os quais foram preenchidos com 5 kg de solo e a irrigação das plantas foi realizada por meio de gotejamento.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial (3x5), sendo testado duas espécies de fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum*) e a testemunha sem inoculação e cinco doses de cobre (0, 100, 200, 300 e 400 mg de cobre kg⁻¹) e sete repetições.

Aos 120 dias, com o final do ciclo das culturas, foram realizadas avaliações de: altura de planta (AP), com medida feita do colo da planta até a folha bandeira, por meio de fita métrica; diâmetro de colmo (DC) com auxílio de paquímetro digital; número de perfilhos (sorgo) e volume de raiz (VR) com auxílio de proveta graduada. A planta foi dividida em parte aérea, raiz e grão, sendo colocadas em sacos e levadas para estufa a 65°C até apresentarem peso constante. Posteriormente, parte aérea, raiz e grão foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha 10 mesh para análise dos teores de cobre, por meio de digestão nitro-perclórica (3:1) e determinação em espectrofotometria de absorção atômica conforme Miyazawa *et al.*, (2009). Também foi determinado os teores de cobre pseudo-total no solo por meio de metodologia 3050b descrita por USEPA (1996) e cobre disponível através de solução extratora Melhlich⁻¹ (SOBRAL *et al.*, 2013).

A colonização micorrízica foi determinada por meio da técnica de clarificação e coloração de raiz com Azul de Trypan 0,05% e a porcentagem de colonização estimada em três repetições por planta pelo método de placa quadriculada (GIOVANETTI; MOSSE, 1980).

Foi determinado o índice de tolerância (Itol) pela equação: $Itol = (MST_{dn}/MST_{d0}) * 100$, levando em consideração a massa seca total (MST) nas doses 100 a 400 mg kg⁻¹ (dn) e na dose zero (d0) (WILKINS, 1978). O índice de translocação (Itra) através da equação $Itra = (CuAP_{dn}/CuAT_{dn}) * 100$ com base nas quantidades acumuladas de cobre na parte aérea (CuAPA) e cobre total (CuAT) (ABICHEQUER; BOHNEN, 1998). O fator de bioconcentração

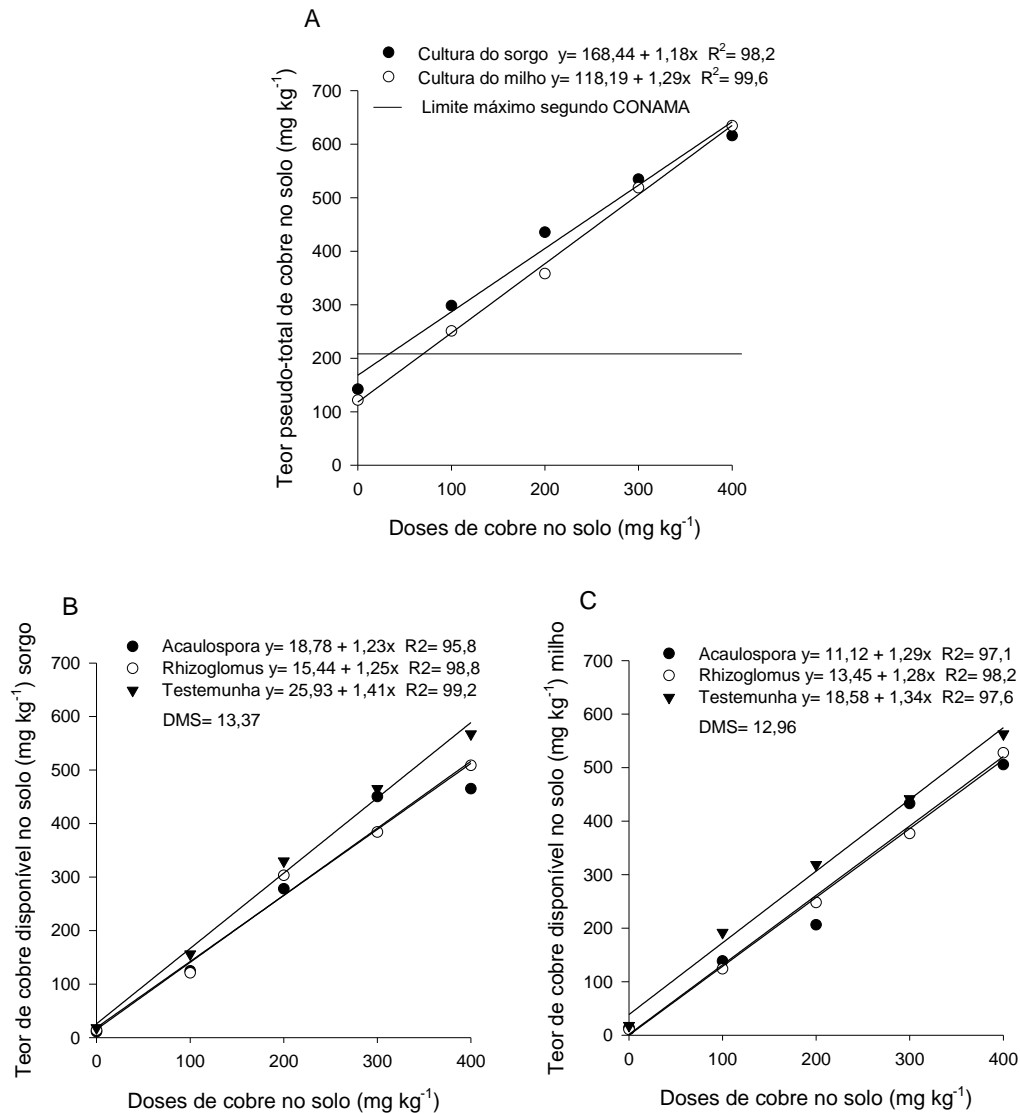
foi determinado através da razão entre a concentração de cobre na raiz (mg kg^{-1}) e concentração pseudo-total no solo (mg kg^{-1}) e o fator de bioacumulação por meio da razão entre a concentração de metal na parte aérea (mg kg^{-1}) e a concentração pseudo-total no solo (mg kg^{-1}) (YOON *et al.*, 2006).

Após obtenção dos resultados, os mesmos foram submetidos a análise de variância com auxílio do programa estatística SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo que quando houve interação significativa, desdobrou-se os efeitos das doses em cada tratamento com inoculação através de análise de regressão e quando não significativo, o fator qualitativo (fonte de inóculo) foi avaliado por meio de comparação de médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro e o fator quantitativo (doses de cobre) avaliado por meio de regressão.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor pseudo-total de cobre no solo aumentou gradativamente com as doses aplicadas para sorgo e milho, sendo que a partir da dose $67,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de cobre no solo para o sorgo (Figura 1A), os valores ficaram acima do limite máximo permitido para áreas agrícolas estabelecido pelo CONAMA (2009) que é de 200 mg kg^{-1} de cobre e de 203 mg kg^{-1} pela FEPAM, RS (2014). Também ocorreu elevação nos teores de cobre disponível no solo, para todos os tratamentos nas duas espécies (Figura 1B e 1C), sendo que no tratamento *Rhizoglyphus clarum* do milho, o teor de cobre ficou acima do permitido na dose $79,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de cobre aplicado. Neste sentido, os teores de cobre presentes nesses solos ficam acima do permitido para áreas de investigação agrícola.

Figura 1 - Teor pseudo-total e cobre disponível em solo cultivado com sorgo e milho com inoculação de fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizogloium clarum* e testemunha sem inoculação) e doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



Fonte: Autor (2022)

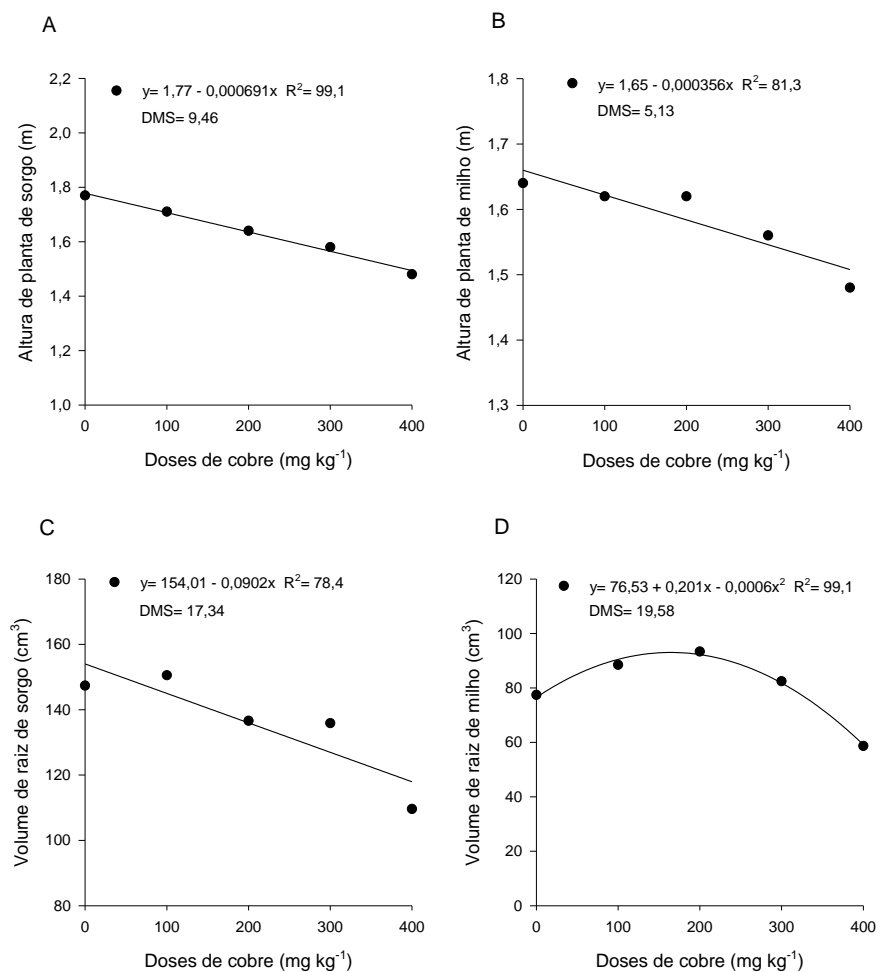
O cobre pode estar disponível para as plantas quando presente na solução do solo na forma livre e também complexado com a matéria orgânica. A disponibilidade desse metal é controlada por processos químicos como precipitação-dissolução, adsorção-dessorção e complexação (AREND, 2010).

Os resultados não evidenciaram interação significativa entre doses de cobre aplicadas no solo e fontes de inóculo para as variáveis altura de planta (AP), diâmetro de colmo (DC), volume de raiz (VR) de sorgo e milho e número de perfilhos de sorgo. Para volume de raiz e

altura de planta de sorgo e milho houve efeito simples para as duas fontes de variação, porém, diâmetro de colmo e número de perfilhos somente se diferenciaram em função das fontes de inóculo (Figura 2 e Tabela 1).

A altura de plantas evidenciou redução linear com as doses de cobre para milho e sorgo (Figura 2A e 2B). Resultados semelhantes foram observados por Fruet (2018) ao avaliar a espécie florestal *Peltophorum dubium* (canafístula) e por Panziera *et al.*, (2018) analisando a cultura da aveia preta, em ambos os casos, houve redução da altura de planta com a adição de doses elevadas de cobre. Altas concentrações de cobre interferem na cadeia transportadora de elétrons do fotossistema I, reduzindo a produção de foto-assimilados e consequentemente diminui o crescimento apical (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Figura 2 - Altura de planta (AP) e volume de raiz (VR) de sorgo e de milho submetidos a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



O volume de raiz de sorgo foi reduzido de forma linear com o aumento das doses de cobre (Figura 2C) enquanto o milho apresentou resposta quadrática com ponto de máxima na dose de $167,5 \text{ mg kg}^{-1}$, correspondendo a $93,36 \text{ cm}^3$ de volume (Figura 2D). Silva (2019) também evidenciou diminuição do volume de raiz para soja e sorgo com o aumento das doses de cobre. A redução do sistema radicular em solos com presença de cobre pode ser um mecanismo utilizado pelas plantas para diminuir a área de contato com os íons de Cu presentes no solo, limitando sua absorção (SILVA *et al.*, 2018). Entretanto, quando em baixas concentrações, o Cu é considerado um micronutriente, atuando em diversos processos fisiológicos da planta (TAIZ; ZEIGER, 2017), isso pode explicar o aumento do volume de raiz de milho nas doses iniciais de cobre.

Os inóculos micorrízicos proporcionaram aumento da altura de planta, diâmetro de colmo, volume de raízes e número de perfilhos no sorgo, quando comparado com a testemunha, porém, sem diferença entre as espécies estudadas, enquanto o inóculo *Rhizoglyphus clarum* proporcionou maior diâmetro de colmo e volume de raízes no milho (Tabela 2). Ao avaliar o efeito da inoculação de FMAs com doses de fósforo no milho, Gomes Junior *et al.*, (2018) constataram aumento no volume de raiz ao inocular os fungos micorrízicos. Sales (2018) trabalhando com cana de açúcar, não verificaram efeito dos isolados micorrízicos no diâmetro de colmo da cultura. Abreu *et al.*, (2018) salientaram que o aumento de altura de planta e diâmetro de colmo são benefícios proporcionados pelos FMAs e estão relacionados com a capacidade destes fungos, em produzir hifas, as quais aumentam o volume de solo explorado pelo sistema radicular e com isso favorecem o crescimento das plantas. Além disso, os FMAs são responsáveis por aumentar a superfície das raízes, permitindo maior capacidade de absorção de água e nutrientes necessários para o crescimento e sobrevivência das plantas (CRISTINO *et al.*, 2019).

