

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

Saulo Francisco Telles Fruet

**COMPORTAMENTO DE DUAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS
CULTIVADAS *IN VITRO* E *IN VIVO* EM FUNÇÃO DO COBRE**

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Saulo Francisco Telles Fruet

**COMPORTAMENTO DE DUAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS
CULTIVADAS *IN VITRO* E *IN VIVO* EM FUNÇÃO DO COBRE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de Concentração em Engenharia Agroambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Agrícola**

Orientador: Dr. Alexandre Swarowsky

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Saulo Francisco Telles Fruet

**COMPORTAMENTO DE DUAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS
CULTIVADAS IN VITRO E IN VIVO EM FUNÇÃO DO COBRE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de Concentração em Engenharia Agroambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Agrícola**

Aprovado em 26 de janeiro de 2018



Alexandre Swarowsky, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr. (UFSM)



Candida Elisa Manfio, PHD. (EPAGRI)

Santa Maria, RS, Brasil
2018

RESUMO

COMPORTAMENTO DE DUAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS CULTIVADAS *IN VITRO* E *IN VIVO* EM FUNÇÃO DO COBRE

AUTOR: SAULO FRANCISCO TELLES FRUET
ORIENTADOR: ALEXANDRE SWAROWSKY

A contaminação dos solos por cobre pode alterar o desenvolvimento fisiológico e o estabelecimento de plantas. A utilização de espécies florestais tolerantes e extratoras de cobre para revegetação de solos contaminados tem se mostrado uma alternativa de recuperação, por meio do método de fitorremediação. Nesse sentido, as espécies florestais, em decorrência de sua maior produção de biomassa, são capazes de imobilizar e exportar para fora de qualquer sistema, maiores quantidades de elementos tóxicos presentes no solo. No presente trabalho, o objetivo consistiu em estudar o comportamento de duas espécies florestais arbóreas cultivadas *in vitro* e *in vivo* em condições de excesso de cobre. Foram realizados estudos com as espécies canafístula (*Peltophorum dubium*) e ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*), um deles conduzidos em sala de crescimento em laboratório de cultura de tecidos, e o segundo, em casa de vegetação, em condições controladas. No estudo 1 foi possível obter elevadas médias gerais de sobrevivência e estabelecimento *in vitro* nas concentrações de cobre testadas. As espécies demonstraram tolerância até a concentração 16 mg L^{-1} , sendo a dose de 8 mg L^{-1} a que proporcionou um melhor desempenho para as espécies; a dose tóxica foi a de 64 mg L^{-1} . Para canafístula, em todas as doses a sobrevivência foi adequada até os 60 dias, porém, aos 90 dias foi observada uma alta mortalidade dos explantes a 64 mg L^{-1} . Já o ipê-amarelo demonstrou baixa sobrevivência a 64 mg L^{-1} já aos 30 dias, indicando ser uma espécie menos tolerante ao cobre. Nos tratamentos em que ocorreram baixa sobrevivência também foram constatados menores número de folhas e formação de raízes. No estudo 2, em função das concentrações de cobre, o ipê-amarelo apresentou redução apenas no diâmetro do colo, enquanto que, em canafístula, foi na altura. De uma maneira geral, nos estudos de cultivo *in vitro* realizados, as espécies demonstram se beneficiar pelo aumento na concentração de cobre até 8 ou 16 mg L^{-1} , de maneira diferenciada em função do período de cultivo. Igualmente, as culturas *in vitro* das duas espécies demonstram tolerância ao cobre, mas foram prejudicadas pelo aumento para 64 mg L^{-1} de CuSO_4 , que é excessivo. Nos estudos de cultivo em casa de vegetação, apenas as variáveis de crescimento diâmetro do colo, em ipê-amarelo, e altura de planta, em canafístula são significativamente afetadas pela adição de cobre aos teores nativos do metal no solo. Os resultados obtidos têm potencialidade para contribuir, simultaneamente, para a otimização dos protocolos de micropropagação e para o desenvolvimento de metodologias eficientes de fitorremediação e fitoextração de áreas degradadas inseridas nos biomas Mata Atlântica e Pampa, reduzindo os impactos ambientais da contaminação por cobre.

Palavras-chave: micropropagação; casa de vegetação; *Handroanthus chrysotrichus*; *Peltophorum dubium*; metal pesado

ABSTRACT

Behavior of two forestry tree species cultivated *in vitro* and *in vivo* in function of copper

AUTHOR: SAULO FRANCISCO TELLES FRUET
ADVISOR: ALEXANDRE SWAROWSKY

Contamination of soils by copper can alter physiological development and establishment of plants. The use of copper tolerant and extractive forest species for revegetation of contaminated soils has been shown to be an alternative of recovery by the phytoremediation method. In this sense, forest species, due to their higher production of biomass, are capable of immobilizing and exporting outside of any system, greater amounts of toxic elements present in the soil. In the present work, the objective was to study the behavior of two tree species *in vitro* and *in vivo* cultivated under conditions of excess copper. Studies were carried out with the *Peltophorum dubium* and *Handroanthus chrysotrichus*, one of them conducted in a growing room in a tissue culture laboratory, and the second in a greenhouse under controlled conditions. In study 1 it was possible to obtain high general averages of *in vitro* survival and establishment in the concentrations of copper tested. The species showed tolerance up to the 16 mg L⁻¹ concentration, with the 8 mg L⁻¹ dose giving the best performance for the species; the toxic dose was 64 mg L⁻¹. For *Peltophorum dubium*, at all doses survival was adequate up to 60 days, but at 90 days a high mortality of the explants at 64 mg L⁻¹ was observed. *Handroanthus chrysotrichus* showed low survival at 64 mg L⁻¹ already at 30 days, indicating that is a less tolerant copper species. Low number of leaves and root formation were also observed in treatments with low survival. In study 2, as a function of the copper concentrations, *Handroanthus chrysotrichus* presented reduction only in the diameter of the stem, whereas in *Peltophorum dubium*, it was at height. In general, in the *in vitro* culture studies, the species demonstrated that they benefit from the increase in the concentration of copper up to 8 or 16 mg L⁻¹, differently depending on the period of cultivation. Likewise, the *in vitro* cultures of both species demonstrate copper tolerance, but were impaired by the increase to 64 mg L⁻¹ of CuSO₄, which is excessive. In greenhouse cultivation studies, only the growth variables of the stem diameter in *Handroanthus chrysotrichus* and plant height in *Peltophorum dubium* are significantly affected by the addition of copper to the native contents of the metal in the soil. The results obtained have the potential to contribute simultaneously to the optimization of micropropagation protocols and to the development of efficient phytoremediation and phytoextraction methodologies of degraded areas inserted in the Mata Atlântica and Pampa biomes, reducing the environmental impacts of copper contamination.

Keywords: micropropagation; greenhouse; *Handroanthus chrysotrichus*; *Peltophorum dubium*; heavy metal.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Canafístula (*Peltophorum dubium*). A. Aspecto geral de um indivíduo adulto; B. Detalhe da copa e frutos. Santa Maria, RS, UFSM, 2018 22
- Figura 2 – Aspecto geral de um indivíduo de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) em floração. Santa Maria, RS, UFSM, 201824
- Figura 3 – Porcentagem de sobrevivência *in vitro* de brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16; ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....29
- Figura 4 - Porcentagem de estabelecimento *in vitro* de brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....30
- Figura 5 – Número de folhas em brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/201731
- Figura 6 – Número de folhas senescentes em brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre ((0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), independentemente do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....33
- Figura 7 - Porcentagem média de formação de raízes *in vitro* em brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....34
- Figura 8 – Porcentagem média de sobrevivência *in vitro* de brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/201735
- Figura 9 - Porcentagem de estabelecimento *in vitro* de brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....36
- Figura 10 - Número de folhas em brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017 37
- Figura 11 - Número de brotos em explantes de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), independentemente do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....38

- Figura 12 - Número de folhas senescentes em brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), independentemente do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....39
- Figura 13 - Porcentagem média de formação raízes *in vitro* em brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/201741
- Figura 14 - Diâmetro do colo de plantas de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*), mantidas em casa de vegetação, em função das diferentes concentrações de cobre (0; 100; 200; 400 ou 800 mg L⁻¹) independentemente do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....42
- Figura 15 - Altura média (cm) de plantas de canafístula (*Peltophorum dubium*), mantidas em casa de vegetação, em função das diferentes concentrações de cobre (0; 100; 200; 400 ou 800 mg L⁻¹) independentemente do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões e valores orientadores de cobre (CETESB, 2013).....	13
Tabela 2 – Médias referentes ao número de folhas senescentes em brotações de ipê-amarelo (<i>Handroanthus chrysotrichus</i>) cultivadas <i>in vitro</i> , em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias), independentemente das concentrações de cobre testadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.	39
Tabela 3 - Médias referentes à altura de planta, diâmetro de colo e frequência de plantas com sinais de amarelecimento (FPSA) em plantas de ipê-amarelo (<i>Handroanthus chrysotrichus</i>) em função do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....	42
Tabela 4 - Médias referentes à altura de planta, diâmetro de colo, número de folhas e frequência de plantas com sinais de amarelecimento (FPSA) em plantas de canafístula (<i>Peltophorum dubium</i>) em função do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CONTAMINAÇÃO DE SOLO E ÁGUA POR COBRE	13
2.2 TOLERÂNCIA E TOXICIDADE A COBRE EM ESPÉCIES VEGETAIS	15
2.3 FITORREMEDIÇÃO	16
2.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS TOLERANTES AO COBRE	18
2.5 ESPÉCIES ESTUDADAS.....	19
2.5.1 <i>Peltophorum dubium</i>	19
2.5.2 <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ESTUDO 1 - AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE EM DUAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS EM CONDIÇÕES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	25
3.1.1 Desinfestação superficial das sementes	25
3.1.2 Germinação <i>in vitro</i> das sementes	25
3.1.3 Isolamento de segmentos nodais das plântulas e cultivo	25
3.1.4 Delineamento experimental, avaliações e Análise dos dados	26
3.2 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO A TOLERÂNCIA À COBRE DAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	26
3.2.1 Delineamento experimental, avaliações e Análise dos dados	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 ESTUDO 1 – AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM <i>PELTOPHORUM DUBIUM</i>	28
4.1.1 Sobrevivência <i>in vitro</i>	28
4.1.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	29
4.1.3 Número de folhas	30
4.1.4 Número de brotos	32
4.1.5 Número de folhas senescentes	32
4.1.6 Formação de raízes	33
4.2 ESTUDO 1 – AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM <i>HANDROANTHUS CHRYSOTRICHUS</i>	34
4.2.1 Sobrevivência <i>in vitro</i>	34
4.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	35
4.2.3 Número de folhas	36
4.2.4 Número de brotos	37
4.2.5 Número de folhas senescentes	38
4.2.6 Formação de raízes	40
4.3 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE DAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	41
4.3.1 <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	41
4.3.2 <i>Peltophorum dubium</i>	43
5 CONCLUSÃO	45
6 REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação do solo é um fato atual e preocupante visto que são descartados na natureza muitos resíduos de forma irregular, em muitas regiões do Brasil ocorre a contaminação de solo por cobre, principalmente em decorrência de atividades como mineração e viticultura, sendo que nesta são empregados fungicidas à base de cobre (CHAIGNON; HINSINGER, 2003; NACHTIGALL et al., 2007).

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial às plantas, porém, quando em excesso no ambiente, pode causar danos severos, adicionando grupos sulfidril a às proteínas e induzindo à peroxidação de lipídios das membranas celulares (YRUELA, 2005).

Por apresentar massa específica superior a 5 g cm^{-3} , o cobre é considerado metal pesado, e, ao contrário de poluentes orgânicos, não pode ser quimicamente degradado ou biodegradado por micro-organismos (MAZEN, 2004).