Tabela 2 - Altura de planta (AP), Diâmetro de colmo (DC) e volume de raiz (VR) de sorgo e milho e número de perfilhos de sorgo inoculados com fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum*, testemunha, sem inoculação).

| -----Sorgo----- | | | | |
|-----------------------|--------|---------|----------|--------------|
| Fontes de inóculo | AP (m) | DC (mm) | VR (ml) | Nº perfilhos |
| <i>Acaulospora s.</i> | 1,76 A | 11,33 A | 142,37 A | 3,57 A |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 1,68 A | 10,95 A | 142,92 A | 3,58 A |
| Testemunha | 1,47 B | 9,44 B | 122,63 B | 2,94 B |
| CV (%) | 15,91 | 17,00 | 29,18 | 42,96 |
| -----Milho----- | | | | |
| Fontes de inóculo | AP (m) | DC (mm) | VR (ml) | |
| <i>Acaulospora s.</i> | 1,65 A | 14,62 B | 80,45 B | |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 1,61 A | 16,44 A | 96,20 A | |
| Testemunha | 1,48 B | 14,35 B | 63,48 C | |
| CV (%) | 8,69 | 21,19 | 32,95 | |

Fonte: Autor

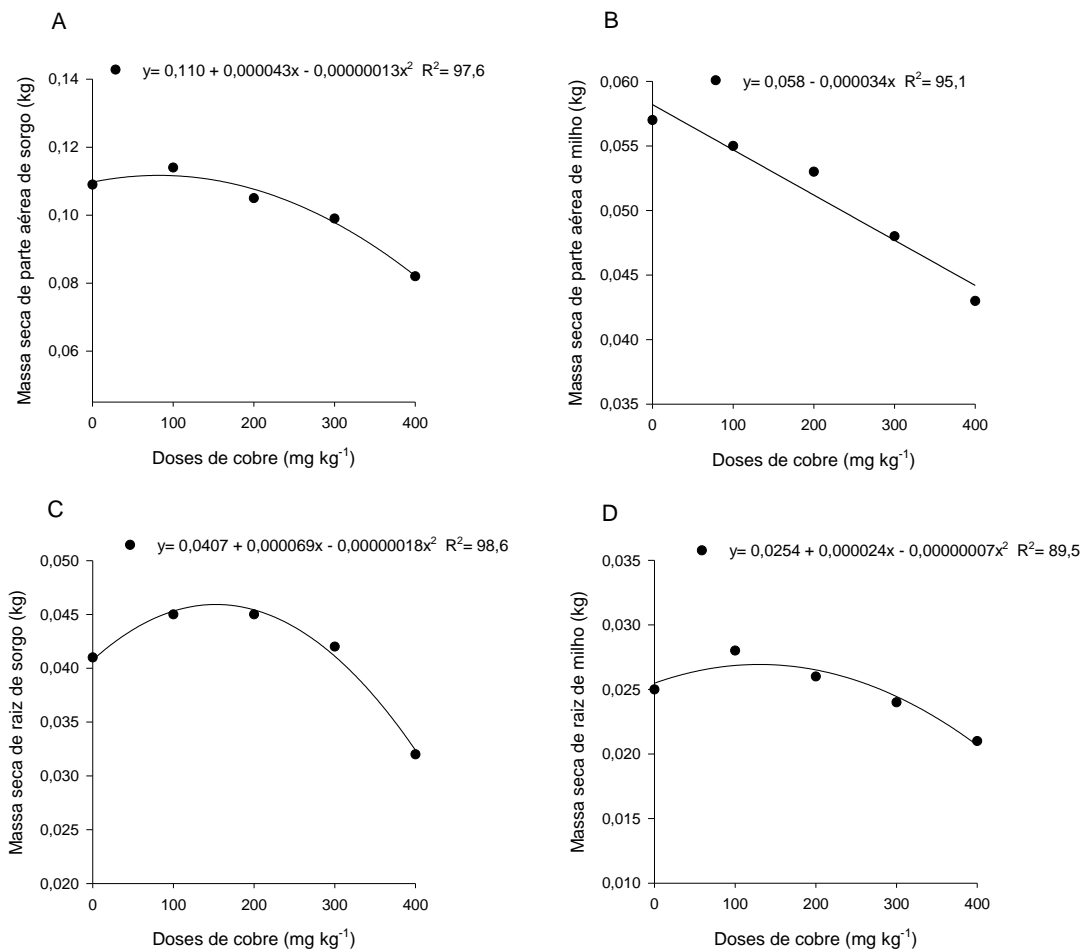
*médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) de probabilidade de erro.

A massa seca de parte aérea de sorgo aumentou de forma quadrática até a dose estimada de 165,34 mg de cobre kg^{-1} de solo (Figura 3A) e o milho apresentou redução linear em função das doses de cobre (Figura 3B). Altas doses de cobre reduzem a massa seca de parte aérea tanto de plantas anuais como o sorgo, quanto de espécie arbórea como *Erythrina crista-galli* (VENDRUSCULO *et al.*, 2018; MAY *et al.*, 2020, DE MARCO *et al.*, 2021). O excesso de cobre pode causar redução da taxa fotossintética, e com isso, reduzir a produção de foto-assimilados pelo vegetal, o que implica uma diminuição no crescimento da planta (KABATA-PENDIAS, 2011).

Massa seca de raiz de sorgo e de raiz de milho apresentaram aumento quadrático com maior valor nas doses de 191,66 mg de cobre kg^{-1} de solo para o sorgo (Figura 3C) e 171,43 mg de cobre kg^{-1} de solo para o milho (Figura 3D). Na literatura também há resultados semelhantes com redução da massa seca de raízes de milho a partir da dose 200 mg kg^{-1} de

cobre (MANTOVANI, 2009) e redução do crescimento de plantas de milho com dose de 120 mg kg⁻¹ de cobre (TIECHER *et al.*, 2018).

Figura 3 - Massa seca de parte aérea (MSPA) de sorgo e massa seca de raiz (MSR) de sorgo e milho submetidas a diferentes doses de cobre no solo (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



Fonte: Autor (2022)

As inoculações proporcionaram maior massa seca de parte aérea de sorgo e milho em relação ao tratamento controle, porém não diferiram entre as espécies estudadas (Tabela 3). Houve aumento da massa seca de raiz de sorgo com a inoculação da espécie *Acaulospora scrobiculata* com média de 0,049 kg. No milho, não teve diferença entre os tratamentos, apresentando média de 0,026 kg. Efeito positivo da inoculação de FMAs na massa seca de parte aérea também foi constatado em espécies florestais como Jenipapeiro e paricá e em espécies

agrícolas como o milho, algodão, feijão e soja (SOARES *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018; SALGADO, 2014), além disso, em estudo realizado por Salgado (2014), o mesmo evidenciou que as espécies *Acaulospora scrobiculata* e *Claroideoglosum etunicatus* proporcionaram maior massa seca de raiz de milho. Os FMAs também são capazes de aumentar a biomassa vegetal e a fixação de Carbono na parte aérea das plantas, devido a maior absorção de nutrientes (BRAGHIROLI *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de sorgo e milho inoculadas com fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum* e testemunha, sem inoculação).

| -----Sorgo----- | | |
|-----------------------|-----------|----------|
| Fontes de inóculo | MSPA (kg) | MSR (kg) |
| <i>Acaulospora s.</i> | 0,113 A | 0,049 A |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 0,105 A | 0,041 B |
| Testemunha | 0,087 B | 0,032 C |
| CV (%) | 22,33 | 31,33 |
| -----Milho----- | | |
| Fontes de inóculo | MSPA (kg) | MSR (kg) |
| <i>Acaulospora s.</i> | 0,056 A | 0,025 A |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 0,057 A | 0,026 A |
| Testemunha | 0,041 B | 0,023 B |
| CV (%) | 18,10 | 20,04 |

Fonte: Autor

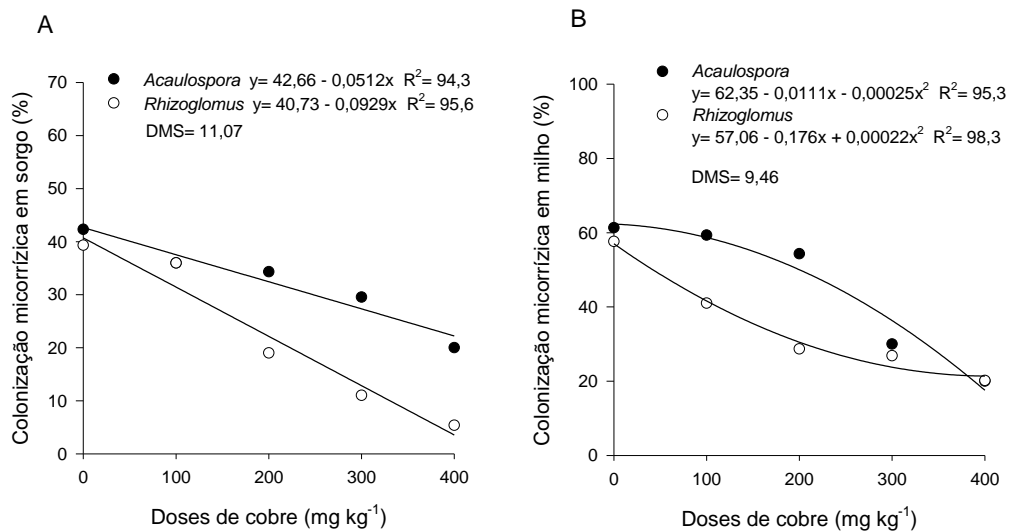
*médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) de probabilidade de erro.

Os resultados demonstraram interação significativa entre fontes de inóculo e doses de cobre para a taxa de colonização micorrízica do sorgo e milho (Figura 4). A espécie *Acaulospora scrobiculata* apresentou as maiores taxas de colonização comparado com a *Rhizoglosum clarum*, nas duas culturas agrícolas. No entanto, a colonização micorrízica no milho foi maior comparado com o sorgo. Os FMAs são fundamentais na absorção de água e

nutrientes, e são capazes de manter o seu crescimento e desenvolvimento mesmo em ambientes estressantes (RODRIGUES *et al.*, 2018). De acordo com Angelini *et al.*, (2012) a colonização micorrízica pode ser afetada por diversos fatores como a espécie vegetal, idade da planta, densidade de raízes, eficiência de colonização dos fungos e o manejo do solo, devido a isso, é que há uma grande diferença no efeito da colonização, tanto entre espécies de FMAs como em culturas agrícolas.

A colonização micorrízica do sorgo teve redução linear com o aumento das doses de cobre no solo, sendo mais expressiva com a inoculação da espécie *Rhizoglyphus clarum*, a qual reduziu 33%, porém, a *Acaulospora scrobiculata* apresentou maior colonização radicular na maior dose de cobre testada (Figura 4A), demonstrando uma maior tolerância dessa espécie ao aumento das doses de cobre no sorgo. Para o milho, a colonização micorrízica se comportou de forma quadrática para ambas as espécies, porém, *Acaulospora scrobiculata* foi a que apresentou maior colonização e obteve ponto de máxima na dose 22 mg kg⁻¹ com 61,9% de colonização micorrízica, no entanto, não diferiram entre si a partir da dose 300 mg kg⁻¹ de cobre (Figura 4B). Salgado (2014) ao avaliar a taxa de colonização de algumas espécies de FMAs em culturas agrícolas, verificou que a espécie *Acaulospora scrobiculata* colonizou em torno de 30 a 40% em plantas de milho e feijão, sendo que em culturas como o algodão essa taxa de colonização foi ainda menor. Entretanto, Rosa (2019) trabalhando com mudas de videira, observou redução de 70% da taxa de colonização micorrízica com a adição de 150 mg kg⁻¹ de cobre no solo, demonstrando assim, que altas doses de cobre apresentam efeito tóxico para esta associação.

Figura 4 - Porcentagem de colonização micorrízica do sorgo e milho cultivado em diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹), inoculados com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum* e Testemunha sem inoculação.



Fonte: Autor (2022)

Não houve interação significativa entre doses de cobre e fontes de inóculo para as variáveis teor de cobre na raiz (CuR) e parte aérea (CuPA) de sorgo e milho e teor de cobre no grão (CuG) de milho, apresentando somente efeito simples para os fatores de variação (Figura 5 e Tabela 3).

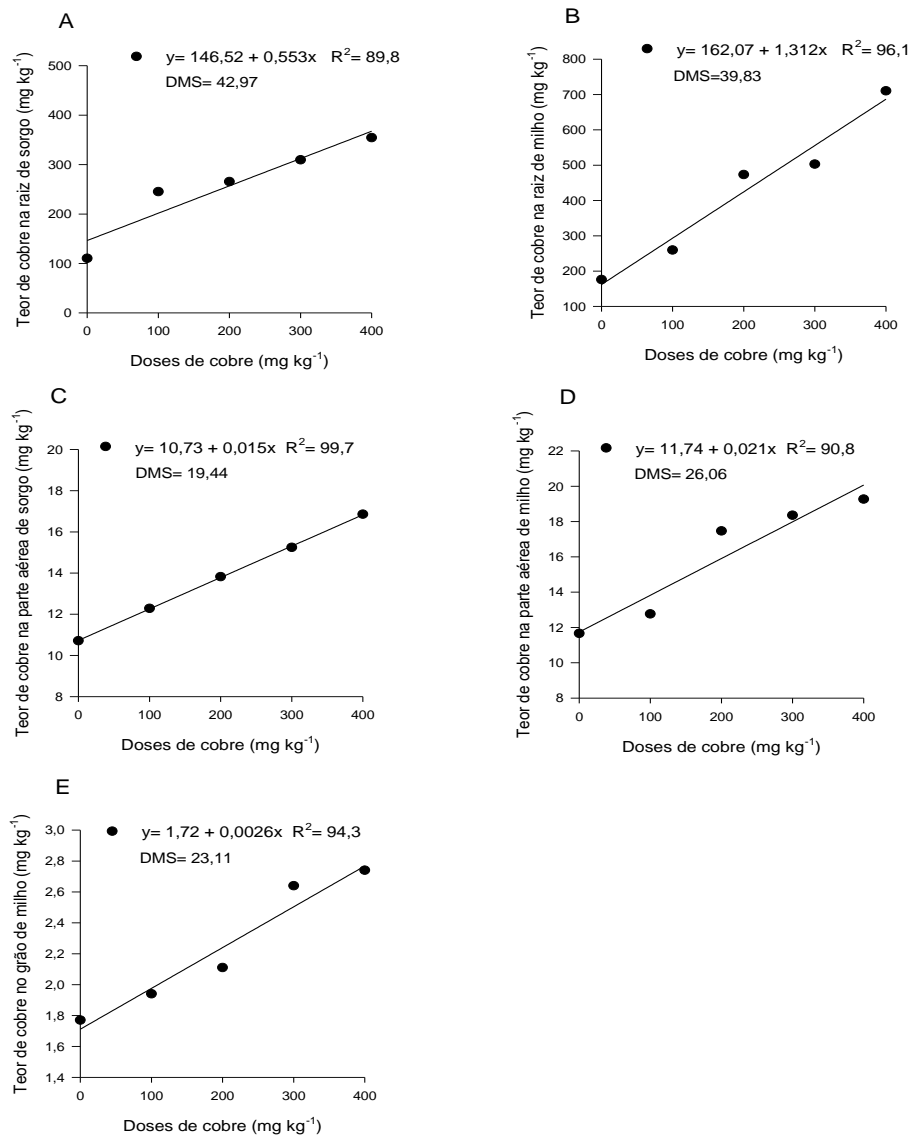
O teor de cobre na raiz e na parte aérea de sorgo e milho e também o teor de cobre no grão de milho apresentaram aumento linear em função das doses crescentes de cobre no solo (Figura 5). Na raiz, ocorreu a maior concentração de cobre, em relação as demais partes da planta, sendo que, esse acúmulo foi mais elevado no milho com aumento de 76% em função das doses de cobre aplicadas, apresentando teor de 710 mg kg⁻¹ de cobre no sistema radicular no tratamento com 400 mg kg⁻¹ de cobre (Figura 5A e 5B). Plantas de sorgo e milho são mais eficazes em fitoextrair metais pesados como o cobre, podendo absorver quantidades significativas (TAVARES *et al.*, 2013). Em trabalho realizado por Huerta *et al.*, 2021 e May *et al.*, (2020) foi constatado que a maior concentração de metais ocorreu no sistema radicular das plantas, assim como foi encontrado no presente estudo.

O teor de cobre na parte aérea das duas espécies se elevou de forma linear com o aumento das doses de cobre aplicadas (Figura 5C e 5D), porém os teores estão abaixo dos 30 mg kg⁻¹, que é o limite máximo tolerável para alimentos (matéria seca) (ANVISA, 1969). O menor teor de cobre da parte aérea comparado com o sistema radicular também foi relatado em

outros estudos (ZANCHETA *et al.*, 2011; SEIDEL *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2018). Esse comportamento pode estar relacionado com características do metal, o qual possui pouca mobilidade dentro da planta e com isso tende a se concentrar nas raízes dos vegetais (DALCORSO *et al.*, 2014).

O teor de cobre no grão de milho também aumentou de forma linear em função das doses de cobre (Figura 5E), porém, os teores encontrados também estão abaixo do limite máximo de tolerância proposto pelo Regulamento Técnico do Ministério da Saúde, que é de 10 mg kg⁻¹ de cobre em grãos (Brasil, 1998), deste modo, não apresentando riscos para o consumo desse produto.

Figura 5 - Teor de cobre na raiz (CuR), na parte aérea (CuPA) de sorgo e milho e no grão (CuG) do milho, cultivado em solo com diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



A inoculação dos fungos micorrízicos resultou em menor teor de cobre na raiz e parte aérea de sorgo e milho, comparado com o tratamento testemunha, porém, sem diferença entre inóculos e para teor de cobre no grão não houve diferença entre as espécies (Tabela 3). Santana (2018) analisando o efeito de FMAs na fitorremediação de cobre em solo arenoso, observou redução dos teores de cobre no sistema radicular de plantas de *Canavalia ensiformis* quando houve inoculação de *Rhizogloium clarum*. De acordo com Ruscitti *et al.*, (2017), os FMAs são capazes de acumular metais em órgãos não vitais, além de manter a integridade das membranas celulares, podem também, reter esses elementos nos micélios fúngicos ou em paredes celulares, impedindo que sejam absorvidos pelas plantas. Além disso, devido a maior absorção de fósforo pelos FMAs, há a formação de complexos fosfato-metal nas raízes, possibilitando redução da mobilidade e toxidez do elemento na planta (SANTANA, 2018).

Tabela 3 - Teor de cobre em raiz (TCR) e parte aérea (TCPA) de sorgo e milho e teor de cobre no grão (TCG) de milho inoculado com fungos micorrízicos (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizogloium clarum* e Testemunha, sem inoculação).

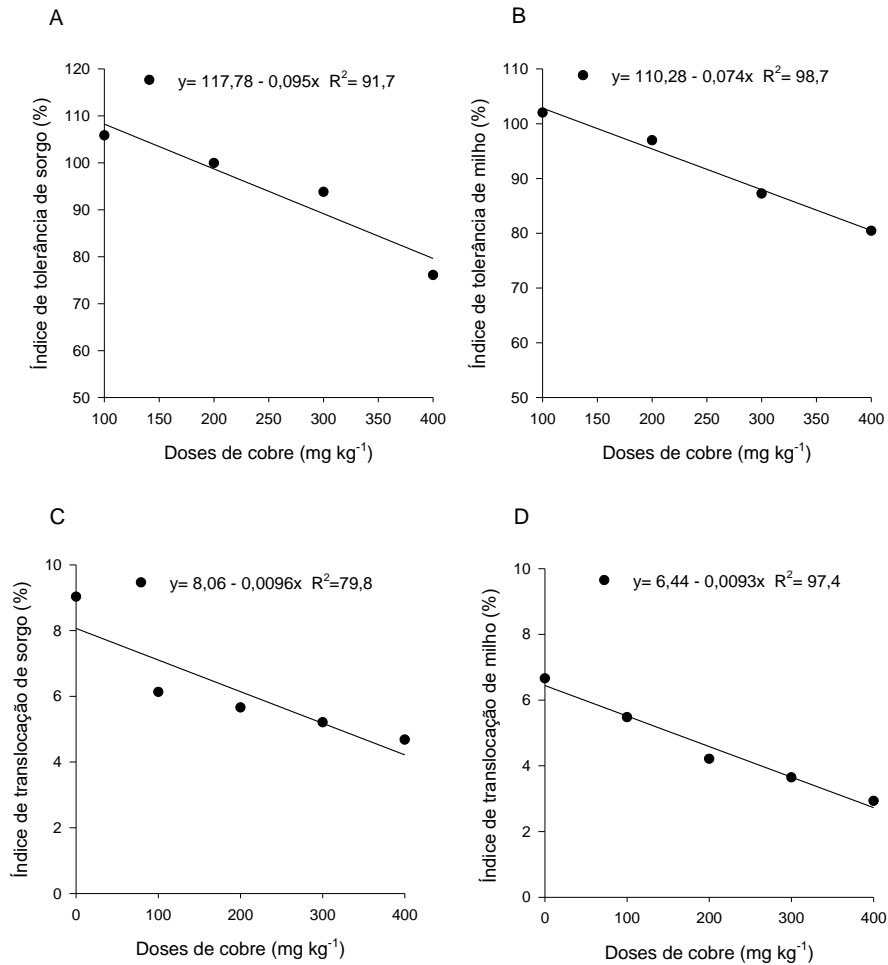
| -----Sorgo----- | | | |
|-----------------------|----------|---------|--------|
| Fontes de inóculo | TCR | TCPA | |
| <i>Acaulospora s.</i> | 242,71 B | 12,93 B | |
| <i>Rhizogloium c.</i> | 218,76 B | 12,56 B | |
| Testemunha | 309,71 A | 15,85 A | |
| CV (%) | 40,63 | 18,39 | |
| -----Milho----- | | | |
| Fontes de inóculo | TCR | TCPA | TCG |
| <i>Acaulospora s.</i> | 409,52 B | 14,36 B | 2,03 A |
| <i>Rhizogloium c.</i> | 349,12 B | 14,60 B | 2,29 A |
| Testemunha | 514,75 A | 18,75 A | 2,39 A |
| CV (%) | 37,67 | 24,65 | 21,85 |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) de probabilidade de erro.

Não houve interação significativa entre doses de cobre e fontes de inóculo para o índice de tolerância (ITOL), índice de translocação (ITRA), fator de bioconcentração e fator de bioacumulação para sorgo e milho, demonstrando apenas efeito simples para os tratamentos (Figura 6 e 7 e Tabela 4). O ITOL teve redução linear em função das doses de cobre, nas duas espécies vegetais, porém, permaneceu acima de 70% (Figura 6A e 6B). Quando esse índice for superior a 60% indica alta tolerância das plantas aos contaminantes (LUX *et al.*, 2004), sendo assim, ambas as culturas agrícolas estudadas apresentam alta tolerância ao cobre. Conforme Cambrollé *et al.*, (2013), a tolerância ao cobre pode estar relacionada com a capacidade da planta em acumular metal nas raízes, impedindo a translocação para as demais partes do vegetal. O ITRA também apresentou redução linear com o aumento das doses de cobre aplicadas para sorgo e milho (Figura 6C e 6D). De acordo com a literatura, quanto menor ou próximo a zero for o índice de translocação, maior será a probabilidade de sobrevivência e crescimento da planta em ambientes contaminados (BRANZINI *et al.*, 2012; SCHEID *et al.*, 2018), deste modo, nota-se que a cultura do milho possui maior possibilidade de sobreviver em ambientes com presença de metais pesados.

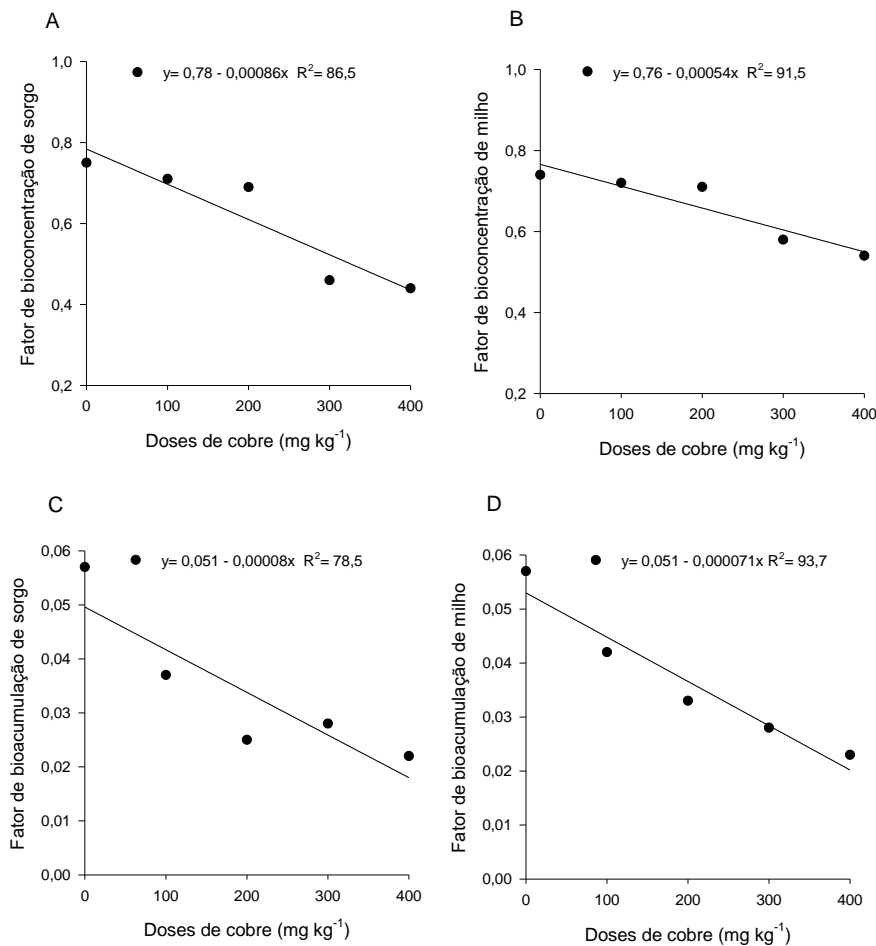
Figura 6 - Índice de tolerância (ITOL) e Índice de translocação (ITRA) de sorgo e milho cultivado em diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



Fonte: Autor (2022)

Houve redução linear do fator bioconcentração para sorgo e milho com o aumento das doses de cobre, sendo que para o sorgo esse decréscimo foi maior, no entanto, o fator bioconcentração permaneceu abaixo de uma unidade para as duas espécies (Figura 7A e 7B). Esse fator mede a capacidade da planta em bioconcentrar elementos, como o cobre, em seus tecidos (BOLEJI *et al.*, 2021), sendo que, quando for superior a uma unidade indica que as plantas podem ser recomendadas para fitoextração de contaminantes (MCGRATH; ZHAO, 2003). Neste sentido, o sorgo e milho apresentam baixo potencial para bioconcentrar cobre, sendo consideradas plantas excludentes ou estabilizadoras (MUNIVE CERRÓN *et al.*, 2018). O fator de bioacumulação também reduziu com as doses de cobre no sorgo (Figura 7C) e no milho (Figura 7D), permanecendo abaixo de uma unidade. Este fator mede a capacidade da planta em absorver o elemento do meio e acumulá-lo no tecido vegetal (PINTO *et al.*, 2016). Estes mesmos autores salientam que plantas tolerantes possuem fator de bioacumulação menor que um, o que concorda com o encontrado neste estudo.

Figura 7 - Fator de bioconcentração e bioacumulação de sorgo e milho cultivado em diferentes doses de cobre (0, 100, 200, 300, 400 mg kg⁻¹).



Fonte: Autor (2022)

Em relação as fontes de inóculo, observa-se que houve diferença significativa para o índice de translocação do sorgo, índice de tolerância de sorgo e milho e para os fatores de bioconcentração e bioacumulação. Com as espécies inoculadas, o índice de translocação do sorgo (ITRA) reduziu comparado com a testemunha, sem inoculação, demonstrando que podem favorecer a sobrevivência de plantas de sorgo em ambientes contaminados (Tabela 4). Microrganismos, como os fungos micorrízicos abusculares, são capazes de modificar os metais pesados, podendo ser por meio de alteração da toxicidade, mobilidade e solubilidade (GADD, 2010), além disso, podem alterar a fisiologia das raízes através do aumento da espessura da parede celular, competição física por espaço e maior lignificação das raízes (DANTAS *et al.*, 2009). O índice de tolerância (ITOL) de sorgo e milho teve aumento com a inoculação dos

fungos micorrízicos, ficando acima de 60%, apontando o benefício proporcionado por esses microrganismos. Os FMAs são capazes de promover maior tolerância devido a redução na translocação de metais pesados das raízes para a parte aérea, através da formação de compostos insolúveis entre os íons fosfato e metais no sistema radicular (SOARES *et al.*, 2007).

Tabela 4 - Índice de tolerância (ITOL), Índice de translocação (ITRA), Fator de bioconcentração e Fator de bioacumulação de sorgo e milho inoculados com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum* e testemunha sem inoculação.

| -----Sorgo----- | | | | |
|-----------------------|----------|----------|--------------------------|------------------------|
| Fontes de inóculo | ITOL (%) | ITRA (%) | Fator de Bioconcentração | Fator de Bioacumulação |
| <i>Acaulospora s.</i> | 96,91 A | 5,84 B | 0,68 A | 0,032 A |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 95,07 A | 5,69 B | 0,65 A | 0,033 A |
| Testemunha | 89,84 B | 6,89 A | 0,51 B | 0,038 A |
| CV (%) | 26,11 | 24,9 | 15,64 | 31,5 |
| -----Milho----- | | | | |
| Fontes de inóculo | ITOL (%) | ITRA (%) | Fator de Bioconcentração | Fator de Bioacumulação |
| <i>Acaulospora s.</i> | 94,72 A | 3,95 A | 0,71 A | 0,032 B |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 92,29 A | 5,14 A | 0,72 A | 0,031 B |
| Testemunha | 88,01 B | 4,66 A | 0,56 B | 0,047 A |
| CV (%) | 17,43 | 47,05 | 20,91 | 29,95 |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) de probabilidade de erro.

As espécies de FMAs foram capazes de aumentar o fator de bioconcentração de sorgo e milho ao comparar com o tratamento controle, porém permaneceram abaixo de uma unidade (Tabela 4). O fator de bioacumulação de milho apresentou redução com a inoculação dos fungos micorrízicos, no entanto, no sorgo não houve diferença entre as fontes de inóculo. A concentração de metais nas plantas pode ser alterada pelos FMAs, por meio da imobilização

nos componentes da parede celular de hifas, quelação do metal por compostos como a glomalina, que são excretados pelos fungos e também pela compartimentalização dos metais no interior das células fúngicas (FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012).

4.6 CONCLUSÃO

O aumento das doses de cobre no solo ocasionou redução das variáveis morfológicas de sorgo e milho.

A inoculação dos fungos micorrízicos possibilitou maior tolerância das plantas ao aumento das doses de cobre.

O milho foi mais responsivo na colonização micorrízica, sendo que a espécie *Acaulospora Scrobiculata* foi a que se adaptou melhor as condições e também a cultura.

A inoculação dos fungos micorrízicos aumentou o fator de bioconcentração e índice de tolerância de sorgo e milho, sendo que ambas as espécies apresentaram alta tolerância ao cobre.

4.7 REFERÊNCIAS

ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 3, p. 21-26, 1998.

ABREU, Gustavo M. *et al.* Crescimento inicial e absorção de fósforo e nitrogênio de *Enterolobium contortisiliquum* inoculada com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 1, p. 156-164, 2018.

ANDREAZZA, Robson *et al.* Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; WOLF, L.; LEE, M. K.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C. Characterization of copper biosorption and bioreduction by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. **Science of the Total Environment**, 408, 7: 1501-1507, 2010.

ANVISA. Decreto nº 22.688, de 27 de Agosto de 1965. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm>. Acesso em: 10 fevereiro de 2022.

ANGELINI, Guilherme Augusto Robles *et al.* Colonização micorrízica, densidade de esporos e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em solo de Cerrado sob plantio direto e convencional. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 115-130, 2012.

AREND, Karine *et al.* **Qualidade da matéria orgânica e disponibilidade de cobre em solos de áreas de videira.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

BOLEJI, Lesly Aguilar *et al.* Bioconcentration and bioaccumulation of toxic metals in *Scirpus californicus* from natural wetlands in the Central Andes of Peru. **Revista Ambiente & Água**, v. 16, 2021.

BOMFIM, Nayane Cristina Pires. **Crescimento, tolerância e potencial fitorremediador de *Leucaena leucocephala* em solo contaminado por cobre e ferro.** Dissertação de mestrado – UNESP, Ilha Solteira – SP, 2020.

BRAGHIROLI, Felipe Luiz *et al.* Fungos micorrízicos arbusculares na recuperação de florestas ciliares e fixação de carbono no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 3, p. 733-744, 2012.