Os metais pesados, assim como outros fatores ambientais, podem causar danos às plantas, como consequência do estresse oxidativo provocado pela intensificação da formação de espécies ativas do oxigênio (EAOs). As EAOs atingem moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, com consequentes distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos em células, podendo levá-las à morte (HALLWELL; GUTTERIDGE, 1989; BRAY et al., 2000).

As concentrações normais de cobre no ambiente são, normalmente, baixas ($20\text{-}30 \text{ mg kg}^{-1}$ em solos não contaminados e menos de $2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ em águas naturais). A Resolução CONAMA 357/2005 sugere, como limite máximo, a concentração $9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ($9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cobre) para águas doces Classe I, as quais são destinadas ao consumo e à recreação.

Concentrações de cobre no solo, variando de 40 mg kg^{-1} para solo arenoso e 100 mg kg^{-1} para solo argiloso, têm sido consideradas tóxicas para as plantas (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000). Entretanto, para espécies arbóreas dos biomas brasileiros os valores são, ainda, desconhecidos (SILVA et al., 2011), pois ainda são escassos os estudos relacionados aos níveis tóxicos de cobre para as plantas.

Visando amenizar e despoluir o solo alguns métodos são sugeridos, os quais são divididos em dois grupos: *ex situ* e *in situ* (SANTOS; NOVAK, 2013). O primeiro grupo abrange os métodos tais como: escavação, incineração, extração com

solvente, oxirredução, entre outros, sendo bastante dispendiosos e destrutivos (TIBURTIUS, 2008; OLIVEIRA et al., 2009). O segundo grupo utiliza plantas e comunidades microbianas por meio de processos biotecnológicos para remover ou reduzir poluentes do ambiente (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005; SOUTO, 2011).

Entre os métodos *in situ*, o tratamento de solos contaminados através da utilização de plantas pode ser feito pela fitorremediação, onde as plantas auxiliam removendo, contendo, transferindo, estabilizando e tornando inofensivos os metais pesados presentes no solo.

A fitoextração também é uma técnica utilizada e refere-se ao emprego de plantas hiperacumuladoras para remover os metais do solo pela absorção e acúmulo nas raízes e na parte aérea, que poderão ser, posteriormente, dispostas em aterros sanitários ou recicladas para a recuperação do metal. Essas plantas são capazes de tolerar, absorver e translocar altos níveis de certos metais pesados que seriam tóxicos a qualquer outro organismo. Além disso, a adição de quelatos sintéticos, como o ácido etilenodiaminotriacético (EDTA) pode aumentar os efeitos da fitoextração (KHAN et al., 2000).

Práticas de nutrição mineral, calagem e/ou uso de gesso podem melhorar as condições para estabelecimento e desenvolvimento de plantas tolerantes em substratos contaminados. O desenvolvimento de um sistema radicular bem estruturado para impedir a perda dos contaminantes por lixiviação e erosão e parte aérea com grande superfície de transpiração, potencializando a capacidade de absorção e retenção do contaminante, principalmente nas regiões de grande pluviosidade, favorecem a descontaminação do solo.

Espécies florestais possuem essas características, no entanto, são escassas as informações que evidenciem quais espécies nativas que de fato podem ser utilizadas em programas de fitorremediação. As espécies florestais nativas possuem potencial para uso na fitorremediação, pois tem grande formação de biomassa na parte aérea, resistência, perenidade e um bom desenvolvimento radicular. Algumas espécies florestais nativas podem alcançar a idade de corte num espaço de tempo economicamente aceitável. A matéria prima produzida em forma de madeira pode ser comercializada em vários setores do mercado madeireiro sem perigo para os ecossistemas.

Considerando o exposto e visando minimizar os efeitos do Cu no solo o presente trabalho teve por objetivo estudar o comportamento de duas espécies florestais arbóreas cultivadas *in vitro* e *in vivo* em condições de excesso de cobre. Para tanto, foram avaliadas espécies canafístula (*Peltophorum dubium*) e ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). Os resultados obtidos podem contribuir para projetos de fitorremediação e fitoextração em áreas contaminadas por excesso de cobre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO DE SOLO E ÁGUA POR COBRE

O solo desempenha um papel fundamental na sustentabilidade do ecossistema terrestre, por servir de habitat para diversos organismos e por possibilitar o crescimento das plantas, a degradação e a reciclagem da biomassa microbiana (ALLOWAY, 1995).

Contudo, o crescimento industrial e populacional de forma desordenada ocasionou inúmeros impactos negativos ao meio ambiente, como a poluição dos recursos hídricos por metais potencialmente tóxicos. O íon Cu é um exemplo de íon tóxico que pode ser encontrado em efluentes industriais, que, em determinadas concentrações, compromete, drasticamente, a qualidade do solo e da água.

O cobre, do latim cupprum, é um elemento químico, representado na Tabela Periódica pelo símbolo Cu, com número atômico 29 e massa atômica 63,6. O metal cobre, na temperatura ambiente, encontra-se no estado sólido. Este metal atua em diversos processos no organismo, como a metabolização de ferro por enzimas que são cobre-dependentes (SUN, et al. 2015).

Na Tabela 1 estão representados os padrões e valores orientadores da concentração permitida de íons Cu em diversos ambientes como efluentes, solo e água, sendo a maioria fixada por resoluções do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA.

Tabela 1 - Padrões e valores orientadores de cobre (CETESB, 2013).

Meio	Concentração	Comentário	Referência
Efluente	1,0 mg L⁻¹	VM (Padrão de lançamento)	CONAMA 430/2011
Solo	60 mg kg ⁻¹	Valor de prevenção	CONAMA 429/2009
	200mg kg ⁻¹	VI Cenário agrícola-APMáx.	
	400mg kg ⁻¹	VI Cenário residencial	
	600mg kg ⁻¹	VI Cenário industrial	
Água potável	12 mg L⁻¹	Padrão de potabilidade	PORTARIA 2914/2011
Água subterrânea	2000µg L ⁻¹	VMP (consumo humano)	CONAMA 396/2008
	500 µg L ⁻¹	VMP (dessedentação)	
	200 µg L ⁻¹	VMP (irrigação)	
	1000 µg L ⁻¹	VMP (recreação)	

Com a necessidade de consumo e exploração de recursos naturais, como da mineração de cobre, que é muito explorada em virtude da vasta aplicação industrial desse metal, também cresceu acarretando, com isso, inúmeras consequências negativas para o ecossistema. (SANTOS JÚNIOR, 2005).

As principais características do cobre, que o torna um dos metais mais explorado, é o fato de ser um bom condutor, utilizado na fabricação de cabos e fios, eletroímãs, materiais elétricos, interruptores, tubos de vácuo, cunhagem de moedas, esculturas etc. Diante de sua grande aplicabilidade, este metal possui um alto valor de mercado, justificando a realização de estudos fundamentais para sua exploração e recuperação (MOÇO, 2013)

Alguns agrotóxicos, quando usados em excesso, tais como os fungicidas, inseticidas e herbicidas e que o princípio ativo é sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre, entre outros, podem promover o acúmulo deste metal no solo (LÓPES-MOSQUERA et al., 2000), além de contaminar a cadeia trófica e reduzir a produtividade de culturas agrícolas (OBRADOR et al., 1997).

Na região da serra gaúcha, em NeossoloLitólico e Cambissolo Húmico, o uso intensivo de calda bordalesa por mais de 15 anos acumulou entre 30 a 65kg ha⁻¹ por ano (NOGUEIROL et al., 2005). Segundo Redente e Richards (1997), a disponibilidade de cobre diminui com o aumento do pH do solo; e a biodisponibilidade de formas solúveis deste metal depende do peso molecular, pois quanto menor o peso, maior sua disponibilidade (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1992).

De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001), a clorose e malformação de raízes são as características mais comuns induzidas pela toxicidade de cobre nas plantas. Esses mesmos autores mencionaram que o excesso de cobre também causa decréscimo na eficiência fotossintética, por interferir na cadeia transportadora de elétrons do fotossistema I, ocasionando a depressão de crescimento de plantas sensíveis.

O cobre possui pouca mobilidade nas plantas, e a maior parte do metal permanece na raiz e na parte aérea até a senescência. Na raiz, o elemento fica associado às paredes celulares e é praticamente imóvel. As maiores concentrações na parte aérea são em fases de crescimento intensivo e em níveis de fornecimento de luxo, acumulando-se nas proteínas e nos órgãos reprodutivos. O excesso de íons Cu²⁺ e Cu¹⁺ causam danos ao tecido e ao alongamento das raízes, alterações na

permeabilidade da membrana, inibição do transporte de elétrons fotossintéticos, imobilização do cobre nas paredes e vacúolos, e clorose (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1992).

2.2 TOLERÂNCIA E TOXICIDADE A COBRE EM ESPÉCIES VEGETAIS

A tolerância em plantas pode ser definida como a capacidade de sobreviver em solos que são tóxicos para outras plantas e se manifesta por uma interação entre um genótipo e seu meio ambiente (MACNAIR et al., 2000).

Espécies que se desenvolvem e sobrevivem em ambientes contaminados por metais sem alterar seu desenvolvimento, podem agir como indicadoras bioacumulativas, acumulando poluentes atmosféricos do ambiente sem, necessariamente, apresentar respostas visíveis, mas pela análise de seus tecidos, é possível estimar as concentrações ambientais dos poluentes (MULGREW; WILLIAMS, 2000).

Em decorrência disso, a escolha adequada de espécies a serem utilizadas em processos de revegetação, em particular, é muito importante, devido à necessidade de rápida adaptação aos fatores limitantes de crescimento da planta, sobretudo no caso de solos contaminados por metais (PRALON; MARTINS, 2001). A sobrevivência das espécies que crescem em solos com excesso de elementos contaminantes é relacionada à capacidade de tolerar e não de anular a toxicidade dos metais presentes (BAKER, 1981).

Uma problemática recorrente em nível mundial é o acúmulo excessivo de Cu no solo em áreas vitivinícolas (MACKIE; MÜLLER; KANDELER, 2012). Este acúmulo é proveniente das aplicações constante de agroquímicos, como as caldas a base de sulfato de cobre, que é utilizado no controle fitossanitário, principalmente, no míldio da videira (SÔNEGO et al., 2005). Segundo os autores, Kabata-Pendias e Pendias (2001), o teor de Cu superior a 100 mg kg^{-1} no solo é considerado excessivo e fitotóxico.

A técnica de cultivo *in vitro* em estudos relacionados a identificação e seleção de genótipos tolerantes a metais pesados pode ser usada para homogeneizar as condições e acelerar a obtenção de resultados. A técnica oferece vantagens à produção convencional de plantas, possibilitando produção de qualidade e em grande escala a partir de pequeno número de explantes retirados de uma planta

matriz, permitindo a manutenção de condições assépticas e controladas (WILLADINO et al.,2001), aumentando a porcentagem de sobrevivência e acelerando o tempo de germinação das sementes (PICKENS et al., 2006). A utilização da técnica de cultivo *in vitro* tem sido amplamente empregada para garantir a produção de plantas utilizadas em agronomia, horticultura e reflorestamento (ESTRADA-LUNA et al., 2001).

2.3 FITORREMEDIAÇÃO

A fitorremediação constitui uma técnica promissora para recuperar locais contaminados por metais pesados, e apresenta diversas vantagens, como a possibilidade de aplicação em áreas extensas, possuir baixo custo, além de reduzir a erosão e lixiviação dos contaminantes. Sua utilização é indicada em áreas com contaminação difusa e com baixa concentração de metais, nas quais as técnicas de engenharia não sejam viáveis economicamente. Logo, esta técnica deve ser estudada por ser uma tecnologia recente e promissora, havendo a necessidade de se testar novas espécies vegetais para que possam ser eficientemente cultivadas em áreas contaminadas no Brasil.