BRANZINI, A.; GONZÁLEZ, R. S.; ZUBILLAGA, M. Absorption and translocation of copper, zinc and chromium by *Sesbania virgata*. **Journal of Environmental Management**, v. 102, p. 50-54, 2012.

BRASIL. Portaria nº 685, de 27 de Agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1998.

BRITO, Vanessa Nascimento *et al.* Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada na produção de mudas de paricá. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 2, p. 485-497, 2017.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; FIGUEROA LUQUE, E. *et al.* Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monopetalum*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 8839-8847, 2013

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** SBCS – NRS, f376, 2016.

CONAMA. **Resolução nº420 de 28 de dezembro de 2009.** Disponível em: <<http://sapotecsul.com.br/sapotec/DOWNLOADS/CONAMA420.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2021.

CONTINI, Elisio *et al.* **Milho: caracterização e desafios tecnológicos.** Brasília: Embrapa. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2), 2019.

CRISTINO, E. M. *et al.* Fungos micorrízicos arbusculares em cafeeiro (*Coffea arabica* L) cultivados em diferentes altitudes e faces de exposição ao sol. X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2019.

DALCORSO, Giovanni *et al.* Nutrient metal elements in plants. **Metallomics**, v. 6, n. 10, p. 1770-1788, 2014.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A.P.; FARIAS, M.F.; NOGUEIRA, V.F.B. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 2, p. 213-218, may. 2009.

DE MARCO, Rudinei *et al.* *Erythrina crista-galli* L. e turfa na fitorremediação de cobre no solo. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 475-490, 2021.

DE MARCO, Rudinei *et al.* Amenizante Orgânico e *Eucalyptus grandis* para fitoestabilização de solo contaminado com cobre. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.

DUARTE, J. de O. Mercado e comercialização: a produção do sorgo granífero no Brasil. In: RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). Cultivo do sorgo. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 2).

FEPAM – Fundação Estadual de Meio Ambiente do Rio Grande do Sul. **Portaria nº 85/2014. Dispõe sobre o estabelecimento de Valores de Referência de Qualidade (VRQ) dos solos para nove elementos químicos naturalmente presentes nas diferentes províncias geomorfológicas/geológicas do estado do Rio Grande do Sul.** Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br/legislacao/arq/Portaria085-2014.pdf>>. Acesso em: 15 mar de 2022.

FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2011.

FOLLI-PEREIRA, Muriel da Silva *et al.* Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1663-1679, 2012.

FRUET, Saulo Francisco Telles. **Comportamento de duas espécies florestais arbóreas cultivadas in vitro e in vivo em função do cobre**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, 2018.

GADD, G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, London, UK, v. 156, p. 609-643, 2010.

GUEDES, Fernando Lisboa *et al.* Utilização de sorgo para produção de grãos no Semiárido cearense. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, Sobral – CE, 2019.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v.84, n.3, p.489-500, 1980.

GOMES JÚNIOR, C. C. *et al.* Inoculação com fungos micorrízicos arbusculares em duas doses de fósforo no solo altera a resposta de crescimento em genótipos de milho. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Lavras - MG, 2018.

HUERTA, ESTHER AURORA RUIZ *et al.* Bioaccumulation of heavy metals and As in maize (*Zea mays* L) grown close to mine tailings strongly impacts plant development. **Research Square**, 2021.

KABATA-PENDIAS. **Trace elements in soils and plants**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2011.

LUX, A. *et al.* Differences in structure of adventitious roots in *Salix clones* with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 4, p. 537-545, 2004.

MANTOVANI, Analú. **Composição química de solos contaminados por cobre: formas, sorção e efeito no desenvolvimento de espécies vegetais**. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

MARQUES, Daniele Maria *et al.* Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* LF) exposed to different copper concentrations in the soil. **Revista Árvore**, v. 42, 2018.

MAY, André *et al.* Use of biomass sorghum for the bioremediation of heavy metal-contaminated environments. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e95996770, 2020.

MCGRATH, S. P.; ZHAO, F-J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 277-282, 2003.

MIRANDA, R. A. de. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, v. 74, n. 829, p. 24-27, jan. 2018.

MIYAZAWA, M. *et al.* Análise química de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 2, p. 59-85.

MUGOUEI, R.; BORGHEI, M.; ARJMANDI, R. Phytoremediation of stable Cs from solutions by *Calendula alata*, *Amaranthus chlorostachys* an *Chenopodium album*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 2036-2039, 2011.

MUNIVE CERRÓN, Rubén *et al.* Fitorremediación con Maíz (*Zea mays* L.) y compost de Stevia en suelos degradados por contaminación con metales pesados. **Scientia Agropecuaria**, v. 9, n. 4, p. 551-560, 2018.

MUTISYA, J.; SUN, C.; ROSENQUIST, S.; BAGUMA, Y.; JANSSON, C. Diurnal oscillation of SBE expression in sorghum endosperm. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, p. 428- 434, 2009.

PANZIERA, André Gonçalves *et al.* Potencial de fitoextração de cobre por aveia preta em área de vinhedos no sul do brasil. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 26, n. 6, p. 565, 2018.

PINTO, Francisco Gustavo Hayala S.; SANTOS, Anne Gabriella Dias. Determinação da Potencialidade de Utilização da *Pistia stratiotes* como Agente Fitorremediador de Ambientes Naturais. **Revista Química: ciência, tecnologia e sociedade**, v. 4, n. 1, p. 784-795, 2016.

RODRIGUES, Luciana Aparecida; BARROSO, Deborah Guerra; FIQUEIREDO, Fábio Afonso MM. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* LF. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 25-34, 2018.

ROSA, Daniel José. **Eficiência e estabilização de fungos micorrízicos pré-inoculados em porta-enxertos de videira no cultivo em casa de vegetação e a campo, com e sem toxicidade por cobre**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.

RUSCITTI, Marcela; ARANGO, María; BELTRANO, José. Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 29, n. 1, p. 37-49, 2017.

SALES, Luciane Reis. **Inoculação em campo de fungos micorrízicos arbusculares nativos na produtividade e qualidade da cana-de-açúcar**. Tese de doutorado – Universidade Federal de Lavras - MG, 2018.

SALGADO, Fabricio Henrique Moreira. **Fungos micorrízicos arbusculares e estimulante da colonização micorrízica em culturas agrícolas em solo de cerrado**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Goiás, 2014.

SANTANA, Natielo Almeida. **Estratégias Biológicas na Fitorremediação do Cobre**. Simplíssimo, 2020. 50 pg.

SANTANA, Natielo Almeida *et al.* **Fitorremediação do cobre em vinhedos: efeito do fungo micorrízico arbuscular, minhocas e vermicomposto**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria, 2018.

SANTOS, H. G. dos. **Sistema Brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília: Embrapa, 2018, 356p.

SANTOS, Jennie Kéllyn da Silva; SANTANA, Marcos Diones Ferreira; LARA, Túlio Silva. Responsividade de plantas de milho à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares da rizosfera de ipê amarelo. **Revista Agroecossistemas**, v. 10, n. 1, p. 253-264, 2018.

SCHEID, D. L. *et al.* Turfa como indutor do crescimento e tolerância de *Erythrina cristagalli* em solo contaminado com zinco. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 4, p. 51-60, 2018.

SEIDEL, Edleusa Pereira; COSTA, Antônio Carlos Saraiva da; LANA, Maria do Carmo. Fitodisponibilidade de cobre e produção de matéria seca por plantas de milho em resposta à aplicação de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1871-1878, 2009.

SILVA, Juliano Cesar da *et al.* **Desenvolvimento e capacidade fitoextratora de plantas agrícolas cultivadas em solo com diferentes texturas e teores de cobre**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

SILVA, Ilmo Correia *et al.* Growth of *Brachiaria decumbens* in Latosol contaminated with copper. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, p. 168-175, 2018.

- SOBRAL, L. F. *et al.* Comparison of copper, manganese, and zinc extraction with Mehlich 1, Mehlich 3, and DTPA solutions for soils of the Brazilian Coastal Tablelands. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 44, p. 2507-2513, 2013.
- SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G.; GUILHERME, L.R.G Nutrição fosfática e micorriza arbuscular na redução da toxicidade de cádmio em trema (*Trema micranta* (L.) Blum. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 783-792, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 954 p.
- TALEON, V.; DYKES, L.; ROONEY, W. L.; ROONEY, L. W. Effect of genotype and environment on flavonoid concentration and profile of black sorghum grains. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 470-475, 2012.
- TAVARES, SR de L.; OLIVEIRA, Shirlei Aparecida de; SALGADO, Carla Maciel. Avaliação de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por metais pesados. **Holos**, v. 5, p. 80-97, 2013.
- TIECHER, T. L. *et al.*, The interaction of high copper and zinc doses in acid soil changes the physiological state and development of the root system in young grapevines (*Vitis vinifera*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 985-994, 2018.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3050B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils**. Washington. 1996. 12p.
- VALADARES, R. B. S.; MESCOLOTTI, D. L. C.; CARDOSO, E. J. B. N. Micorrizas. In: CARDOSO, E. F. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- VENDRUSCULO, Diogo *et al.* Differential behavior of the summer cover crops in the absorption and translocation of copper. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.
- VENDRUSCULO, D. **Seleção de plantas para fitorremediação de solo contaminado com cobre**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2013.
- WILKINS, R. Mental handicap-thirty years on?. **Journal of the Institute of Mental Subnormality (APEX)**, v. 5, n. 4, p. 4-7, 1978.
- YOON, J. *et al.* Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**, v. 368, n. 2-3, p. 456-464, 2006.
- ZANCHETA, A.C.F.; ABREU, C.A.; ZAMBROSI, F.C.B.; ERISMANN, N.M.; LAGÔA, A.M.A.M. Fitoextração de cobre por espécies de plantas em solução nutritiva. **Bragantia**, v.70, n.1, p.737-744, 2011.

5 CAPÍTULO 3: COINOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* E FMAs NO DESENVOLVIMENTO E TEORES DE COBRE EM MILHO E SORGO CULTIVADOS EM SOLO CONTAMINADO

5.1 RESUMO

Os fungos micorrízicos e *Azospirillum* quando coinoculados auxiliam no desenvolvimento dos vegetais em solo contaminado com metais. Objetivou-se analisar o efeito da coinoculação entre fungos micorrízicos e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e teores de cobre em milho e sorgo cultivados em solo contaminado. O delineamento foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial (6x2), com seis fontes de inóculo (*Acaulospora scrobiculata*; *Rhizogloium clarum*; *Azospirillum brasilense*; *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*; *Rhizogloium clarum* + *Azospirillum brasilense*, testemunha sem inoculação), sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ de cobre, com sete repetições. Avaliou-se: altura de planta, diâmetro de colmo, número de perfilhos, volume de raiz, clorofila a e b, área foliar, massa seca de parte aérea, raiz, teor de cobre no grão, parte aérea e raiz, colonização micorrízica, número mais provável de *Azospirillum* nas raízes. A inoculação de *Acaulospora* aumenta massa seca, volume de raiz e colonização micorrízica de sorgo em solo contaminado. No milho, a inoculação de *Acaulospora* e coinoculada com *Azospirillum* aumentam o crescimento das plantas em solo não contaminado. A inoculação com *Acaulospora* e as coinoculações com *Azospirillum* reduzem teor de cobre na parte aérea e radicular de sorgo.

Palavras-chave: *Zea mays*. *Sorghum bicolor*. Microrganismos. Contaminação.

5.2 ABSTRACT

Mycorrhizal fungi and *Azospirillum*, when co-inoculated, help plant development in soil contaminated with metals. The objective of this study was to analyze the effect of co-inoculation between mycorrhizal fungi and *Azospirillum brasilense* on the development and copper contents of corn and sorghum cultivated in contaminated soil. The design was completely randomized with a factorial arrangement (6x2), with six inoculum sources (*Acaulospora scrobiculata*; *Rhizogloium clarum*; *Azospirillum brasilense*; *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*; *Rhizogloium clarum* + *Azospirillum brasilense*, witness without inoculation, without and with the addition of 400 mg kg⁻¹ of copper, with seven repetitions. The following were evaluated: plant height, stem diameter, number of tillers, root volume, chlorophyll a and b, leaf area, shoot dry mass, root, copper content in grain, shoot and root, mycorrhizal colonization, most likely number of *Azospirillum* in roots. *Acaulospora* inoculation increases dry mass, root volume and mycorrhizal colonization of sorghum in contaminated soil. In maize, inoculation of *Acaulospora* and co-inoculation with *Azospirillum* increase plant growth in uncontaminated soil. Inoculation with *Acaulospora* and co-inoculations with *Azospirillum* reduce copper content in shoots and roots of sorghum.

Keywords: *Zea mays*. *Sorghum bicolor*. Microorganisms. Contamination.

5.3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea de ciclo anual, cultivada em rotação, sucessão e também em consórcio com outras espécies. É considerado um cereal de alto valor energético devido à grande quantidade de amido que possui acumulado no endosperma (GALVÃO *et al.*, 2015). O sorgo pode ser utilizado para diversos fins, tais como a produção de grãos, forragem, álcool e biomassa, além disso, seu cultivo se torna a principal opção em regiões onde ocorre déficit hídrico, pois é mais tolerante que outras culturas como o milho (MENEZES *et al.*, 2021). Outra opção de uso é para alimentação humana, a qual tem aumentado em diversos países devido a característica principal de não possuir glúten (MENEZES *et al.*, 2021).

O cobre está presente no solo principalmente na forma Cu^{2+} , sendo encontrado em minerais primários e secundários, está ligado também a compostos orgânicos e coloides, além de ser constituinte da solução do solo (CANCIAN, 2018). Atividades agrícolas como uso de fertilizantes e fungicidas a base de cobre, além da mineração e disposição de resíduos tem aumentado a concentração de metais pesados no solo, podendo causar contaminação do ambiente (CIPOLETA *et al.*, 2019). Em elevadas concentrações, o cobre pode desencadear diversos problemas às plantas, como inativação de enzimas citoplasmáticas, comprometer a fotossíntese, interferir no metabolismo de nutrientes, afetando o crescimento dos vegetais (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A maioria dos microrganismos do solo necessitam de cobre apenas em pequenas quantidades, porém, algumas espécies adquiriram resistência a concentrações elevadas desse elemento, permitindo a sobrevivência em locais contaminados (ANDREAZZA, 2013). Dentre estes microrganismos estão os que promovem o crescimento de plantas como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que representam uma das formas promissoras de melhorar as características do solo, aumentando o crescimento das plantas e tolerância a estresses (ZHANG *et al.*, 2019). Isso decorre do aumento na absorção de água, proporcionado pelas hifas fúngicas, as quais ampliam o sistema radicular das plantas (LATEF *et al.*, 2016; SALAM *et al.*, 2017). Os FMAs também auxiliam na tolerância das plantas a metais pesados através de processos como a retenção dos metais nos micélios fúngicos (CABRAL *et al.*, 2010) e da diluição dos metais nos tecidos vegetais devido a maior produção de biomassa (CHRISTIE *et al.*, 2004).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são organismos capazes de estimular o crescimento e desenvolvimento das plantas em diferentes estágios de seu ciclo de vida (VELLOSO *et al.*, 2019), colonizam tanto a superfície externa como interna dos vegetais e na maioria das vezes

estão associadas às raízes das plantas (CORDEIRO, 2017). Essas bactérias favorecem o desenvolvimento dos vegetais por meio da síntese de substâncias promotoras do crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas, além de atuarem em mecanismos como indução da resistência das plantas a estresses e solubilização de fosfatos (FUKAMI *et al.*, 2018).

A coinoculação de fungos micorrízicos com bactérias pode promover benefícios para os próprios microrganismos e também para os vegetais, como maior acúmulo de nitrogênio na planta, maior crescimento de plantas, aumento da nodulação e melhoria das variáveis radiculares (PRIMIERY *et al.*, 2015; COSTA; MELLONI, 2019). A literatura relata que esse tipo de coinoculação é benéfica para diversas culturas como milho (DHAWI *et al.*, 2015), tomateiro (BONA *et al.*, 2016), oliveira (COSTA; MELLONI, 2019). Neste sentido, o uso de microrganismos que promovem o crescimento de plantas torna-se uma alternativa para aumento de produção.

O objetivo do trabalho foi analisar o efeito da coinoculação entre fungos micorrízicos e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento e teores de cobre em milho e sorgo cultivados em solo contaminado com cobre.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, campus de Frederico Westphalen. O solo utilizado foi coletado na camada de 0-20 cm e caracterizado como Latossolo Vermelho (SANTOS, 2018). Após a coleta, o solo foi peneirado em malha de 2 mm e após realizou-se a esterilização em autoclave a 121°C, em 3 ciclos de 30 min. Após, realizou-se uma mistura do solo original com areia média na proporção de 50% (v/v) para obtenção de textura de 46 %, aproximadamente. Foi retirada uma amostra e encaminhada para análise dos atributos físicos e químicos, os quais estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Análise física e química da mistura de solo + areia utilizada para cultivo de sorgo e milho.

| -----Parâmetros----- | | | | | | | | |
|----------------------|-----------|---------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|
| Teor de Argila % | pH 1:1 | MO % | P -----mg/L----- | K -----mg/L----- | Cu -----mg/L----- | Zn -----mg/L----- | Mg -----Cmolc/L----- | Al+H -----Cmolc/L----- |
| 46 | 5,3 | 1,0 | 4,6 | 27,5 | 4,2 | 1,3 | 1,0 | 4,9 |

Fonte: Autor (2022)

Posterior a interpretação da análise, realizou-se a adição de calcário, para elevar o pH a 6,5 e adubação feita com adubo químico formulado NPK 10-20-10, de acordo com a recomendação do Manual de Calagem e Adubação para os Estados do RS e SC (2016), para as culturas do sorgo e milho. O solo, após ser corrigido, foi colocado em vasos onde permaneceu por 45 dias para estabilização. Após esse período, parte do solo foi contaminado com 400 mg de cobre kg^{-1} de solo na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), com agitação em saco plástico.

Os isolados dos fungos micorrízicos arbusculares (*Acaulospora scrobiculata* e *Rhizoglyphus clarum*) foram obtidos na Embrapa Agrobiologia em Seropédica-RJ. O inoculante utilizado foi Azo Total Max, composto por bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6, na concentração de 2.000.000 UFC obtido na empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda de Curitiba, PR. A cultivar de milho utilizada foi MORGAN 20A78 e a cultivar de sorgo foi BRS 330.

A semeadura das culturas ocorreu na primeira quinzena de setembro de 2021, onde foram semeadas 4 sementes por vaso. As sementes foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% por 15 min e depois lavadas em água corrente. No momento da semeadura foram inoculados, em seus devidos tratamentos, os fungos micorrízicos, sendo depositados 30 esporos de cada isolado e *A. brasilense*, o qual foi homogeneizado junto com a semente. Após 10 dias da semeadura, foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. Os vasos utilizados no experimento tinham capacidade de 5 litros, os quais foram preenchidos com 5 kg de solo. A irrigação das plantas foi realizada por meio de gotejamento.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial (6x2), sendo testado seis fontes de inóculo (*Acaulospora scrobiculata*; *Rhizoglyphus clarum*; *Azospirillum brasilense*; *Acaulospora* + *Azospirillum*; *Rhizoglyphus* + *Azospirillum* e testemunha sem inoculação), sem cobre e com adição de 400 mg de cobre kg^{-1} de solo) e sete repetições.

No período de maturação fisiológica das plantas, foi determinado o índice relativo de clorofila com o auxílio de um Clorofilômetro portátil (ClorofiLOG, Falker, Porto Alegre, modelo CFL 1030) (FALKER, 2008), com medição da folha superior totalmente expandida na cultura do sorgo e do milho, sendo realizadas três repetições em cada folha. Também avaliou-se a área foliar (AF) por meio do método do triângulo/trapézio proposto por Souza *et al.* (2015), onde foram realizadas três medidas de todas as folhas da planta (comprimento total - Med-A), largura da base do limbo - Med-B e largura do meio do limbo - Med-C), obtidas com régua

milimetrada, sendo a Área Foliar = área do triângulo $[(\text{Med-C}) * (\text{Med-A}/2)/2]$ + área do trapézio $[\frac{((\text{Med-C} + \text{Med-B})/2) * (\text{Med-A}/2)]$ e posteriormente multiplicando pelo número de folhas da planta para obter área foliar total.

Ao final do ciclo das culturas, em torno de 120 dias, foram realizadas avaliações de: altura de planta (AP), com medida feita do colo da planta até a folha bandeira, por meio de fita métrica; diâmetro de colmo (DC) com auxílio de paquímetro digital; número de perfilhos (sorgo); volume de raiz (VR) com auxílio de proveta graduada. Após a secagem das plantas em estufa a 65°C até apresentarem peso constante, quantificou-se a massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR). Posteriormente, as plantas foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de malha 10 mesh para determinação dos teores de cobre na parte aérea (CuPA), raiz (CuR) e grão (CuG), por meio de digestão nitro-perclórica (3:1) e determinação em espectrofotometria de absorção atômica conforme Miyazawa *et al.*, (2009).

A colonização micorrízica foi determinada por meio de técnica de clarificação e coloração de raiz com Azul de Trypan 0,05% e a porcentagem de colonização estimada em três repetições por planta pelo método de placa quadriculada (GIOVANETTI; MOSSE, 1980).

Para a determinação de bactérias diazotróficas endofíticas (*Azospirillum brasilense*) em raízes de sorgo e milho, utilizou-se 1 grama de raiz de cada amostra, as quais foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 5% por dois minutos de acordo com Silva *et al.*, (2011). Após, foram maceradas e feita a diluição seriada de cada amostra 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , as quais foram inoculadas em meio de cultura NFb semi-sólido e incubadas a 30°C por 14 dias. A contagem de bactérias foi realizada pelo método do Número Mais Provável (NMP) descrito por Dobereiner *et al.*, (1995), onde se baseia na presença (+) e ausência (-) de película em forma de véu próximo a superfície do meio de cultura, conforme Tabela de McCrady e os valores expressos em Unidade Formadora de Colônia/grama de raiz (UFC/g).

Após obtenção dos resultados, os mesmos foram submetidos a análise de variância com auxílio do programa estatística SISVAR (FERREIRA, 2011), onde as fontes de inóculo foram avaliadas por meio de comparação de médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro e o tratamento com dose de cobre comparado pelo teste T.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação significativa entre doses de cobre e fontes de inóculo para o diâmetro de colmo (DC), número de perfilhos, área foliar (AF), clorofila a e b do sorgo e altura de planta (AP), diâmetro de colmo (DC), massa seca de parte aérea (MSPA), clorofila a e b do

milho. De forma geral, houve redução de praticamente todas as variáveis com a dose de 400 mg kg⁻¹, com apenas diâmetro de colmo e número de perfilhos do sorgo não sendo afetados pela dose de cobre aplicada no solo (Tabela 2). A exposição a altas doses de cobre afetam diversos parâmetros morfológicos como a altura de planta, diâmetro de caule, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, conforme citado na literatura (DE MARCO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016; AMBROSINI *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Diâmetro de colmo (DC), Número de perfilhos, área foliar (AF), Clorofila a e b da cultura do sorgo e Altura de planta (AP), Diâmetro de colmo (DC), Massa seca de parte aérea (MSPA), Clorofila a e b na cultura do milho cultivadas em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ de cobre.

| -----Sorgo----- | | | | | |
|-----------------|----------|--------------|-----------------------|-------------|-------------|
| Cobre** | DC (mm) | Nº perfilhos | AF (cm ²) | Clorofila a | Clorofila b |
| Sem | 15,29 a* | 1,22 a | 2180,5 a | 35,22 a | 14,47 a |
| Com | 15,89 a | 1,31 a | 1815,1 b | 31,46 b | 12,51 b |
| CV % | 12,73 | 29,64 | 26,31 | 13,78 | 22,46 |
| -----Milho----- | | | | | |
| | AP (m) | DC (mm) | MSPA (g) | Clorofila a | Clorofila b |
| Sem | 1,64 a | 18,35 a | 67 a | 28,69 a | 8,49 a |
| Com | 1,49 b | 15,40 b | 49 b | 25,08 b | 6,49 b |
| CV % | 14,22 | 15,82 | 27,58 | 19,85 | 35,78 |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$).

**Sem = teor natural do solo.

Avaliando o comportamento da espécie *Crotalaria juncea* em solo contaminado com cobre, Mendonça (2020) observou redução do diâmetro do caule, da biomassa radicular e de parte aérea, e altura de planta conforme o aumento das doses do metal. Tiecher *et al.*, (2016) avaliando plantas de milho em solo contaminado com cobre e zinco constataram diminuição dos teores de clorofila a e b, estando de acordo com o obtido neste estudo. A baixa produção de massa seca de parte aérea de milho na dose 400 mg kg⁻¹ de cobre pode estar relacionada com a redução dos teores de clorofila, pois elevadas concentrações deste metal na parte aérea acabam comprometendo processos relacionados a fotossíntese, alterando a composição dos pigmentos

fotosintéticos e impedindo o fluxo de elétrons na fase fotoquímica (ZHANG *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-MENDOZA *et al.*, 2013).

O diâmetro do colmo do sorgo foi maior com a inoculação de *A. scrobiculata* e *R. clarum* + *A. brasilense*, e para o milho não houve diferença significativa (Tabela 3). Aumento do diâmetro de caule também foi observado por Bonfim (2018) em mudas de *Mimosa tenuiflora* e por Dos Reis e Laurindo (2018) em mudas de tomateiro, inoculadas com FMAs. A altura de planta de milho não apresentou diferença entre as fontes de inóculo, sendo superior somente a testemunha. O aumento da altura de planta com inoculação de FMAs também foi observado para a cultura do tomateiro (DOS REIS; LAURINDO, 2018; ALVARADO *et al.*, 2014).

Tabela 3 - Diâmetro de colmo (DC), Nº perfilhos, Área foliar (AF), Clorofila a e b da cultura do sorgo e Altura de planta (AP), diâmetro de colmo (DC), Massa seca de parte aérea (MSPA), Clorofila a e b da cultura do milho inoculadas com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum*, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglosum clarum* + *Azospirillum brasilense* e testemunha (sem inoculação).

| Fonte de inóculo | -----Sorgo----- | | | | |
|------------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------|-------------|-------------|
| | DC (mm) | Nº perfilhos | AF (cm ²) | Clorofila a | Clorofila b |
| <i>Acaulospora s.</i> | 16,25 a* | 1,42 a | 2470,6 a | 34,6 a | 15,5 a |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 14,93 b | 1,28 a | 1959,5 b | 32,8 a | 14,7 a |
| <i>Azospirillum b.</i> | 14,94 b | 1,24 a | 2413,3 a | 36,1 a | 13,6 a |
| <i>Acaulospora</i> + <i>Azosp.</i> | 14,83 b | 1,23 a | 1887,1 b | 33,7 a | 13,3 a |
| <i>Rhizoglosum</i> + <i>Azosp.</i> | 16,13 a | 1,15 a | 1776,5 b | 35,9 a | 14,6 a |
| Testemunha | 13,79 b | 1,24 a | 1479,7 b | 26,7 b | 9,1 b |
| CV % | 12,73 | 29,64 | 26,31 | 13,78 | 22,46 |
| | -----Milho----- | | | | |
| | AP (m) | DC (mm) | MSPA (g) | Clorofila a | Clorofila b |
| <i>Acaulospora s.</i> | 1,62 a | 17,17 a | 55 b | 28,22 a | 8,51 a |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 1,61 a | 17,57 a | 65 a | 26,99 a | 8,03 a |
| <i>Azospirillum b.</i> | 1,63 a | 17,67 a | 66 a | 28,38 a | 7,07 a |
| <i>Acaulospora</i> + <i>Azosp.</i> | 1,66 a | 15,69 a | 65 a | 24,80 a | 6,05 a |
| <i>Rhizoglosum</i> + <i>Azosp.</i> | 1,67 a | 17,21 a | 54 b | 29,16 a | 7,63 a |
| Testemunha | 1,22 b | 15,93 a | 46 b | 23,77 a | 7,34 a |
| CV % | 14,22 | 15,82 | 27,58 | 19,85 | 35,78 |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro(p≤0,05).

A área foliar de sorgo foi superior com a inoculação de *A. scrobiculata* e *A. brasilense*, com médias de 2470,65 cm² e 2413,25 cm², respectivamente. Os FMAs são capazes de melhorar a nutrição de plantas, aumentar a área foliar e os teores de pigmentos fotossintetizantes (TRISTÃO *et al.*, 2006). Da mesma forma, a inoculação com *A. brasilense* promove aumento da área foliar das plantas, elevando a eficiência de captação de energia solar devido a maior quantidade de células fotossinteticamente ativas (LONGHINI *et al.*, 2016).

Para a massa seca de parte aérea de milho nota-se que a inoculação com *R. clarum*, *A. brasilense* e a coinoculação de *Acaulospora*+*Azospirillum* foram mais satisfatórios que os demais tratamentos, com médias superiores a 0,065 kg (Tabela 3). Diversos estudos ressaltam o aumento de massa seca de parte aérea de plantas com a inoculação de FMAs, bactérias e a combinação de ambos (PRIMIERI *et al.*, 2015; SALGADO, 2014). A coinoculação de FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio pode proporcionar efeitos sinérgicos entre eles e os vegetais, melhorando suas funções (ANTUNES *et al.*, 2006). Nas demais variáveis clorofila a e b de milho e número de perfilhos de sorgo não foram encontradas diferenças entre os tratamentos.

Não ocorreu diferença estatística nas variáveis clorofila a e clorofila b para o sorgo e altura de planta no milho, porém foram superiores ao tratamento controle, demonstrando efeito positivo dos microrganismos para as plantas (Tabela 3). Além disso, a inoculação de *A. brasilense* também promove melhoria em parâmetros fotossintéticos como o teor de clorofila, maior produção de biomassa e altura de plantas (NETO, 2016).

Houve interação significativa entre doses de cobre e fontes de inóculo para a altura de planta e Massa seca de raiz do sorgo, Área foliar e Massa seca de raiz do milho (Tabela 4). De maneira geral, nota-se efeito positivo da inoculação de microrganismos para o sorgo e milho até mesmo em altas doses de cobre. A inoculação da espécie *A. brasilense* proporcionou maior altura de planta de sorgo quando não ocorreu adição de cobre, comparado com os demais tratamentos. No entanto, a espécie *R. clarum* quando inoculada de forma individual e em conjunto com *A. brasilense*, promoveram maior altura de plantas de sorgo no tratamento com 400 mg kg⁻¹ de cobre aplicado no solo.