As espécies florestais, para serem utilizadas em fitorremediação, devem apresentar tolerância ao contaminante, sendo já bem conhecidos os possíveis mecanismos de tolerância aos metais pesados (TURNER, 1969; WOOLHOUSE, 1983; BAKER, 1987; LARCHER, 2004). Os metais pesados absorvidos por espécies arbóreas ficam mais tempo imobilizados nos tecidos vegetais, retardando seu retorno ao solo. Embora esse potencial seja conhecido, poucos são os estudos sobre a tolerância de espécies arbóreas tropicais em solos contaminados com esses elementos (PAIVA et al., 2002; 2003).

As espécies arbóreas nativas, principalmente as de rápido crescimento, apresentam características desejáveis para a fitorremediação de solos contaminados com metais pesados (fácil implantação, maior ciclo de vida e grande produção de biomassa), quando comparadas às plantas de ciclo curto. Tais peculiaridades permitem minimizar os custos de cultivo da área contaminada, maior produção de biomassa, acumular maior quantidade de carbono e de metais pesados, o que é interessante nesses projetos de recuperação ambiental. Dessa forma, projetos de fitorremediação de solos contaminados com metais pesados

utilizando espécies arbóreas nativas tropicais apresentam, ainda, potencial de sequestro de carbono, contribuindo com a diminuição do efeito-estufa (CAIRES et al., 2005).

A fitorremediação consiste em uma técnica complexa que envolve o sistema solo-planta-contaminante e suas adaptações biogeoquímicas, sendo influenciada pelos processos fisiológicos das plantas, pelas características edafoclimáticas locais e pela distribuição espacial e concentração do contaminante (ANSELMO; JONES, 2005; MONTEIRO, 2005). Além de, promover a reabilitação da estrutura e da ecologia do solo, de maneira a aumentar a porosidade, a infiltração da água e a quantidade de C orgânico no solo e reduzindo a erosão (MERKL; RAFT; ARIAS, 2006; MARQUES; AGUIAR; SILVA, 2011). Essa técnica tem a finalidade de degradar ou reduzir a níveis não tóxicos os contaminantes no solo (MARIANO; OKUMURA, 2012).

De acordo, com Gratão et al. (2005), Ghosh e Singh (2005), Pilon-Smits (2005), Oliveira et al. (2009), Mariano e Okuruma (2012) e Moosavi e Seghatoleslami (2013), os métodos de fitorremediação dos solos podem ocorrer por diversos processos, como:

-Fitodegradação (ou fitotransformação): as plantas degradam ou mineralizam contaminantes orgânicos através de processos metabólicos por enzimas específicas, como nitroredutases e lactases;

-Fitoestabilização (ou fitoadsorção): as plantas convertem os contaminantes em formas menos móveis (insolúveis), sem que haja a sua remoção dos solos, assim estabilizando-os e reduzindo o risco para a saúde humana e para o ambiente;

-Fitoestimulação (ou rizorremediação): há uma proliferação de microrganismos degradativos na rizosfera, os quais usam os metabólitos exsudados da planta como fonte de carbono e energia. Esta técnica limita-se a compostos orgânicos;

-Fitoextração (ou fitoacumulação): as raízes absorvem os contaminantes armazenando, transportando e/ou acumulando-os na parte aérea das plantas. É aplicada, principalmente, para metais (Pb, Zn, Cd, Cu, Ni);

-Fitofiltração (ou rizofiltração): as plantas absorvem e concentram os contaminantes de um meio aquoso, visando fitorremediar águas subterrâneas, superficiais e residuais com baixas concentrações de contaminantes;

-Fitovolatilização: as plantas convertem os contaminantes em suas formas não tóxicas (voláteis) liberando-os na atmosfera, como Hg, Se e As. Dentre estes processos os que têm demonstrado potencial promissor para a descontaminação do solo por metais pesados são a fitoestabilização e a fitoextração (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2007; OLIVEIRA, 2012).

No sistema metal-planta, a adaptação das plantas as condições químicas do ambiente favorecem a absorção e o acúmulo dos metais nas raízes, podendo translocá-los para outros órgãos de reserva como caule, folha, fruto (MELO; MELO; MELO, 2004). Deste modo, a biodisponibilidade dos metais pesados no solo para a extração ou estabilização por plantas aptas a este processo vem a contribuir para a melhoria das áreas contaminadas. Contudo, a seleção de plantas adequadas para esses métodos de descontaminação do solo depende diretamente, de pesquisas com visão multidisciplinar, envolvendo várias áreas do conhecimento, tais como: fitotecnia, biologia, ciência do solo, engenharia agrícola, geografia, química, entre outros.

2.4 CULTIVO *IN VITRO* NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS TOLERANTES AO COBRE

A cultura de tecidos consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais em meio nutritivo apropriado, em condições ambientais assépticas. Oferece excelentes oportunidades não somente para a propagação comercial de plantas, sendo amplamente empregada para garantir a produção de mudas hortícolas e florestais (ESTRADA-LUNA et al., 2001). Igualmente, pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo, além de viabilizar estudos de fisiologia, fitopatologia, genômica, transcriptômica, entre outros, multiplicando material vegetal para os experimentos. Facilita a obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (PAIVA; GOMES, 1995).

A cultura de tecidos baseia-se na teoria da totipotência celular, a qual se caracteriza pela propriedade inerente às células vegetais de manifestar, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade em iniciar um novo indivíduo multicelular (TORRES et. al., 2000). Os explantes utilizados na propagação podem ser reduzidos ao tamanho de células individuais, mas também podem ser utilizados tecidos ou órgãos (SERAFINI et. al., 2001).

2.5 ESPÉCIES ESTUDADAS

O estudo avaliou duas espécies de grande importância ambiental e econômica para os biomas Mata Atlântica e Pampa, a canafístula (*Peltophorum dubium*) e o ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*).

2.5.1 *Peltophorum dubium*

A canafístula é uma espécie da família Fabaceae, utilizada com sucesso em projetos de produção, paisagísticos e ambientais. É uma espécie pioneira, de crescimento rápido, ótima para reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992).

A canafístula é uma espécie heliófila, caducifólia, rústica, apresenta tolerância e resistência ao clima frio, tendo grande porte, podendo atingir até 40 m de altura e 120 cm de diâmetro a altura do peito (DAP) na sua maturidade (CARVALHO, 2003). É uma espécie secundária, mas com algumas características de pioneira, a qual se faz presente na formação das capoeiras. Em florestas nativas onde há sua ocorrência, geralmente, existem poucos indivíduos, porém, esses são sempre de grande porte, quase sempre ocupando o dossel dominante na floresta primária (CARVALHO, 2003). A canafístula ocupa principalmente as clareiras e as borda das matas, devido à maior incidência da luz solar, sendo amplamente utilizada para recuperação de áreas degradadas, área de preservação permanente, paisagismo e arborização de ruas, parques e praças, pois propicia ótima sombra e beleza (REITZ et al., 1978; LORENZI, 2002), além de favorecer as espécies de sombra ao seu desenvolvimento, auxiliando na formação da floresta.

A copa da canafístula é ampla, umbeliforme, larga e achatada, como pode ser observado na figura 1, suas folhas podem ser semidecíduas até decíduas, alternas e compostas bipinadas com cerca de 25 cm de largura por 50 cm de comprimento. As inflorescências têm formato de panículas terminais, racemosos, de cor amarela ou castanho esverdeada clara ou alaranjada, ramificação dicotômica cimosa e sistema sexual hermafrodita (SILVA, 2007).

A semente da canafístula é glabra, com coloração amarela clara (REITZ et al., 1978). O fruto da canafístula é um legume do tipo vagem, indeiscente e samaróide com superfície glabra, apresenta coloração castanho-escura, geralmente no fruto é

encontrado de uma a duas sementes, conforme figura 2. A dispersão das sementes é feita através da anemocoria com o auxílio do vento. As sementes são estenospérmicas, com superfície glabra e coloração amarela clara (REITZ et al., 1978), nervação peninérvea, anastomosada (DONADIO; DEMATTÊ, 2000).

A densidade da madeira da canafístula varia de 0,53 a 0,65 g cm³ (SILVA et al., 1983). Com coloração do alburno róseo-claro levemente amarelado; cerne com alternâncias irregulares de colorido róseo-acastanhado e de bege rosado-escuro, frequentemente com veios escuros irregulares. A superfície da madeira é irregular lustrosa e um tanto áspera ao tato, com textura médio-grosseira e grã fortemente revessa e diagonal. O cheiro e o gosto da madeira da canafístula são imperceptíveis e a sua durabilidade natural é moderada ao apodrecimento; e estacas de cerne desta espécie mostraram-se ser altamente resistentes a fungos e resistentes a cupins (CAVALCANTE et al., 1982). Em função da sua qualidade é indicada para produção de madeira no Centro-Sul do Brasil (CARVALHO, 1998). A madeira pode ser utilizada na indústria moveleira tornando-se uma importante fonte de renda para essas áreas que estavam impróprias para o cultivo de outras espécies.

Além de possuir alta aplicabilidade nos diversos setores da indústria madeireira, a canafístula apresenta elevados níveis de sobrevivência, crescimento e acumulação de biomassa, quando comparada a outras espécies nativas (BARTH, 2006; MORAES, 2003; BACKES et al., 2001).

Apesar da grande importância ecológica e econômica dessas espécies, poucos estudos têm sido desenvolvidos devido ao relativamente lento crescimento dessas plantas, quando comparado às espécies exóticas, como pinus e eucalipto. A associação dessas plantas com a atividade extratora de cobre do solo poderá ser uma alternativa para acelerar o processo de descontaminação aliado ao uso da madeira das espécies, com custos reduzidos e sem degradar o meio ambiente.

Os estudos iniciais de cultura de tecidos com canafístula demonstraram que a espécie apresenta potencialidade para a micropropagação por meio da emissão de gemas laterais (BASSAN, 2006). Posteriormente, foi observado, em estudo de multiplicação *in vitro*, que o emprego da citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP), associado ou não a outras citocininas, em meio nutritivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), não foi eficiente em induzir a emissão de brotações em segmentos apicais caulinares (CURTI et al., 2010). Porém, com o emprego de meio MS suplementado com a auxina Ácido α -Naftaleno Acético (ANA), combinado com a

citocinina Thidiazuron (TDZ) (a 10 μM), foi possível obter uma média de 73% de explantes que emitiram brotações adventícias. No entanto, nesse mesmo tratamento houve intensa formação de calos, indesejável nessa fase do cultivo, sendo recomendado o estudo de alternativas no intuito de promover a proliferação de um maior número de brotações (CURTI et al., 2010 b).

Foram testadas também, além de BAP, as citocininas Cinetina (CIN), Isopentenil Adenina (2iP) e TDZ associadas ou não a ANA. No entanto, de maneira geral, independentemente da concentração e da combinação utilizada, essas citocininas não afetaram, significativamente, a multiplicação *in vitro*. Pesquisando alternativas para incrementar as taxas de multiplicação ou para obter conhecimentos adicionais sobre eventuais respostas em relação à organogênese indireta, foram obtidos resultados promissores com a utilização de segmentos cotiledonares e hipocótilos cultivados em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo a auxina Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), indicando que esta pode ser uma via para o cultivo *in vitro* da espécie, a qual mostrou-se responsiva nessas condições (CANDIDO, 2013).

Por fim, em relação à formação *in vitro* de raízes, resultados promissores foram obtidos, tanto sob o ponto de vista quantitativo (foram obtidas médias de 36,78% de culturas enraizadas) como qualitativamente (as raízes formadas apresentavam raízes secundárias), com a utilização de substratos alternativos, como vermiculita, areia e Plantmax® combinados ao meio nutritivo MS, aos 60 dias de cultivo. Com a utilização de vermiculita houve intensa formação de calos na base das brotações, aos 60 dias de cultivo, porém, também houve a maior formação de raízes e foi observada melhoria na qualidade do sistema radicular, quando este substrato foi combinado ao meio nutritivo MS (CURTI; REINIGER, 2014).