Tabela 4 - Altura de planta (AP), Massa seca de raiz (MSR) do sorgo e Área foliar (AF), Massa seca de milho inoculados com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum*, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglosum* + *Azospirillum brasilense* e testemunha (sem inoculação), cultivados em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ de cobre.

| Fonte de inóculo | Cobre ** | | Cobre | |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------|---------------------|-------|
| | Sem | Com | Sem | Com |
| | -----Sorgo----- | | | |
| | ----- AP (m) ----- | | ----- MSR (k) ----- | |
| <i>Acaulospora</i> s. | 0,93 Ab* | 0,91 Ab | 41 Bb | 64 Aa |
| <i>Rhizoglosum</i> c. | 0,84 Bb | 1,05 Aa | 32 Ab | 26 Ab |
| <i>Azospirillum</i> b. | 1,12 Aa | 0,92 Bb | 65 Aa | 57 Aa |
| <i>Acaulospora</i> + <i>Azosp.</i> | 1,08 Aa | 0,97 Ab | 22 Bb | 56 Aa |
| <i>Rhizoglosum</i> + <i>Azosp.</i> | 0,86 Bb | 1,12 Aa | 28 Bb | 56 Aa |
| Testemunha | 0,97 Ab | 0,93 Ab | 22 Ab | 16 Ab |
| CV % | 15,65 | | 32,13 | |
| | -----Milho----- | | | |
| | ----- AF (cm ²) ----- | | ----- MSR (g) ----- | |
| <i>Acaulospora</i> s. | 2894,7 Aa | 2293,8 Ab | 25 Aa | 40 Aa |
| <i>Rhizoglosum</i> c. | 1438,6 Bb | 3364,2 Aa | 42 Aa | 35 Aa |
| <i>Azospirillum</i> b. | 3359,3 Aa | 1678,9 Bb | 28 Aa | 33 Aa |
| <i>Acaulospora</i> + <i>Azosp.</i> | 2801,9 Aa | 1986,2 Bb | 29 Ba | 53 Aa |
| <i>Rhizoglosum</i> + <i>Azosp.</i> | 2747,0 Aa | 1970,9 Ab | 11 Bb | 42 Aa |
| Testemunha | 1280,6 Ab | 932,3 Ac | 10 Ab | 15 Ab |
| CV % | 21,55 | | 31,04 | |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$).

**Sem = teor natural do solo.

A inoculação de *A. brasilense* aumentou a massa seca de raiz quando não teve aplicação de cobre no solo e, na dose de 400 mg kg⁻¹, os maiores valores foram obtidos com a inoculação de *A. scrobiculata*, *A. brasilense* e as coinoculações. Na cultura do milho, a inoculação de *A. scrobiculata*, *R. clarum* e *A. brasilense* promoveram maior massa seca de raiz em solo sem cobre e com 400 mg kg⁻¹ as inoculações não se diferiram, sendo superiores à testemunha (Tabela 4). De acordo com Salgado (2014), o aumento de raízes é uma estratégia que a planta desenvolve para suportar estresses ambientais.

As rizobactérias possuem capacidade de aumentar o efeito micorrízico através da regulação de parâmetros físicos – químicos como liberação de exsudatos radiculares, alteração do pH do solo, secreção de fitohormônios e conseqüentemente afetam o crescimento da planta (KUMAR *et al.*, 2015). Em contrapartida, os esporos produzidos pelos fungos micorrízicos servem de abrigo e fornecem alimento para as bactérias que colonizam suas superfícies, protegendo de estresses ambientais (LEVY *et al.*, 2009). Através desse sinergismo, estes microrganismos podem favorecer o crescimento e desenvolvimento das plantas.

A área foliar do milho foi maior com a inoculação de *A. scrobiculata*, *A. brasilense* e as coinoculações quando não teve aplicação de cobre, e na dose 400 mg kg⁻¹ a espécie *R. clarum* foi a que proporcionou a maior média, com 3364,17 cm² de área foliar. O uso de FMAs melhorou a nutrição e crescimento de porta-enxertos e mudas de videira cultivadas em solo contaminado com cobre (ANZANELLO *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2013). Estes microrganismos são capazes de proteger as plantas contra a toxicidade do cobre por meio de mecanismos que retêm estes metais no micélio fúngico e também através da melhoria nutricional dos vegetais (SOARES; SIQUEIRA, 2008).

Houve interação significativa entre doses de cobre e fontes de inóculo para a massa seca de parte aérea e volume de raiz de sorgo e volume de raiz do milho (Tabela 5).

Tabela 5 - Massa seca de parte aérea (MSPA), Volume de raiz (VR) de sorgo e Volume de raiz (VR) de milho inoculadas com *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum*, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora scrobiculata* + *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglosum clarum* + *Azospirillum brasilense*, testemunha (sem inoculação) e cultivados em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ de cobre.

| Fonte de inóculo | Cobre** | | Cobre | | Cobre | |
|------------------------------------|-----------------|-------|----------|-----------------|----------|----------|
| | Sem | Com | Sem | Com | Sem | Com |
| | -----Sorgo----- | | | -----Milho----- | | |
| | MSPA (g) | | VR (ml) | | VR (ml) | |
| <i>Acaulospora s.</i> | 64 Ba* | 97Aa | 158,3 Aa | 190,0 Aa | 146,6 Aa | 160,0 Aa |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 54 Aa | 45 Ac | 161,6 Aa | 171,3 Aa | 158,3 Aa | 140,0 Aa |
| <i>Azospirillum b.</i> | 54 Ba | 75 Ab | 116,6 Ab | 136,6 Ab | 136,6 Aa | 110,0 Ab |
| <i>Acaulospora</i> + <i>Azosp.</i> | 60 Ba | 84 Ab | 130,0 Bb | 180,0 Aa | 171,6 Aa | 140,0 Aa |
| <i>Rhizoglosum</i> + <i>Azosp.</i> | 56 Ba | 74 Ab | 103,3 Ab | 135,0 Ab | 143,3 Aa | 103,3 Bb |
| Testemunha | 48 Aa | 35 Ac | 91,6 Ab | 96,6 Ac | 55,0 Ab | 88,3 Ab |
| CV % | 23,66 | | 18,63 | | 16,74 | |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, dentro de cada variável, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (p<0,05).

**Sem = teor natural do solo

A massa seca de parte aérea de sorgo foi significativamente maior com as inoculações e coinoculações, porém sem diferença entre inóculo na dose 0 mg kg⁻¹, no entanto, foi maior com a inoculação de *A. scrobiculata* com aplicação de 400 mg kg⁻¹ de cobre no solo (Tabela 5). Esse resultado demonstra a capacidade desses microrganismos em sobreviver em ambientes com elevadas doses de metais e ainda melhorar o desenvolvimento das plantas. Resultados

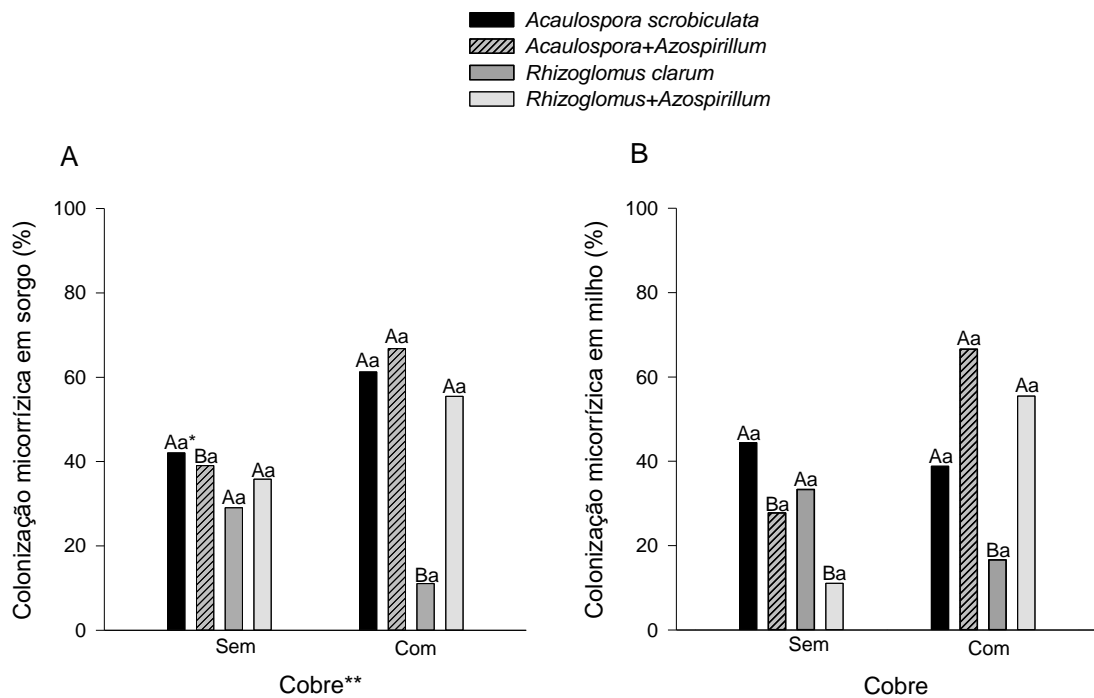
semelhantes foram citados na literatura por Kumar *et al.*, (2015) e Costa e Melloni (2019) demonstrando os benefícios da combinação de FMAs e rizobactérias na massa seca de parte aérea de milho e da espécie florestal *Olea europaea*.

O volume de raiz de sorgo foi maior com a inoculação de *A. scrobiculata* e *R. clarum* quando não teve aplicação de cobre, e com 400 mg kg⁻¹ a inoculação de *A. scrobiculata*, *R. clarum* e *A. scrobiculata* + *A. brasilense* proporcionaram maior volume de raiz. No milho as fontes de inóculo não apresentaram diferença significativa entre si na ausência de cobre, sendo superiores a testemunha e na dose 400 mg kg⁻¹, o volume de raiz foi maior quando inoculou-se as espécies *A. scrobiculata*, *R. clarum* e a coinoculação de *A. scrobiculata* + *A. brasilense*.

Os fungos micorrízicos possuem extensa rede de hifas que promovem um aumento do sistema radicular da planta, ultrapassando a zona de depleção (resistência alta) e assim, conseguem explorar maior volume de solo, água e nutrientes (MATHUR *et al.*, 2018). Outro ponto importante está relacionado com a presença de glomalina no solo, uma glicoproteína exsudada pelos FMAs e que é capaz de reter metais pesados em sua estrutura e assim reduzir a toxicidade das plantas (WU *et al.*, 2014).

Os resultados demonstraram interação significativa entre doses de cobre aplicadas no solo e fontes de inóculo para colonização micorrízica do milho e sorgo (Figura 1). Nota-se que as espécies de forma individual e coinoculadas com *A. brasilense* colonizaram as raízes de milho em diferentes graus, especialmente na dose 400 mg kg⁻¹.

Figura 1 - Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de sorgo (A) e milho (B) cultivado sem e com adição de 400 mg kg⁻¹, com inoculação de *Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglyphus clarum*, *Acaulospora*+*Azospirillum*, *Rhizoglyphus*+*Azospirillum*.



Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra maiúscula entre os tratamentos com e sem cobre e minúscula no mesmo tratamento não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$).

**Sem = teor natural do solo

A colonização micorrízica em raízes de sorgo, sem a aplicação de cobre no solo, não se diferiu estatisticamente entre os tratamentos, porém, na dose 400 mg kg^{-1} , a maior colonização foi observada com a espécie *A. scrobiculata* (66% das raízes colonizadas) seguido das combinações *A. scrobiculata* + *A. brasilense* e *R. clarum* + *A. brasilense* (61% e 55%, respectivamente). Trabalhando com videiras em solo contaminado com cobre, Rosa *et al.*, (2016) constataram colonização de 40%, sendo menor do que o encontrado neste trabalho. Espécies de fungos micorrízicos pertencentes a família Acaulosporaceae apresentam certa tolerância a fatores de estresse e possuem maior capacidade de colonização em plantas com mesma característica (FERREIRA, 2016).

A porcentagem de colonização micorrízica de raízes de milho não evidenciou diferença significativa entre as fontes de inóculo em solo não contaminado, no entanto, com a aplicação de 400 mg kg^{-1} de cobre a coinoculação de *A. scrobiculata* + *A. brasilense* aumentou a colonização em 58,4% (Figura 1). Efeito benéfico da coinoculação de fungos micorrízicos e rizobactérias também foi encontrado por Brasil *et al.*, (2006) ao analisar a cultura do sorgo,

segundo estes autores, algumas bactérias possuem capacidade de estimular o crescimento micelial aumentando o número de hifas e conseqüentemente a infecção micorrízica nas plantas.

A densidade de *Azospirillum brasilense* teve interação significativa entre doses de cobre e fontes de inóculo para sorgo e milho e em geral, na ausência de cobre no solo houve maior número de *Azospirillum* em relação a 400 mg kg⁻¹ (Tabela 6). No sorgo, sem aplicação de cobre no solo, a quantidade de *Azospirillum* presente nas raízes foi maior quando inoculado de forma isolada, porém, com aplicação de 400 mg kg⁻¹ de cobre, não houve diferença entre os tratamentos. No milho, em solo não contaminado, as fontes de inóculo não se diferiram entre si, enquanto na dose 400 mg kg⁻¹ a coinoculação entre *R. clarum* + *Azospirillum* favoreceu a presença da bactéria. Conforme Prado Junior (2012), microrganismos são capazes de desenvolver mecanismos de tolerância ao excesso de metais pesados. Estudos demonstram que espécies como *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *A. amazonense* apresentaram tolerância a 1000 mg L⁻¹ de Zn⁺² e 60 mg L⁻¹ de Cd⁺² (MOREIRA *et al.*, 2008).

Tabela 6 - Densidade (Número Mais Provável) de *Azospirillum brasilense* (UFC/g) em raízes de sorgo e milho cultivados em solo sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ e com diferentes fontes de inóculo.

| Fontes de inóculo | -----Sorgo----- | | -----Milho----- | |
|---|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Cobre** | | Cobre | |
| | Sem | Com | Sem | Com |
| <i>Acaulospora</i> + <i>Azospirillum</i> | 7,5x10 ³ Ab* | 9,5x10 ² Ba | 3,0x10 ² Aa | 6,0x10 ² Ab |
| <i>Rhizogloumus</i> + <i>Azospirillum</i> | 2,1x10 ³ Ac | 6,5x10 ² Ba | 3,5x10 ³ Aa | 7,3x10 ³ Aa |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | 1,1x10 ⁴ Aa | 6,0x10 ² Ba | 5,5x10 ³ Aa | 4,5x10 ² Bb |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, dentro de cada planta, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro (p≤0,05).

**Sem = teor natural do solo

Não houve interação significativa entre doses de cobre e fonte de inóculo para as variáveis teor de cobre na parte aérea e raiz de sorgo e teor de cobre no grão, parte aérea e raiz de milho, apresentando apenas efeito simples para os tratamentos (Tabela 7). O teor de cobre na parte aérea do sorgo e milho aumentou com a dose 400 mg kg⁻¹, principalmente no milho onde a concentração de cobre foi maior (Tabela 7). De acordo com a Anvisa (1965) os valores encontrados no grão e na parte aérea das plantas são considerados aceitáveis, o que permite que essas culturas possam ser utilizadas para produção de silagem.