Figura 1 – Canafístula (*Peltophorum dubium*). A. Aspecto geral de um indivíduo adulto; B. Detalhe da copa e frutos. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Fonte: O autor. B - Adaptado de timblindim.wordpress.com

2.5.2 *Handroanthus chrysotrichus*

O ipê-amarelo é a árvore brasileira mais conhecida, a mais cultivada e, sem dúvida nenhuma, a mais bela. É na verdade um complexo de nove ou dez espécies com características mais ou menos semelhantes, com flores brancas, amarelas ou roxas. Não há região do país onde não exista pelo menos uma espécie dele, porém a existência do ipê em habitat natural nos dias atuais é rara entre a maioria das espécies (LORENZI, 2000).

O ipê-amarelo é uma espécie heliófita (Planta adaptada ao crescimento em ambiente aberto ou exposto à luz direta) e decídua (que perde as folhas em determinada época do ano). Pertence ao grupo das espécies secundárias iniciais (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990).

Handroanthus chrysotrichus é uma espécie arbórea integrante da família Bignoniaceae, conhecida popularmente como ipê-amarelo cascudo, ipê do morro entre outros conforme figura 3. Ocorre naturalmente do Nordeste ao Sul do Brasil. É uma planta decídua, heliófita, característica de formação abertas da floresta pluvial do alto da encosta atlântica (CARVALHO, 2006; LORENZI, 2008).

A exuberância durante o florescimento faz com que a espécie seja utilizada na arborização de ruas, praças, parques e avenidas (LORENZI, 2008); por sua beleza, é considerada a flor-símbolo do Brasil (RIZZINI, 1971). Além disso, apresenta madeira moderadamente pesada, de grande durabilidade, sendo usada

amplamente na construção civil, carpintaria, marcenaria, laminação e indústria moveleira, produzindo, também, corante para tingir seda e algodão. Adicionalmente a espécie é recomendada para projetos de recuperação de áreas degradadas, de matas ciliares e demais áreas de preservação permanente e reflorestamento com finalidades comerciais (CARVALHO, 2006; LORENZI, 2008; OLIVEIRA E AL., 2008).

As características ecológicas da espécie tornam seu estudo importante devido ao seu amplo aproveitamento econômico, ornamental e medicinal, entre outros (OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, as espécies desse gênero produzem grande quantidade de sementes (LORENZI, 2008).

Estudos realizados por (PAIM, 2014) apresentaram elevadas médias gerais de sobrevivência (96,70%) e estabelecimento *in vitro* (95,87%) dos segmentos apicais caulinares de *H. chrysotrichus*. Da mesma maneira, para número de gemas e número de folhas foram obtidas médias gerais consideradas altas para cultura de tecidos de espécies arbóreas: 22,85 gemas por explante e 17,62 folhas por explante.

Em outro estudo realizado com *H. chrysotrichus* (PAIM, 2011), em que foram testados segmentos apicais caulinares e epicótilos cultivados em diferentes meios nutritivos (WPM, MS, $\frac{1}{2}$ WPM ou $\frac{1}{2}$ MS) foi verificado que segmentos apicais caulinares obtiveram melhores médias de sobrevivência (98,35%) e estabelecimento (88,40%) quando comparados aos epicótilos, cujas médias, para essas variáveis, foram 44,95% e 29,95% respectivamente. Neste mesmo estudo foram obtidas 4,25 folhas por explante, média inferior à obtida no presente ensaio, fato que pode estar relacionado ao acréscimo de fitorreguladores ao meio nutritivo, os quais podem ter contribuído para o melhor desenvolvimento *in vitro* dos explantes.

Figura 2 – Aspecto geral de um indivíduo de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) em floração. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Fonte: Google imagens

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois estudos, descritos a seguir, um deles conduzidos em sala de crescimento, em laboratório de cultura de tecidos, e o segundo, em casa de vegetação, com temperatura controlada $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

3.1 ESTUDO 1 - AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE EM DUAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS EM CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO*

Neste estudo foram efetuados dois experimentos, um com cada uma das espécies, sendo que em ambos foram realizadas as etapas a seguir descritas.

3.1.1 Desinfestação superficial das sementes

As sementes das duas espécies florestais foram submetidas à desinfestação superficial, em câmara de fluxo laminar, por imersão em hipoclorito de sódio a 1,5%, por 30 min, sob agitação constante, seguida de três lavagens com água deionizada autoclavada.

3.1.2 Germinação *in vitro* das sementes

Nesta etapa, as sementes foram inoculadas em frascos de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) cuja concentração de sais foi reduzida à metade (1/2MS), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar e pH ajustado para 5,8. Imediatamente após, as culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $20\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, durante 30 dias.

3.1.3 Isolamento de segmentos nodais das plântulas e cultivo

Os explantes foram inoculados em meio MS, contendo diferentes níveis de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ($0,025\text{ mg L}^{-1}$, 8 mg L^{-1} , 16 mg L^{-1} e 64 mg L^{-1}), utilizando-se como referência a concentração de cobre empregada no meio nutritivo MS ($0,025\text{ mg L}^{-1}$). O cultivo foi realizado por 90 dias, com um subcultivo aos 30 dias, sendo as

brotações transferidas para meio fresco de idêntica composição ao meio em que estavam sendo cultivadas anteriormente.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

3.1.4 Delineamento experimental, avaliações e Análise dos dados

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, onde foram utilizados o mesmo tratamento para as duas espécies em arranjo bifatorial em que os níveis do fator “A” referem-se as diferentes concentrações de cobre ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$, 8 mg L^{-1} , 16 mg L^{-1} ou 64 mg L^{-1}) e os níveis do fator B aos períodos de avaliação (30,60 ou 90 dias) respectivamente. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, compostas por um frasco contendo três explantes.

Foram realizadas avaliações aos 30, 60 e 90 dias: das seguintes variáveis: sobrevivência e estabelecimento *in vitro* (%), número de folhas por explante, número de brotações por explante, formação *in vitro* de raiz.

As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e no caso do valor F ser significativo, as médias de tratamentos qualitativos foram comparadas pelo próprio teste F ao nível de 5% de probabilidade e as de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Foi utilizado o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.2 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO A TOLERÂNCIA À COBRE DAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Neste também foram efetuados dois experimentos, um com cada uma das espécies. Inicialmente, as sementes foram plantadas em bandeja com substrato Plantmax® e após a germinação e o estabelecimento inicial, as plantas foram transferidas para vasos contendo o mesmo tipo de substrato.

3.2.1 Delineamento experimental, avaliações e Análise dos dados

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 5x2, em que o fator “A” consistiu das concentrações de cobre (0; 100; 200; 400 ou 800 mg L^{-1} de CuSO_4 adicionado ao

solo) utilizadas, e o fator “B”, referiu-se ao período de cultivo (30 ou 60 dias).

Empregaram-se oito repetições, compostas por um vaso contendo uma planta.

As avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias, e as variáveis analisadas foram a altura da planta, diâmetro do colo, número de folhas e frequência de plantas com sinais de amarelecimento.

As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e nos casos do valor F quando significativo, as médias de tratamentos qualitativos foram comparadas pelo próprio teste F ao nível de 5% de probabilidade e os de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Foi utilizado o Software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

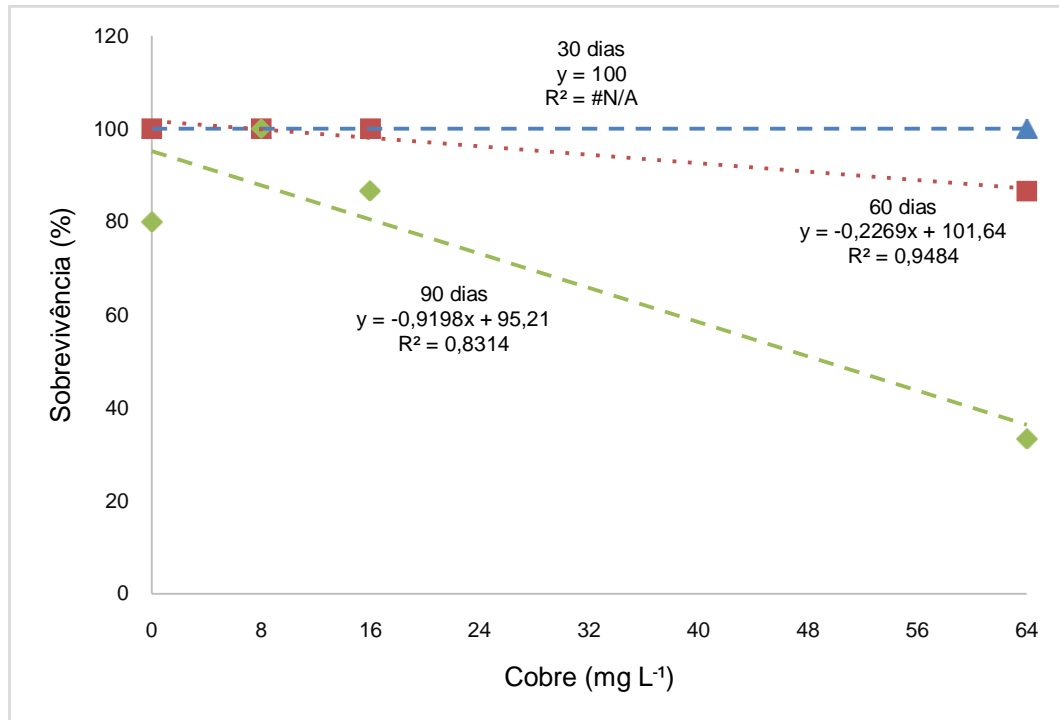
4.1 ESTUDO 1 – AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE NO CULTIVO *IN VITRO* EM *PELTOPHORUM DUBIUM*

4.1.1 Sobrevivência *in vitro*

Para a variável sobrevivência foi observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de cobre ($p=0,000$) e período de cultivo ($p=0,0000$), sendo observada, igualmente, interação significativa entre eles ($p=0,000$). O IV da variável foi de 2,00%. Na Figura 3 estão apresentadas as curvas de regressão obtidas com os dados observados e as respectivas equações, a partir dos dados estimados.

Pode-se observar que aos 30 dias não houve mortalidade, independentemente das concentrações de cobre testadas e, em consequência, não houve ajuste a uma curva de regressão. Já aos 60 e aos 90 dias observou-se um ajuste dos dados a equações lineares decrescentes, em que a sobrevivência reduziu com o aumento na concentração de cobre em função do período de cultivo, sendo seu efeito mais drástico aos 90 dias, com o cobre, na máxima concentração testada, reduzindo a média para apenas 33,33%. Contudo, deve-se ressaltar que ainda havia culturas remanescentes após cerca de três meses de exposição a esse excesso de cobre, indicando haver tolerância a esse metal na espécie em estudo. Já nas bromélias *Tillandsia capillaris*, *Tillandsia permutata* e *Tillandsia retorta*, os primeiros danos fisiológicos foram observados mais tarde, após 6 meses após exposição, tendo apresentado capacidade acumuladora para vários metais (WANNAZ; PIGNATA 2006).