Tabela 7 - Efeito simples para o tratamento sem e com adição de 400 mg kg⁻¹ e efeito simples de fontes de inóculo (*Acaulospora scrobiculata*, *Rhizoglosum clarum*, *Azospirillum brasilense*, *Acaulospora s.* + *Azospirillum b.*, *Rhizoglosum c.* + *Azospirillum b.*, testemunha sem inoculação) no teor de cobre na parte aérea (CuPA) e na raiz (CuR) de sorgo e no teor de cobre na parte aérea (CuPA) e na raiz (CuR) e no grão (CuG) de milho.

| Cobre** | -----Sorgo----- | | -----Milho----- | | |
|---------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | CuPA (mg kg ⁻¹) | CuR (mg kg ⁻¹) | CuPA (mg kg ⁻¹) | CuR (mg kg ⁻¹) | CuG (mg kg ⁻¹) |
| Sem | 8,48 b* | 89,35 b | 12,93 b | 130,92 b | 3,13 a |
| Com | 11,89 a | 327,75 a | 16,47 a | 409,22 a | 3,52 a |
| CV (%) | 27,3 | 26,5 | 28,3 | 33,4 | 30,1 |

| Fonte de inóculo | -----Sorgo----- | | -----Milho----- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | CuPA (mg kg ⁻¹) | CuR (mg kg ⁻¹) | CuPA (mg kg ⁻¹) | CuR (mg kg ⁻¹) | CuG (mg kg ⁻¹) |
| <i>Acaulospora s.</i> | 10,23 b | 166,77 b | 14,44 b | 272,31 b | 2,91 b |
| <i>Rhizoglosum c.</i> | 9,55 b | 220,37 a | 14,01 b | 225,39 b | 3,24 b |
| <i>Azospirillum b.</i> | 8,95 b | 223,62 a | 12,26 b | 216,18 b | 3,16 b |
| <i>Acaulospora</i> + <i>Azosp.</i> | 9,31 b | 167,01 b | 13,16 b | 252,24 b | 3,39 b |
| <i>Rhizoglosum</i> + <i>Azosp.</i> | 9,87 b | 198,89 b | 14,69 b | 281,30 b | 2,57 b |
| Testemunha | 13,21 a | 274,64 a | 19,65 a | 372,97 a | 4,68 a |
| CV % | 27,3 | 26,5 | 28,3 | 33,4 | 30,1 |

Fonte: Autor

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott e teste T (p<0,05) de probabilidade de erro.

**Sem = teor natural do solo

No sistema radicular do sorgo e milho a maior concentração de cobre, ocorreu na dose 400 mg kg⁻¹, sendo superior ao encontrado em solo não contaminado (Tabela 7). Resultados semelhantes foram relatados na literatura para culturas como soja, trigo e sorgo (ANDREOLA, 2021; TURCHETTO, 2021; SILVA, 2019). O cobre possui grande afinidade com ligantes que se encontram nas raízes, por esse motivo há um acúmulo maior nesse órgão, além disso, esse elemento se concentra especialmente na parede celular das células do xilema, o que o impede de ser translocado para outras partes da planta (JEZLER, 2016). Ao ser acumulado nas raízes das plantas, o cobre acaba inibindo o desenvolvimento de raízes finas e diminui a absorção de outros elementos (REHMAN *et al.*, 2019).

O teor de cobre no grão de milho foi menor que as demais partes da planta e não se diferenciou na presença ou ausência de cobre, esse resultado está relacionado com a baixa mobilidade do cobre na planta (SILVA *et al.*, 2007) e corrobora com os resultados de Reis (2014) que trabalhando com aplicações de lodo de esgoto na cultura do milho também encontrou teor baixo de cobre nos grãos, sendo de 2,34 mg kg⁻¹.

O teor de cobre na parte aérea de sorgo e teor de cobre no grão, parte aérea e raiz de milho apresentou redução com as fontes de inóculo comparado com a testemunha (sem inoculação) (Tabela 7). Na raiz de sorgo, a inoculação de *A. scrobiculata* e a combinação de *A. scrobiculata* + *A. brasilense* e *R. clarum* + *A. brasilense* evidenciaram menor teor de cobre com redução de 39,3%, 39,2% e 27,6% respectivamente, em relação ao tratamento controle. Resultado semelhante foi obtido por Rosa *et al.*, (2016) no qual videiras inoculadas com FMAs reduziram a concentração de cobre em folhas e raízes comparado com plantas não micorrizadas. Também pode-se observar que os maiores teores de cobre foram encontrados no sistema radicular, diminuindo para as outras partes da planta. Prado Junior (2012) ao avaliar a concentração de Cd, Pb, Cr e Ni na cultura da cana de açúcar também observaram maior concentração de metais nas raízes em comparação com as folhas.

5.6 CONCLUSÃO

A inoculação de *Acaulospora scrobiculata* promove maior massa seca de raiz, volume de raiz e colonização micorrízica de sorgo em solo contaminado com cobre.

A inoculação de *Acaulospora scrobiculata* e a coinoculação com *Azospirillum brasilense* aumentam massa seca de raiz, volume de raiz, área foliar de milho em solo não contaminado com cobre.

A inoculação com *Acaulospora scrobiculata* e as coinoculações de fungos micorrizicos com *Azospirillum brasilense* reduzem o teor de cobre na parte aérea e radicular de plantas de sorgo.

5.7 REFERÊNCIAS

ALVARADO, Manuel Carrillo; DÍAZ FRANCO, Arturo; PEÑA DEL RÍO, María de los Ángeles. Productividad de tomate mediante micorriza arbuscular en agricultura protegida. **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, v. 5, n. 3, p. 513-518, 2014.

AMBROSINI, Vítor Gabriel *et al.* Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 270-280, 2015.

ANDREAZZA, Robson *et al.* Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.

ANDREOLA, Daiane Sartori. **Fixação biológica de nitrogênio e FMAS no desenvolvimento da soja em solo contaminado com cobre**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, 2021.

ANTUNES, P. M., DE VARENNES, A., ZHANG, T., & GOSS, M. J. The tripartite symbiosis formed by indigenous arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* and soya bean under field conditions. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 192(5): 373-378, 2006.

ANVISA. Decreto nº 22.688, de 27 de Agosto de 1965. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm>. Acesso em: 10 mai. de 2022.

ANZANELLO, Rafael; SOUZA, Paulo Vitor Dutra de; CASAMALI, Bruno. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, v. 70, p. 409-415, 2011.

BONA, E. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2016.

BONFIM, Maria Valdirene Leite Pedone. **Crescimento e produção de compostos bioativos foliares em leguminosas medicinais nativas da Caatinga associadas a fungos micorrízicos arbusculares**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

BRASIL, Carlos *et al.* Effect of *Bacillus thuringiensis* on microbial functional groups in sorghum rhizosphere. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 873-877, 2006.

CABRAL, Lucélia *et al.* Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 25-29, 2010.

CANCIAN, Mateus *et al.* **Aplicação de cobre na cultura da soja em solos com altos teores de fósforo**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria. 2018.

CIPOLETA, Nathalia Sprovieri; SIMÕES DA SILVA, L. F.; LOPES-ASSAD, M. L. R. C. Uso de Resíduos Orgânicos na atenuação de contaminação por cobre de Calda Bordalesa. **Ambiência**, Guarapuava, v. 15, n. 2, p. 289-307, 2019.

CHRISTIE, Peter; LI, Xiaolin; CHEN, Baodong. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1, p. 209-217, 2004.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. SBCS – NRS, f376, 2016

CORDEIRO, Jaíza Ellen Borges. **Desempenho agrônômico do milho em resposta à inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas**. Dissertação de mestrado – Universidade federal de Viçosa-MG, 2017.

COSTA, Samara Maria Lopes; MELLONI, Rogério. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*). **Ciência Florestal**, v. 29, p. 169-180, 2019.

DE MARCO, Rudinei *et al.* Amenizante Orgânico e *Eucalyptus grandis* para fitoestabilização de solo contaminado com cobre. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.

DHAWI, F.; DATTA, R.; RAMAKRISHNA, W. Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bari, v. 97, n. 1, p. 390-399, 2015.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. e BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CNPAB, 1995, 60 p.

DOS REIS, Franciele Aparecida; LAURINDO, Marlene Cristina de Oliveira. **Aplicação de fungos micorrízicos arbusculares no tomateiro (*Solanum lycopersicum*)**. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC, Maceió – AL, 2018.

FALKER, A. **Manual do medidor eletrônico de teor de clorofila (ClorofiLOG/CFL 1030)**. Porto Alegre: [s.n.], 2008.

FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância. Versão 5.3**. Lavras-MG: UFLA, 2011.

FERREIRA, Dorotéia Alves. **Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e a microbiota de solos**. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, 2016.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 73, p.1-12, 2018.

GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. **Milho: do plantio à colheita**. Ed UFV, 351 p. 2015.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Cambridge, v.84, n.3, p.489-500, 1980.

GONZALEZ-MENDOZA, Daniel *et al.* Copper stress on photosynthesis of black mangle (*Avicennia germinans*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 665-670, 2013.

JEZLER, N. C. **Avaliação anatômica e ultraestrutural de *Coffea arabica* L. em**

resposta ao Boro e ao Cobre. Dissertação de mestrado – UFV, Minas Gerais, 2016.

KUMAR, M. *et al.* Growth promoting characteristics of rhizobacteria and AM Fungi for biomass amelioration of *Zea mays*. **Archives of Biological Sciences**, Belgrado, v. 67, n. 3, p. 877-887, 2015.

LATEF, A. A. H. A., HASHEM, A., RASOOL, S., ABD-ALLAH, E. F., ALQARAWI, A. A., EGAMBERDIEVA, D., JAN, S., ANJUM, N. A., & AHMAD, P. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: a review. **Journal of Plant Biology**, 59, 407-426, 2016.

LEVY, Avram *et al.* Association between *Burkholderia* species and arbuscular mycorrhizal fungus spores in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1757-1759, 2009.

LONGHINI, V.Z. *et al.* Inoculation of Diazotrophic Bacteria and Nitrogen Fertilization in Topdressing in Irrigated Corn. *Revista Caatinga*, v. 29, n. 2, p. 338–347, 2016.

MATHUR, S., SHARMA, M. P., & JAJOO, A. Improved photosynthetic efficacy of maize (*Zea mays*) plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under high temperature stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, p. 149–154, 2018.

MENDONÇA, Gabriel Wanderley de. **Tolerância e potencial fitorremediador de *Crotalaria juncea* em solos contaminados por boro, cobre e manganês.** Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, 2020.

MENEZES, Cicero Beserra *et al.* Importância do sorgo para o abastecimento de grãos, forragem e bioenergia no Brasil. In: MENEZES, Cicero Beserra. *Melhoramento genético de sorgo*. Brasília-DF, 2021. 546p.

MIYAZAWA, M. *et al.* Análise química de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 2, p. 59-85.

MOREIRA, F. M. S.; LANGE, A.; KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J. O.; NOBREGA, R. S. A.; LIMA, A. S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 749-761, 2008.

NETO, Moacir Ribeiro. **Milho e feijão cultivado em campo e inoculado com bactérias diazotróficas e fungo solubilizador de fosfato.** Tese de Doutorado - Instituto Federal de Educação, Goiás, 2016.

PRADO JUNIOR, José Paulo Queiroz. **Bactérias fixadoras de nitrogênio em cana-de-açúcar: crescimento em ambiente com altas concentrações de Cd, Cr, Ni e Pb in situ e in vitro.** Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, 2012.

PRIMIERY, Silmar; SANTOS, Julio Cesar Pires; ANTUNES, Pedro M. **A coinoculação com fungos micorrízico arbusculares e bactérias fixadoras de nitrogênio é altamente benéfica para a *Mimosa scabrella*.** Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Natal-RN, 2015.

REHMAN, Muzammal *et al.* Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. **Environmental science and pollution research**, v. 26, n. 18, p. 18003-18016, 2019.

REIS, Iolanda Maria Soares. **Cádmio, cobre e cromo em solo e plantas de milho após quinze anos de aplicações anuais de lodo de esgoto**. Tese de doutorado – UNESP, Jaboticabal-SP, 2014.

RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. *Revista Virtual de Química*, Niterói, v.8, n. 1, p. 262-276, 2016.

ROSA, Daniel José *et al.* Parâmetros fisiológicos em videiras ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri x Vitis rupestris*) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com cobre. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 31, n. 1, p. 14-23, 2016.

SALAM, E. A., ALATAR, A., & EL-SHEIKH, M. A. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi alleviates harmful effects of drought stress on damask rose. **Saudi Journal of Biological Science**, 25 (8), 1772–1780, 2017.

SALGADO, Fabricio Henrique Moreira. **Fungos micorrízicos arbusculares e estimulante da colonização micorrízica em culturas agrícolas em solo de cerrado**. Tese de doutorado – Universidade Federal de Goiás, 2014.

SANTOS, H. G. dos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. Ed. Brasília: Embrapa, 2018.

SILVA, Juliano Cesar da. **Desenvolvimento e capacidade fitoextratora de plantas agrícolas cultivadas em solo com diferentes texturas e teores de cobre**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

SILVA, Rodrigo Ferreira da *et al.* Interferência de doses de cobre no crescimento e na qualidade de mudas de *Bauhinia forficata* Link, *Pterogyne nitens* Tul e *Enterolobium contortisiliquum* Vell. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 647-655, 2016.

SILVA D. M., ANTONIOLLI Z. I., JAQUES R. J. S. Ocorrência de bactérias diazotróficas em sementes de duas cultivares de arroz irrigado. **Revista Brasileira de Agrociência**, 17:58-161, 2011.

SILVA, I. R.; MENDONÇA, E. S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F. *et al.* (Eds) **Fertilidade do Solo**. Viçosa, MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v 1, 2007. 1017p.

SOARES, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa *et al.* **Colonização micorrízica e crescimento da videira (*Vitis vinifera*, Porta-Enxerto P1103) em solo com alto teor de cobre**. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo – Florianópolis, 2013.

SOARES, Cláudio RFS; SIQUEIRA, José O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 6, p. 833-841, 2008.

SOUZA, L. F.; SANTOS, J. G. D.; ALEXANDRINO, E.; MAURÍCIO, R. M.; MARTINS, A. D.; SOUZA, J. T. L. Método prático e eficiente para estimar a área foliar de gramíneas forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 64, n. 245, p. 83-85, 2015.

TIECHER, Tadeu L. *et al.* The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v. 262, p. 52-61, 2016.

TRISTÃO, F. S. M.; ANDRADE, S. A. L. DE; SILVEIRA, A. P. D. DA. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos comerciais. **Bragantia**, v. 65, n. 4, p. 649–658, 2006.

TURCHETTO, Ricardo. **Fungos micorrízicos e *Azospirillum* no desenvolvimento do trigo em solo contaminado com cobre**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, 2021.

VELLOSO, Camila Cristina Vieira *et al.* **Resposta diferencial de genótipos de milho à inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019.

WU, Zhipeng *et al.* Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration: field experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 283-290, 2014.

ZHANG, Z., ZHANG, J., XU, G., ZHOU, L. & LI, Y. Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth and drought tolerance of *Zenia insignis* seedlings under drought stress. **New Forests**, 50(4), 593-604, 2019.

ZHANG, Luan *et al.* Physiological responses of biomass allocation, root architecture, and invertase activity to copper stress in young seedlings from two populations of *Kummerowia stipulacea* (maxim.) Makino. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 278-284, 2014.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cobre é um dos contaminantes mais comuns e não biodegradáveis que existem no solo (HOUGH, 2010). Essa contaminação, proveniente de atividades agrícolas e industriais tem aumentado nos últimos anos, acarretando em prejuízos ao meio ambiente e afetando a produtividade das culturas, além de em certos casos impossibilitar o cultivo nessas áreas. Por isso, torna-se necessário o estudo de alternativas para reutilização desses locais, tornando-os agricultáveis novamente.

O uso de microrganismos como fungos e bactérias surgem como alternativa para melhorar o crescimento e desenvolvimento de plantas em áreas contaminadas. De acordo com o primeiro trabalho realizado nesta dissertação, evidencia-se aumento no crescimento de plantas de sorgo e milho com a inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* em solo contaminado com cobre, demonstrando seu potencial de uso em ambientes com elevadas concentrações deste metal. O *Azospirillum brasilense* coloniza a rizosfera e também tecidos internos da planta, produz fito-hormônios e outras substâncias como auxina, citocinina, giberelina, ácido abscísico, etileno e ácido salicílico que auxiliam na proteção e no aumento do sistema radicular, aumentando também a absorção de água e nutrientes, proporcionando um maior desenvolvimento das plantas (COHEN *et al.*, 2015). As bactérias também podem diminuir o efeito tóxico dos metais através da redução do transporte desse metal, por processo de complexação e pelo acúmulo dos metais no interior das células, reduzindo a translocação do mesmo para as partes da planta (ANDREAZZA, 2009).