Figura 3 – Porcentagem de sobrevivência *in vitro* de brotações de canafístula (*Peltophorumdubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16; ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



4.1.2 Estabelecimento *in vitro*

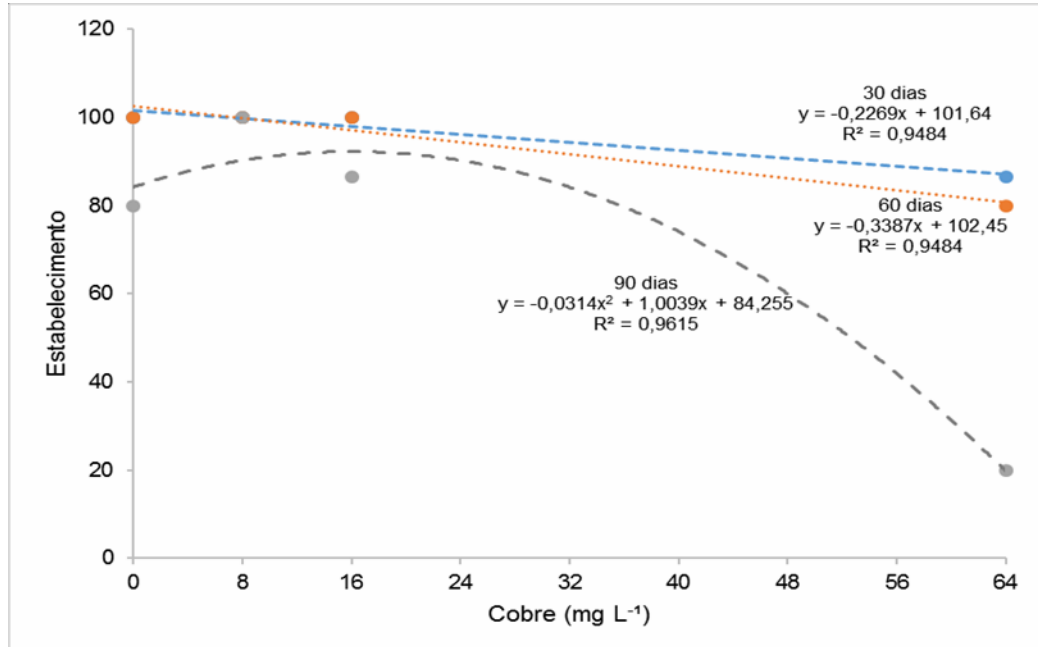
Para a variável estabelecimento também foi observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de cobre ($p=0,000$) e período de cultivo ($p=0,0000$), e interação significativa entre eles ($p= 0,000$). O IV da variável foi de 2,34%. Foi observado um ajuste linear decrescente para os períodos de cultivo de 30 e de 60 dias (Figura 4), indicando que com o aumento na concentração de cobre houve uma redução no estabelecimento *in vitro* das brotações de canafístula. No entanto, as médias de estabelecimento ainda se mantiveram altas (acima de 80%).

Já aos 90 dias foi verificado um comportamento quadrático (Figura 4), em que a máxima eficiência técnica (MET) ocorreria a 20,02 mg L⁻¹ de cobre. Nesse período de cultivo, na ausência de cobre, foi observada elevada média de estabelecimento das brotações (80%), no entanto, a partir da concentração 16 mg L⁻¹ houve elevada redução na média de estabelecimento, obtendo-se valor inferior a 20% de brotações estabelecidas na maior concentração testada (64 mg L⁻¹). Assim, mesmo se

observando que, nesse período, havia 33,33% de culturas vivas, apenas cerca de 20% delas lograram retomar o crescimento na presença de excesso de cobre.

O excesso de cobre pode inibir o crescimento das plantas, causar clorose de folhas e aumentar o vazamento das membranas celulares da raiz (SHEN et al., 1998; MURPHY et al., 1999), induzindo à perda de vigor, escurecimento e paralisia no crescimento de raízes (FERNANDES, 2006). Em um estudo *in vitro* realizado com *Aechmea blanchetiana* os resultados evidenciaram que, mesmo em concentrações consideradas inadequadas para o ambiente (1,45 e 14,5 μM de cobre), a espécie apresentou capacidade de manter o crescimento, mostrando incremento de 2-3 vezes das variáveis de crescimento em relação ao tempo zero e alto índice de sobrevivência (GIAMPAOLI, 2010).

Figura 4 - Porcentagem de estabelecimento *in vitro* de brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L^{-1}) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



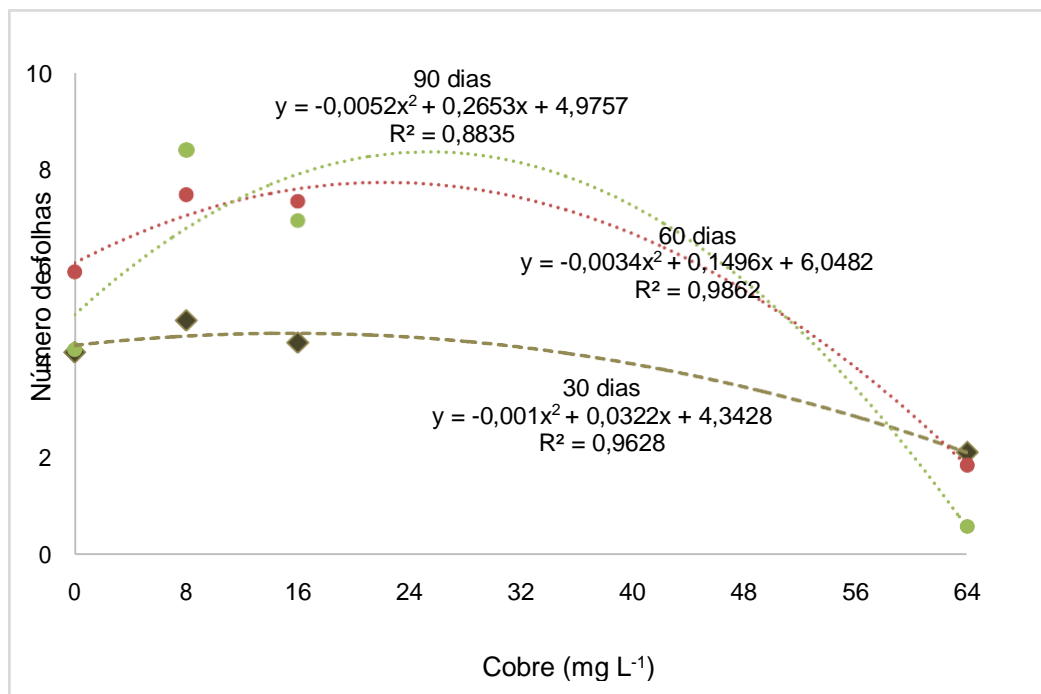
4.1.3 Número de folhas

Para o número de folhas também foi observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de cobre ($p=0,000$) e período de cultivo ($p=0,0000$), e interação significativa entre eles ($p=0,001$). O IV da variável foi de

7,08%. O desenvolvimento de folhas em brotações de canafístula apresentou comportamento quadrático para todos os períodos de avaliação (Figura 10), observando-se um aumento inicial quando a concentração passa de 0,025 para 8 mg L⁻¹ e, a seguir, uma redução.

Aos 30 dias de cultivo a MET seria de 15,42 mg L⁻¹; aos 60 dias, de 20,98 mg L⁻¹, e aos 90 dias, de 25,39 mg L⁻¹ de cobre. O ponto em que as concentrações de cobre promoveram uma redução nas folhas foi diferente dependendo do período de cultivo avaliado; aos 30 dias de cultivo esse ponto é aos 8 mg L⁻¹ enquanto aos 60 e 90 dias é aos 16 mg L⁻¹ (Figura 10), o que indica que a tolerância ao metal vai aumentando ao longo do cultivo até certo ponto. Da mesma maneira, as médias de número de folhas foram diferencialmente afetadas pelas concentrações de cobre e período de cultivo.

Figura 5 – Número de folhas em brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



4.1.4 Número de brotos

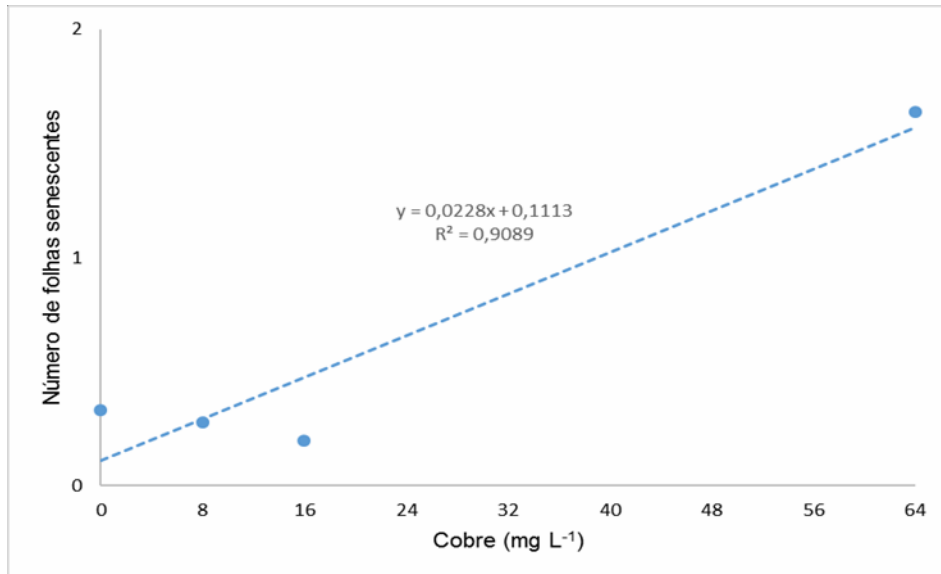
Para a variável número de brotos não houve efeito significativo dos fatores testados e nem da interação entre os mesmos (IV=4,67%), observando-se uma baixa média geral (0,23) de brotos por explante. Isso demonstra que a formação de brotos não é afetada pelo cobre. É possível que o número de brotos possa ser incrementado pela adição de citocininas ao meio nutritivo, a exemplo do que foi observado por PAIM (2014), que obteve 2,31 brotos com o emprego de 2,5 μM de 6-Benzilaminopurina e 2,5 brotos, em média, com a suplementação de 10 μM de Thidiazuron ao meio nutritivo WPM.

4.1.5 Número de folhas senescentes

Para o número de folhas senescentes foi observado efeito significativo apenas do fator principal concentração de cobre ($p=0,0000$). O IV da variável foi de 9,72%. Observa-se, na Figura 6, que aos 8 e aos 16 mg L^{-1} ocorreu uma redução na senescência, comparativamente aos 0,025 mg L^{-1} , e, na máxima concentração testada (64 mg L^{-1}), um aumento. Os resultados indicam, novamente, que a espécie se beneficia do aumento de cobre nas concentrações intermediárias, mas que 64 mg L^{-1} é tóxico.

Para essa variável ocorreu um ajuste linear crescente na análise de regressão, em que um aumento muito grande na concentração de cobre (de 2.560 vezes) promoveu um aumento proporcionalmente muito pequeno no número de folhas senescentes (de 9 vezes), observando-se média de 0,2 folhas na concentração padrão (0,025 mg L^{-1}) e de 1,8 folhas a 64 mg L^{-1} (Figura 6). Isso reforça a tese de que a espécie em estudo apresenta tolerância ao excesso de cobre.