Os fungos micorrízicos arbusculares possuem grande importância e auxiliam no desenvolvimento dos vegetais através da relação mutualística entre a raiz da planta hospedeira e o micélio intra-radicular, porém, a relação simbiótica varia de acordo com a espécie fúngica e da especificidade com a espécie vegetal (MEIER *et al.*, 2012; BRUNDRETT, 2009). No presente estudo, a espécie *Acaulospora Scrobiculata* se adaptou melhor ao milho, possibilitando maior colonização micorrízica comparado com *Rhizoglyphus clarum*. Além disso, foi possível observar que a inoculação dos fungos micorrízicos possibilita maior tolerância de plantas de sorgo e milho ao cobre. Os fungos micorrízicos são capazes de proteger as plantas contra a toxicidade de metais de diversas maneiras, como por meio da retenção desses elementos na raiz, reduzindo a translocação para a parte aérea, através da produção de glicoproteínas como as glomalinas, as quais possuem capacidade de reter metais em suas estruturas (CHRISTIE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006). Além disso, os FMAs podem compartimentalizar metais pesados na parede celular fúngica devido a afinidade com

constituintes da parede como quitina, melanina e a glomalina, também podem se acumular nos vacúolos, principalmente dos esporos, onde o metal causa menos danos ao fungo (GONZÁLEZ-GUERREIRO *et al.*, 2008).

Ao analisar a coinoculação entre os fungos micorrízicos arbusculares e a bactéria *Azospirillum brasilense* no cultivo de sorgo e milho cultivado em solo contaminado com cobre, foi constatado que a inoculação de *Acaulospora scrobiculata* e a sua coinoculação com *Azospirillum brasilense* aumentam o sistema radicular e área foliar de milho em solo não contaminado, no entanto, para o sorgo, houve aumento de massa seca de raiz e volume de raiz com a inoculação de *Acaulospora scrobiculata* em solo contaminado. Além disso, as coinoculações de fungos micorrízicos com *Azospirillum brasilense* reduziram o teor de cobre na parte aérea e radicular de plantas de sorgo. Isso demonstra que as espécies de fungos micorrízicos e de bactérias promotoras do crescimento vegetal apresentam comportamento diferente de acordo com a espécie vegetal hospedeira. As rizobactérias, como *Azospirillum brasilense*, são capazes de aumentar o efeito micorrízico por meio da liberação de exsudatos radiculares, alteração do pH do solo e secreção de fitohormônios. Em contrapartida, no processo de penetração das hifas infectivas, pode ocorrer a exsudação de nutrientes pela planta, acelerando o crescimento das bactérias, além dos esporos produzidos pelos fungos micorrízicos servirem de abrigo e fornecerem alimento para as bactérias que colonizam suas superfícies, protegendo de estresses ambientais (KUMAR *et al.*, 2015; LEVY *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas, utilizando outras espécies de fungos micorrízicos e de bactérias promotoras de crescimento vegetal a fim de analisar a capacidade de melhorar o crescimento de plantas de sorgo e milho em solo contaminado com cobre.

7 CONCLUSÃO GERAL

Altas concentrações de cobre no solo reduzem parte aérea e radicular de plantas de milho e sorgo. Porém, a bactéria *Azospirillum brasilense* melhora o desenvolvimento destas plantas, aumentando a tolerância ao cobre. Bem como, a inoculação dos fungos micorrízicos possibilita maior tolerância das plantas ao cobre. O milho foi mais responsivo a colonização micorrízica em raízes comparado com o sorgo, sendo que a espécie *Acaulospora Scrobiculata* foi a que se adaptou melhor as condições e também a espécie vegetal.

A inoculação de *Acaulospora scrobiculata* promove maior massa seca, volume de raiz e colonização micorrízica de sorgo em solo contaminado com cobre. No entanto, para o milho, a inoculação de *Acaulospora scrobiculata* e a coinoculação com *Azospirillum brasilense* aumentam massa seca, volume de raiz, área foliar de milho em solo não contaminado com cobre. Além disso, a inoculação com *Acaulospora scrobiculata* e as coinoculações de fungos micorrízicos com *Azospirillum brasilense* reduzem o teor de cobre na parte aérea e radicular de plantas de sorgo.

REFERÊNCIAS

- ABIMILHO. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>>. Acesso em: 30 mai. 2022.
- ABIMILHO. **O cereal que enriquece a alimentação humana**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- AMADUCCI, S. *et al.* A. Effect of irrigation and nitrogen fertilization on the production of biogas from maize and sorghum in a water limited environment. **European Journal of Agronomy**, 76: 54-65, 2016.
- AMBROSINI, V. G. *et al.* Impacto do excesso de cobre e zinco no solo sobre videiras e plantas de cobertura. Embrapa Uva e Vinho – Capítulo em livro técnico, 2016
- ANDREAZZA, Robson. Potencial do uso de bactérias e plantas para a remediação de cobre em áreas de vitivinicultura e de rejeito de mineração de cobre no Rio Grande do Sul. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- ANDREAZZA, R. *et al.* Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. Revista de Ciências Agrárias, v. 36, p. 127-1366, 2013.
- ANDREOTTI, Marcelo *et al.* Inoculação com *Azospirillum brasilense* no Consórcio Capim-Paiguás e Sorgo na Safrinha: Comportamento Produtivo das Culturas para Silagem. In: **XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. 2016.
- ANICETO, Rafael Martins. **Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.
- BARBOSA, Rogério Hidalgo *et al.* Absorção foliar de cobre por plantas de milho: Efeitos no crescimento e rendimento. **Ciencia rural**, v. 43, n. 9, p. 1561-1568, 2013.
- BASSO, Juliana Broggio; KIANG, Chang Hung. Retardamento e dispersão hidrodinâmica de cobre, potássio e cloreto em solos residuais do subgrupo Itararé no estado de São Paulo. **Águas Subterrâneas**, v. 31, n. 1, p. 117-133, 2017.
- BERRUTI, Andrea *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1559, 2016.
- BRESSAN, Wellington *et al.* Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 315-323, 2001.
- BRUNDRETT, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, v.320, p.37 - 77, 2009.
- CAMBROLLÉ, J. *et al.* Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, v. 86, n. 9, p. 867-874, 2012.

COELHO, Antônio Marcos. Manejo da fertilidade do solo, exigências nutricionais e adubação do sorgo granífero cultivado na safrinha. **Technical Report**, 2015.

COHEN, A. C. *et al.* *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Plant Physiology**, v. 153, n. 1, p. 79-90, 2015.

COMIRAN, Mariane *et al.* **Toxidez por cobre: reflexos na qualidade de sementes e no desenvolvimento inicial de aveia preta**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2017.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/22, n. 7 sétimo levantamento, abril 2022.

CONAMA. **Resolução nº 420 de 28 de dezembro de 2009**. Disponível em: <<http://sapotecsul.com.br/sapotec/DOWNLOADS/CONAMA420.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2021.

CONSEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução CONSEMA nº 355/2017. Disponível em: <<https://www.sema.rs.gov.br/upload/arquivos/201707/19110149-355-2017-criterios-e-padros-de-emissao-de-efluentes-liquidos.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2021.

CONTINI, Elisio *et al.* Milho: caracterização e desafios tecnológicos. Brasília: Embrapa. (Desafios do Agronegócio Brasileiro), 2019.

CORNEJO, P. *et al.* Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 925-928, 2013.

COSTA, L. B. O. **Métodos de despendoamento mecânico na produção de sementes híbridas de milho**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

COSTA, Samara Maria Lopes; MELLONI, Rogério. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 169-180, 2019.

CHRISTIE, Peter; LI, Xiaolin; CHEN, Baodong. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1, p. 209-217, 2004.

CRISTINO, E. M. *et al.* Fungos micorrízicos arbusculares em cafeeiro (*Coffea arabica* L) cultivados em diferentes altitudes e faces de exposição ao sol. **X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2019.

DE CONTI, Lessandro. **Plantas de cobertura do solo e videiras: toxidez, fitorremediação e mecanismos de tolerância ao excesso de cobre**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

DHAWI, Faten; DATTA, Rupali; RAMAKRISHNA, Wusirika. Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 390-399, 2015.

ESTRELA, Maria Alexandra; CHAVES, Lúcia Helena Garofalo; SILVA, Larissa Novais. Fitorremediação como solução para solos contaminados por metais pesados. **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 31, n. 1, p. 160-172, 2018.

FANCELLI, A. L. **Cultivo racional e sustentável requer maior conhecimento sobre planta do milho**. In: Milho: Brasil amplia cultivo para atender demanda crescente. Visão Agrícola: ESALQ/USP, 2015.

FANCELLI, A. L. **Milho: nutrição e adubação**. Piracicaba. FEALQ. 2008. 212p.

FEPAM. **Portaria FEPAM n° 85/2014 Dispõe**. Disponível em: <<http://w.w.w.fepam.rs.gov.br/legislacao/arq/Portaria085-2014.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2021.

FILHO, O. F. L. Toxicidade de micronutrientes em sorgo-sacarino: diagnose visual. **Embrapa Agropecuária Oeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2016.

FILHO, I. A. P.; RODRIGUES, J. A. S. **Sorgo: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2015.

GONÇALVES, Gustavo Krüger *et al.* Respostas de mudas de videiras a adubação com cobre em solos de santana do livramento-RS/Responses of grapevine seedlings to copper fertilization in the soil of Santana do Livramento-RS. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 26378-26387, 2019.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M. *et al.* Ultrastructural Localization of Heavy Metals in the Extraradical Mycelium and Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 103–110, fev. 2008.

KIRKBY, Ernest Arnold; ROMHELD, Volker. **Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade**. Informações agrônômicas, v. 118, n. 2, p. 1-24, 2007.

KUMAR, M. *et al.* Growth promoting characteristics of rhizobacteria and AM Fungi for biomass amelioration of *Zea mays*. **Archives of Biological Sciences**, Belgrado, v. 67, n. 3, p. 877-887, 2015.

LEVY, Avram *et al.* Association between *Burkholderia* species and arbuscular mycorrhizal fungus spores in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1757-1759, 2009.

MARQUES, Daniele Maria *et al.* Crescimento e respostas fisiológicas das espécies arbóreas *Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. e *Myroxylon peruiferum* If expostas a diferentes concentrações de cobre no solo. **Revista Árvore**, v. 42, n. 2, 2018.

- MARQUES, M.; AGUIAR, C.R.C.; SILVA, J.J.L.S. Desafios, técnicas e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.1, p.1-11, 2011.
- MEIER S., BORIE F., CURAQUEO G., BOLAN N., CORNEJO P., 2012. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. **Applied Soil Ecology**, 61, 280-287.
- MENEGAES, Janine Farias *et al.* Consumo hídrico e desenvolvimento da cravina-chinesa cultivada em diferentes teores de Cu no solo. **Acta Iguazu**, v. 8, n. 1, p. 76-91, 2019.
- MENEZES, Cicero Beserra *et al.* **Importância do sorgo para o abastecimento de grãos, forragem e bioenergia no Brasil**. In: MENEZES, Cicero Beserra. Melhoramento genético de sorgo. Brasília-DF, 2021. 546p.
- MILLÉO, Marcos Vinicius Ribas; CRISTÓFOLI, Isadora. Avaliação da eficiência agrônômica da inoculação de *Azospirillum* sp. na cultura do milho. **Scientia Agraria**, v. 17, n. 3, p. 14-23, 2016.
- MIRANDA, J. C. C. **Cerrado: Micorriza Arbuscular -ocorrência e manejo**. EMBRAPA Cerrados, Planaltina - DF, 2008. 169p.
- MOREIRA, Fátima Maria de Souza e SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. atual. e ampl., Lavras - Editora UFLA, 2006. 729p.
- NAKAO, Allan Hisashi *et al.* Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 3, p. 501-511, 2018.
- NUNES, Anita Bueno de Camargo *et al.* Steel slag and phosphate nutrition of corn inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.
- OLIVEIRA, João Ricardo Gonçalves de *et al.* Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, v. 69, p. 687-694, 2010.
- RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3491-3498, 2008.
- RAMASAMY, K. *et al.* Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 44, n. 4, p. 637-649, 2011.
- RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.8, n. 1, p. 262-276, 2016.

ROSA, Daniel José *et al.* Parâmetros fisiológicos em videiras ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri x Vitis rupestris*) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com cobre. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 31, n. 1, p. 14-23, 2016.

RUSCITTI, Marcela; ARANGO, María; BELTRANO, José. Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 29, n. 1, p. 37-49, 2017.

SANTANA, Natielo Almeida *et al.* **Fitorremediação do cobre em vinhedos: efeito do fungo micorrízico arbuscular, minhocas e vermicomposto**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

SANTOS, Jennie Kélyn da Silva; SANTANA, Marcos Diones Ferreira; LARA, Túlio Silva. Responsividade de plantas de milho à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares da rizosfera de ipê amarelo. **Revista Agroecossistemas**, v. 10, n. 1, p. 253-264, 2018.

SCHAEFER, Paulo Eugênio. Inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho na integração lavoura-pecuária e a relação com as doses de nitrogênio e umidade do solo e pH s em solução. **Título: Mestrado em Produção Vegetal - Universidade Federal de Santa Maria**, 2016.

SEIDEL, Edleusa Pereira; COSTA, Antônio Carlos Saraiva da; LANA, Maria do Carmo. Fitodisponibilidade de cobre e produção de matéria seca por plantas de milho em resposta à aplicação de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1871-1878, 2009.

SILVA, Silvana da; SIQUEIRA, José Oswaldo; SOARES, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1749-1757, 2006.

SILVA, Juliano Cesar da. Desenvolvimento e capacidade fitoextratora de plantas agrícolas cultivadas em solo com diferentes texturas e teores de cobre. **Título: Mestrado em Agronomia: Agricultura e Ambiente - Universidade Federal de Santa Maria**, 2019.

SODRÉ FILHO, Joilson. **Consórcio sorgo granífero-braquiária: fitomassa, dinâmica de plantas daninhas e rendimento da soja em sucessão**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SOLOGUREN, L. **Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção**. In: Milho: Brasil amplia cultivo para atender demanda crescente. Visão Agrícola: ESALQ/USP, 2015.

SOUZA, Elton M. de *et al.* Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield?. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 1, p. 53-59, 2019.

SOUZA, Maraisa de Paula; BARBOSA, Ricardo Henrique; MOREIRA, Fabricio Henrique. **Fungos micorrízicos arbusculares e estimulantes da micorrização na cultura do milho e do algodão**. XXXV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2015.

SPATAFORA, J. W. *et al.* A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p. 1028-1046, 2016.

VALADARES, R. B. S.; MESCOLOTTI, D, L. C.; CARDOSO, E. J. B. N. Micorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.

VIEIRA, Paulo Vinicius Demeneck *et al.* Agronomic characteristics and grain yield of sorghum and maize hybrids grown with different sowing times. **Revista Caatinga**, v. 34, p. 780-790, 2021.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TIECHER, Tadeu L. *et al.* The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v. 262, p. 52-61, 2016.

TURCHETTO, Ricardo. **Fungos micorrízicos e *Azospirillum* no desenvolvimento do trigo em solo contaminado com cobre**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, 2021.

USDA. United States Department of Agriculture. **World agricultural production**. Washington, 2021. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

YANG, Yongqing *et al.* Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Combier”) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1483-1491, 2011.

ZANCHETA, A.C.F.; ABREU, C.A.; ZAMBROSI, F.C.B.; ERISMANN, N.M.; LAGÔA, A.M.A.M. Fitoextração de cobre por espécies de plantas em solução nutritiva. **Bragantia**, v.70, n.1, p.737-744, 2011.