Figura 6 – Número de folhas senescentes em brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre ((0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), independentemente do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

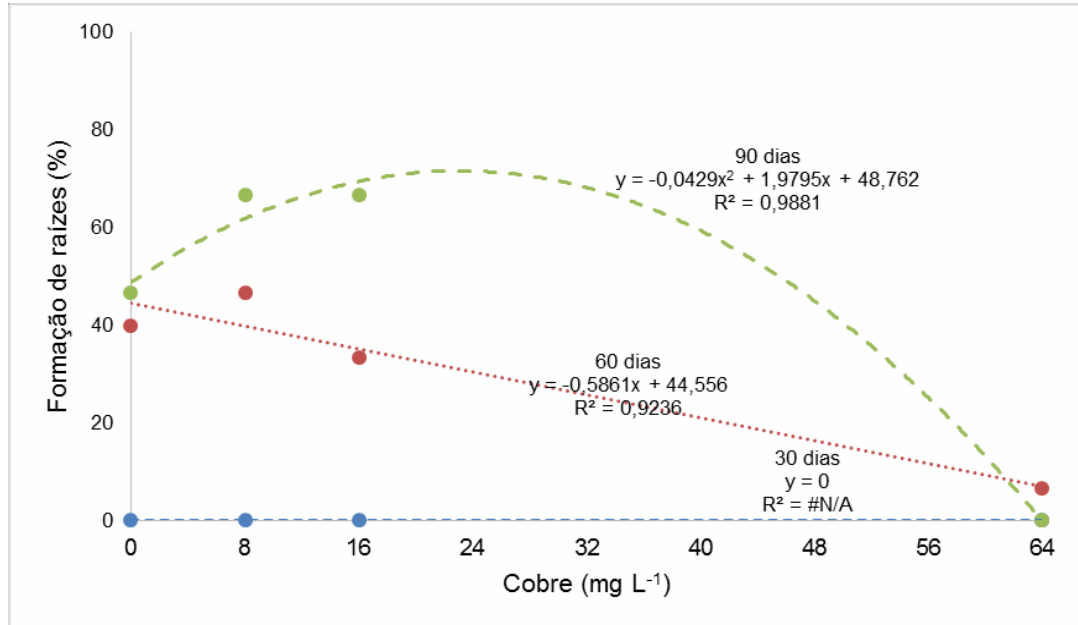


4.1.6 Formação de raízes

Para a porcentagem de formação de raízes foi observado efeito significativo dos dois fatores principais, concentrações de cobre ($p= 0,000$) e período de cultivo ($p=0,000$), assim como também para a interação entre os dois fatores ($p=0,0075$). O IV da variável foi de 4,28%.

Aos 30 dias não foi observada a formação de raízes nas brotações de canafístula, e, portanto, não foi possível ajustar uma equação de regressão (Figura 7). Já aos 60 dias de cultivo, aos 8 mg L⁻¹ houve aumento na rizogênese em relação à concentração padrão de cobre (46,66% versus 40%), e, a partir daí, redução na média de formação de raízes, sendo ajusta uma curva linear decrescente (Figura 7). Essa tendência também foi observada aos 90 dias de cultivo (Figura 7), porém, neste caso, até a concentração 16 mg L⁻¹ houve aumento na rizogênese (de 46,66% a 0,025 mg L⁻¹ para 66,66% a 16 mg L⁻¹), decrescendo a partir daí pelo excesso de cobre. Isso indica que a concentração de cobre, dependendo do período de cultivo, exerce um menor ou maior impacto sobre a rizogênese. Estes resultados ratificam os resultados apresentados para as variáveis anteriores, e, também, a respeito da tolerância da espécie ao excesso de cobre.

Figura 7 - Porcentagem média de formação de raízes *in vitro* em brotações de canafístula (*Peltophorum dubium*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



4.2 ESTUDO 1 – AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE NO CULTIVO *IN VITRO* EM *HANDROANTHUS CHRYSOTRICHUS*

4.2.1 Sobrevivência *in vitro*

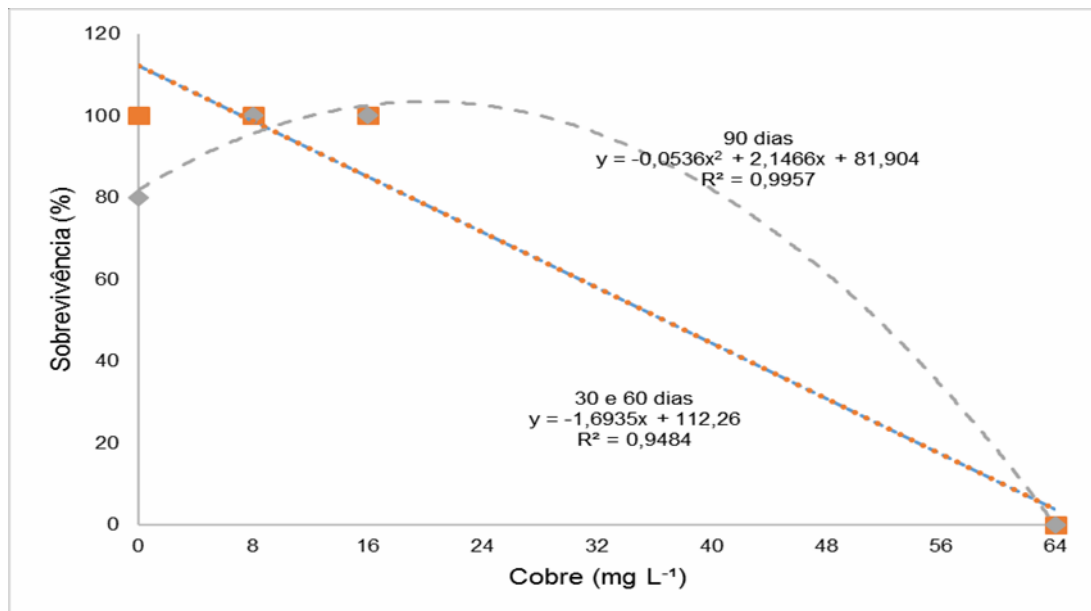
Para a variável sobrevivência foi observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de cobre ($p=0,000$) e período de cultivo ($p=0,0000$), sendo observada interação significativa entre eles ($p= 0,001$). O IV da variável foi de 1,78%.

Tanto aos 30 como aos 60 dias de cultivo, foi observado o mesmo comportamento para a sobrevivência *in vitro* das brotações (Figura 8), obtendo-se um ajuste linear decrescente, indicando que, com o aumento nas concentrações de cobre houve nítida redução nas porcentagens médias de sobrevivência.

Já aos 90 dias de cultivo *in vitro* observou-se um ajuste quadrático (Figura 8), sendo que a MET seria obtida a 17,32 mg L⁻¹ de cobre. Nesse período, foi observado que, a partir de 16 mg L⁻¹ de cobre, há elevada redução nas porcentagens médias de sobrevivência das brotações de ipê-amarelo. Esse resultado

está de acordo com registros anteriores para o cultivo *in vitro* dessa espécie, com 100% de sobrevivência após 30 dias de cultivo *in vitro* de segmentos nodais, porém em meio nutritivo WPM (PAIM, 2014). Já aos 60 e 90 dias de cultivo houve o ajuste a uma equação linear, em que a sobrevivência reduziu à medida em que a concentração de cobre aumentou, principalmente aos 90 dias.

Figura 8 – Porcentagem média de sobrevivência *in vitro* de brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



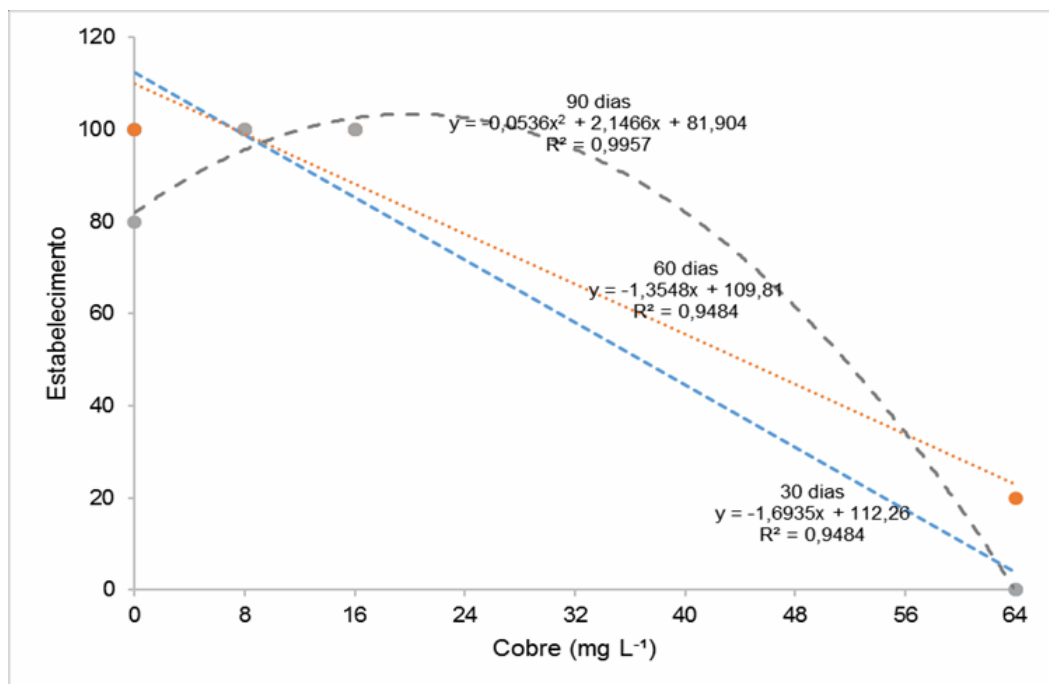
4.2.2 Estabelecimento *in vitro*

Para a variável estabelecimento foi também observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de cobre ($p=0,000$) e período de cultivo ($p=0,0095$), e interação significativa entre eles ($p=0,001$). O IV da variável foi de 1,78%.

Assim como para a sobrevivência, para o estabelecimento *in vitro* também foi observado um ajuste linear decrescente aos 30 e 60 dias de cultivo e um comportamento quadrático aos 90 dias (Figura 9), com um aumento inicial no estabelecimento na concentração 8 mg L⁻¹, estabilização a 16 mg L⁻¹, seguida de drástica redução a 64 mg L⁻¹. A MET seria obtida a 16,01 mg L⁻¹ de cobre. Da mesma

maneira como observado nos resultados anteriores, aos 90 dias o aumento na concentração de cobre promoveu inicialmente benefícios para a retomada do crescimento e, após, diminuição nas porcentagens de estabelecimento *in vitro* de brotações de ipêem função da concentração do metal no meio nutritivo.

Figura 9 - Porcentagem de estabelecimento *in vitro* de brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

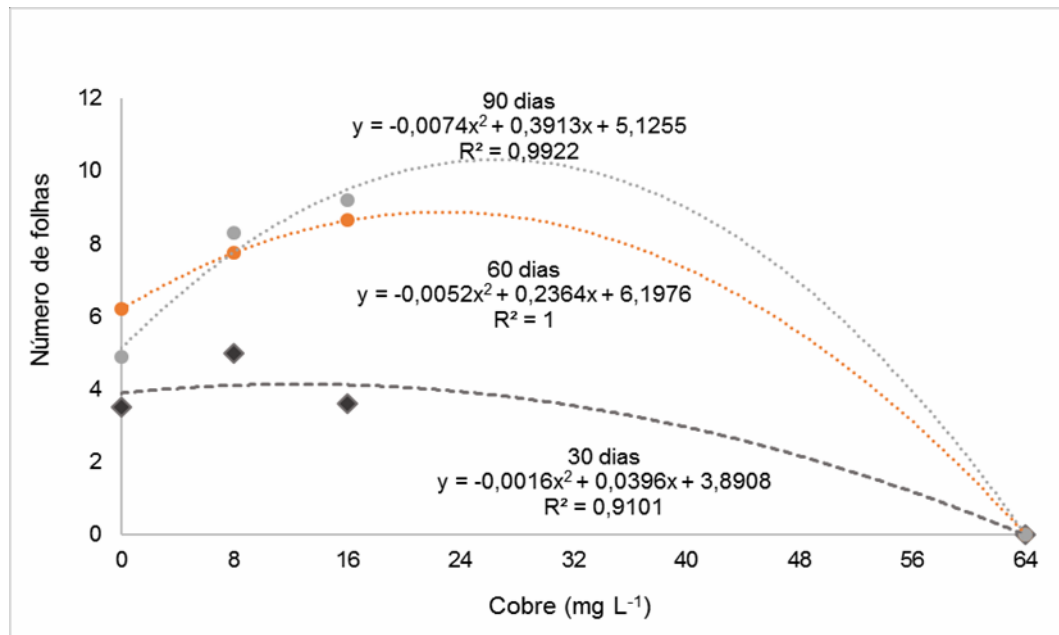


4.2.3 Número de folhas

Para o número de folhas foi igualmente observado efeito significativo de ambos os fatores principais, concentrações de cobre ($p=0,000$) e período de cultivo ($p=0,0000$), e da interação entre eles ($p=0,000$). O IV da variável foi de 5,66%.

O desenvolvimento de folhas em brotações de ipê-amarelo, assim como observado para canafístula, apresentou comportamento quadrático em todos os períodos de avaliação (Figura 10), registrando aumento na média até 8 (aos 90 dias) ou 16 mg L⁻¹ (aos 30 e aos 60 dias de cultivo) e redução a partir daí. Aos 30 dias a MET seria de 15,42 mg L⁻¹ de cobre; aos 60 dias, de 20,98 mg L⁻¹ de cobre, e aos 90 dias, de 25,39 mg L⁻¹ de cobre.

Figura 10 - Número de folhas em brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

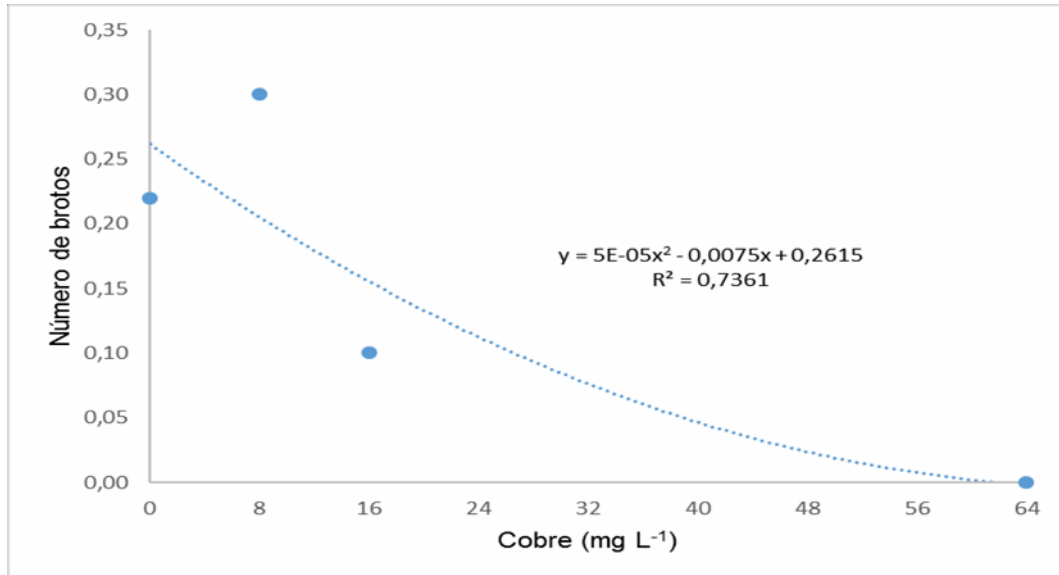


4.2.4 Número de brotos

Para o número de brotos foi observado efeito significativo apenas do fator principal concentração de cobre ($p=0,0000$). O IV da variável foi de 7,29%.

Novamente foi observado um incremento na média com o aumento de 0,025 mg L⁻¹ para 8 mg L⁻¹ de CuSO₄ e, a seguir, uma redução, demonstrando que, para essa variável, as doses 16 e 64 mg L⁻¹ de CuSO₄ são excessivas e promovem efeito tóxico (Figura 11). Houve o ajuste a uma curva quadrática, em que a MET seria obtida a 7,36 mg L⁻¹ de CuSO₄.

Figura 11 - Número de brotos em explantes de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), independentemente do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

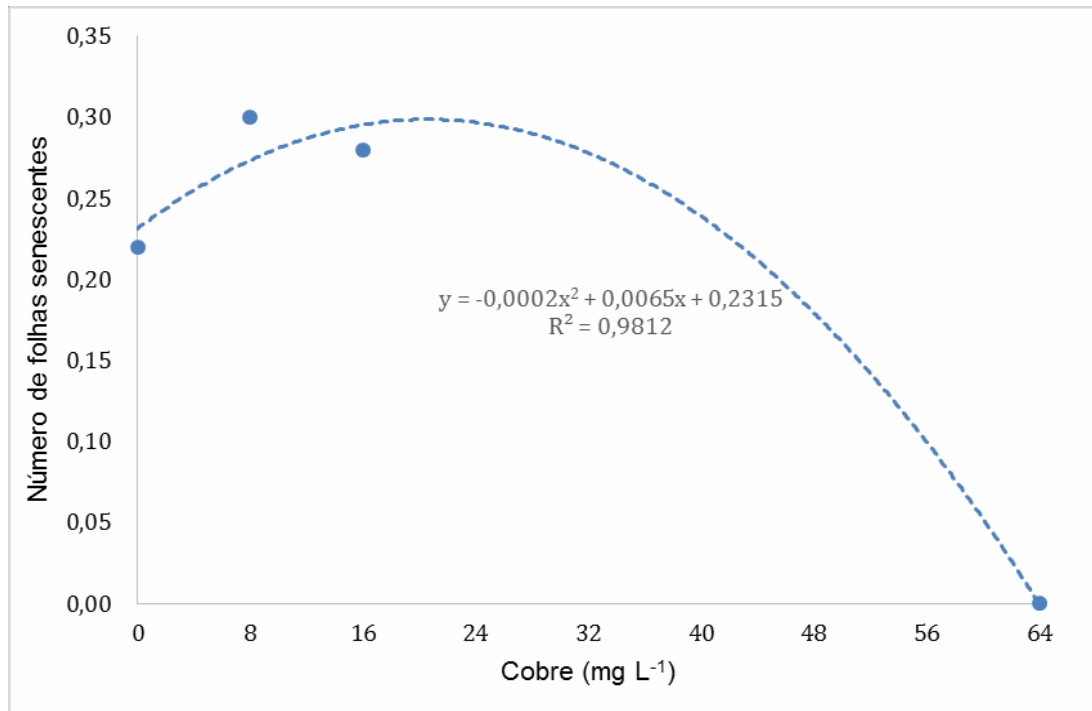


4.2.5 Número de folhas senescentes

Para o número de folhas senescentes foi observado efeito significativo apenas dos dois fatores principais, concentrações de cobre ($p=0,0072$) e período de cultivo ($p=0,0016$). O IV da variável foi de 9,26%.

Como demonstrado na Figura 12, pode-se observar o mesmo comportamento das variáveis supramencionadas, havendo um aumento inicial de 0,025 para 8 mg L⁻¹ e, a partir daí, uma redução no número de folhas senescentes nas brotações de ipê-amarelo. Entretanto, de maneira geral, pode-se considerar que houve baixa formação de folhas senescentes, médias bem inferiores a 1 folha senescente por explante. Para as concentrações de cobre foi verificado um ajuste quadrático, em que a MET ocorreria a 5,61 mg L⁻¹ de CUSO₄.

Figura 12 - Número de folhas senescentes em brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹), independentemente do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



Em relação aos períodos de cultivo, pode-se observar (Tabela 2) que aos 30 dias houve o menor número de folhas senescentes quando comparado aos demais períodos avaliados. No entanto, de modo geral, houve pouca influência do tempo de cultivo na formação de folhas senescentes, observando-se médias bem inferiores a 1 folha senescente por explante.

Tabela 2 – Médias referentes ao número de folhas senescentes em brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas *in vitro*, em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias), independentemente das concentrações de cobre testadas. Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

Período de cultivo (dias)	Nº de folhas senescentes
30	0,0625 a
60	0,1750b
90	0,3625b
Média Geral	0,2000

Em um experimento realizado durante 186 dias de cultivo *in vitro* com ipê-amarelo, em meio WPM, na ausência de fitorreguladores e utilizando a concentração padrão de cobre, no qual não foram efetuados nem subcultivos nem transferências para meio nutritivo fresco, configurando uma situação de estresse nutricional e hídrico, foi observado que somente aos 40 dias foi possível obter uma média superior a uma folha senescente por explante, sendo que aos 90 dias a média foi de cerca de 4 folhas senescentes (PAIM, 2014). Mesmo considerando que os resultados provêm de experimentos de natureza diferente, sinalizam que a espécie em questão apresenta relativa tolerância a esses estresses.

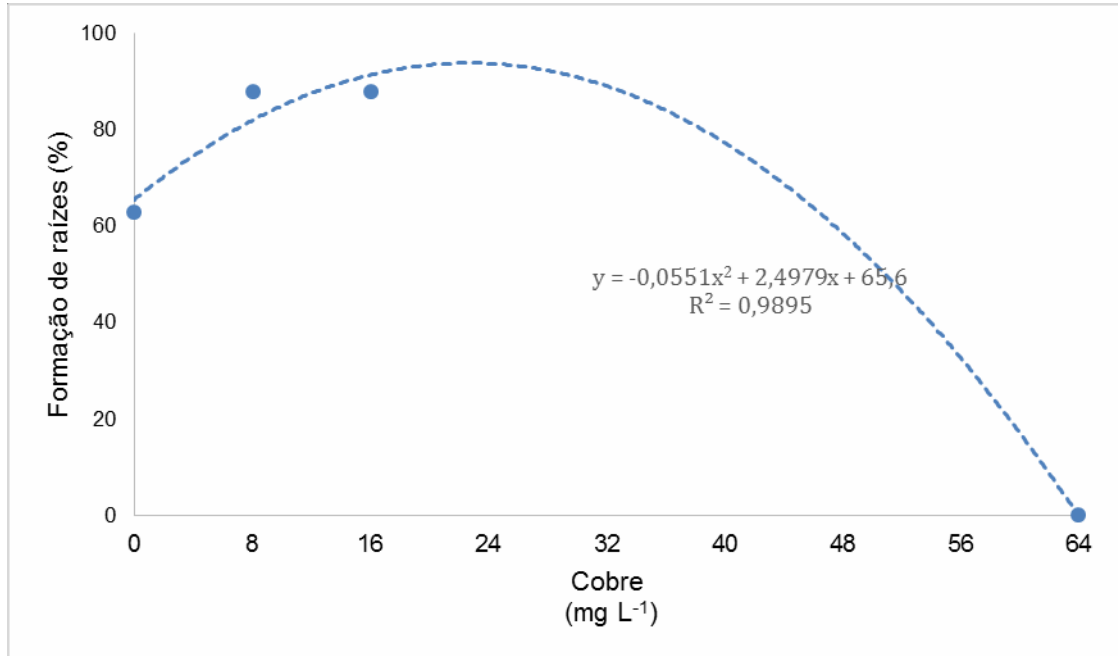
4.2.6 Formação de raízes

Para a porcentagem de formação de raízes foi observado efeito significativo apenas do do fator principal, concentrações de cobre ($p= 0,000$). O IV da variável foi de 4,28%.

Em relação ao cobre (Figura 13), se observou o mesmo comportamento registrado nas outras variáveis: um aumento na média com o aumento da concentração padrão ($0,025 \text{ mg L}^{-1}$) para 8 mg L^{-1} e uma redução a seguir, sendo que na concentração máxima testada, não houve rizogênese, sugerindo ser esta tóxica para ipê-amarelo. Isso está de acordo com a afirmação de que a toxidez de cobre nas raízes das plantas arbóreas se expressa, sobretudo, na ausência de formação de raízes ou em seu escurecimento quando se formam, tornando-as finas e quebradiças, diminuindo a capacidade da planta de absorver nutrientes (KAHLE, 1993).

No cultivo *in vitro* de segmentos nodais sem a realização de subcultivo, porém em meio WPM sem fitorreguladores, foi observada média superior a 70% de rizogênese após 40 dias de cultivo (PAIM, 2014).

Figura 13 - Porcentagem média de formação raízes *in vitro* em brotações de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) cultivadas em meio nutritivo MS acrescido das diferentes concentrações de cobre (0,025; 8; 16 ou 64 mg L⁻¹) em função do período de cultivo (30, 60 ou 90 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



4.3 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À COBRE DAS ESPÉCIES FLORESTAIS ARBÓREAS CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

4.3.1 *Handroanthus chrysotrichus*

Para o ipê-amarelo, as variáveis altura de planta, diâmetro do colo e frequência de plantas com sinais de amarelecimento (FPSA) apresentaram efeito significativo do período de cultivo, conforme pode ser observado na Tabela 3, indicando que o cobre não influenciou nenhuma delas. Para todas essas variáveis houve um incremento nas médias no decorrer do cultivo, obtendo-se a melhor resposta para altura e diâmetro aos 60 dias, já para FPSA o melhor desempenho foi verificado aos 30 dias. Os resultados para altura e diâmetro estão de acordo com as expectativas de crescimento, enquanto o amarelecimento observado pode ser indicativo de estresse abiótico.

Tabela 3 - Médias referentes à altura de planta, diâmetro de colo e frequência de plantas com sinais de amarelecimento (FPSA) em plantas de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) em função do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

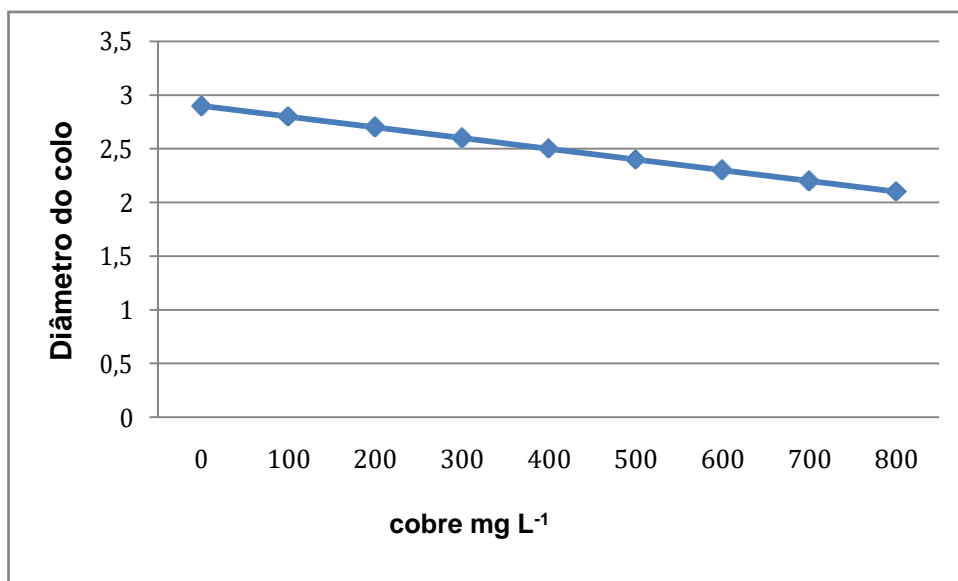
Tempo (dias)	Altura de planta (cm)	Diâmetro de colo (mm)	FPSA ⁺
30	5,52b	1,84b	0,52 ^a
60	6,06a	2,98a	0,85b

Valores seguidos por letras diferentes são distintos pelo teste F a 5%.

⁺ Frequência de plantas ($0 < x < 1$) com sinais de senescência

Por sua vez, o diâmetro do colo apresentou efeito significativo também das concentrações de cobre, conforme pode ser observado na Figura 14. Para essa variável observou-se comportamento linear, sendo que com o aumento nas concentrações de cobre houve decréscimo no diâmetro do colo das plantas (Figura 14). Esse resultado indica que as concentrações de cobre testadas foram excessivas e prejudicaram o desenvolvimento das plantas de ipê-amarelo

Figura 14 - Diâmetro do colo de plantas de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*), mantidas em casa de vegetação, em função das diferentes concentrações de cobre (0; 100; 200; 400 ou 800 mg L⁻¹) independentemente do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

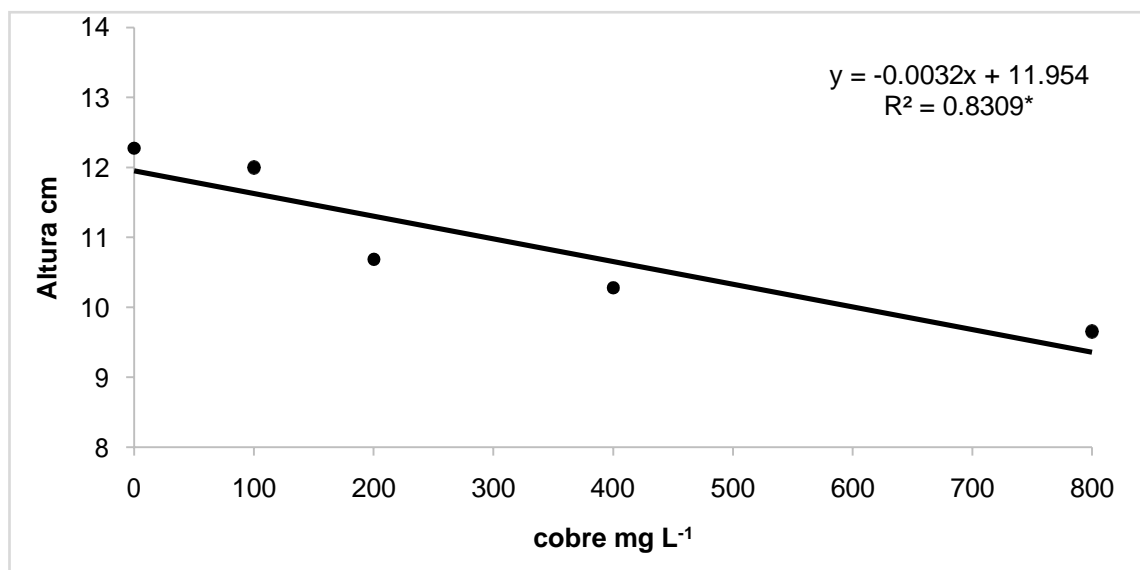


Já para o número de folhas, não foi observado efeito significativo dos fatores testados e tampouco da interação entre eles, obtendo-se uma média geral elevada de 8,4 folhas por planta. Isso sugere que, para essa variável, nem o período de cultivo nem o cobre adicionado exerceram influência sobre o desenvolvimento das plantas.

4.3.2 *Peltophorum dubium*

Em relação à canafístula, para a variável altura de planta houve efeito significativo apenas dos fatores principais (concentrações de cobre e período de cultivo). Para o fator concentrações de cobre, pode-se observar comportamento linear decrescente, em que, com o aumento nas concentrações de cobre no solo diminuiu o crescimento em altura das plantas (Figura 15), demonstrando que o cobre adicionado ao solo afetou o crescimento das plantas de canafístula. Resultados opostos a este foram relatados para *Cedrelafissilis* (MARQUES et al., 2000), que foi pouco influenciada pelos metais do solo, chegando, o seu crescimento, a ser, inclusive, estimulado pelos níveis de contaminação.

Figura 15 - Altura média (cm) de plantas de canafístula (*Peltophorum dubium*), mantidas em casa de vegetação, em função das diferentes concentrações de cobre (0; 100; 200; 400 ou 800 mg L⁻¹) independentemente do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.



Em relação ao período de cultivo, a maior média foi observada aos 60 dias (Tabela 4), estando de acordo com as expectativas de crescimento vegetal.

Tabela 4 - Médias referentes à altura de planta, diâmetro de colo, número de folhas e frequência de plantas com sinais de amarelecimento (FPSA) em plantas de canafístula (*Peltophorum dubium*) em função do período de cultivo (30 ou 60 dias). Santa Maria, RS, UFSM, 2016/2017.

Tempo (dias)	Altura de planta (cm)	Diâmetro de colo (mm)	Número de folhas	FPSA ⁺
30	10,10b	2,30b	7,98b	0,05 ^a
60	11,86a	3,30a	9,28a	0,55b

Valores seguidos por letras diferentes são distintos pelo teste F a 5%.

⁺ Frequência de plantas ($0 < x < 1$) com sinais de senescência

Para diâmetro do colo, número de folhas e FPSA foi observado efeito significativo apenas do período de cultivo, obtendo-se as maiores médias aos 60 dias (Tabela 4). Para as três primeiras variáveis, os resultados estão de acordo com as expectativas de crescimento vegetal. Já o aumento na média de FPSA denota ter havido estresse abiótico.

5 CONCLUSÃO

De uma maneira geral, nos estudos de cultivo *in vitro* realizados, as espécies demonstram se beneficiar pelo aumento na concentração de cobre até 8 ou 16 mg L⁻¹, de maneira diferenciada em função do período de cultivo. Isso poderá repercutir favoravelmente na otimização dos protocolos de micropropagação das duas espécies florestais. Igualmente, as culturas *in vitro* das duas espécies demonstram tolerância ao cobre, mas foram prejudicadas pelo aumento para 64 mgL⁻¹ de CuSO₄, que é excessivo.

Nos estudos de cultivo em casa de vegetação, apenas as variáveis de crescimento: diâmetro do colo, em ipê-amarelo, e altura de planta, em canafístula são significativamente afetadas pela adição de cobre aos teores nativos do metal no solo.

6 REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos de ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p.299-352.
- ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. 2ed. Glasgow: Blackie Academic, 1995. 365p.
- ANDRADE, J. C. M; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007. 176p.
- ANSELMO, A. L. F.; JONES, C. M. Fitorremediação de solos contaminados, Porto Alegre, RS, 2005. In: **XXV ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA E PRODUÇÃO PORTO ALEGRE, RS**.Rio Grande do Sul 2005 ENGEp p 5253 -5280.
- BAKER, A.J.M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals.**JournalPlantNutrition**, New York, v.3, n.1/4, p.643-654, 1981
- BAKER, A. J. M. Metal tolerance.**New Phytology**, v.106, n.1, p.93-111, 1987.
- BRAY, E. A., BAILEY-SERRES, J.;WERETILNYK, E. Responses toabioticstresses. In:B.B.BUCHANAN, GRUISSEN,W.&JONES.,R.L (eds.). **Biochemistry; Molecular Biology of plants**.American Society of Plant Physiologists, New York, 2000, p.1158-1203.
- CAIRES, S. M. et al. Tolerância de mudas de espécies arbóreas nativas em solo contaminado com metais pesados, Recife, PE, 2005 In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO – SOLOS, SUSTENTABILIDADE E QUALIDADE AMBIENTAL, 30.,2005, Recife, PE. **Resumos...** Recife, 2005. CD-ROM.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies nativas para fins produtivos. In: CARVALHO, P. E. R.(ed.) **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: EMBRAPA: CNPF, 1998.p.103-125.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. v.2. 627p.
- CHAIGNON, V.; HINSINGER, P.A. Biotest for evaluating for bioavailability to plants in a contaminated soil.**JournalofEnvironmentQuality**, v.32, p.824-33, 2003.
- CETESB.**Qualidade do ar no estado de São Paulo 2012** / CETESB. - São Paulo : CETESB, 2013.

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S.. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Cienc. Rural** [online]. 2014, vol.44, n.2, pp.314-320. ISSN 1678-4596. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000200019>. Acesso em

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B.; **Recomposição de Matas Ciliares: Orientações Básicas**. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/ciliar/sp/recomp>; 1990. Acesso em

DONADIO, N. M. M.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e jacarandá-da-bahia (*Dalbergianigra* (Vell.) Fr.All. exBenth.). FABACEAE. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p.64-73, 2000.

ESTRADA-LUNA, A. A., DAVIES, J. R. F. T.; EGILLA, J. N. Physiological changes and growth of micropropagated chilean chopepper plantlets during acclimatization and postacclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** n.66, p.17-24. 2001.

FERNANDES, M.L. **Nutrição Mineral de Plantas**. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Viçosa. 2006.

FERREIRA, D.F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. 2000. <http://www.dex.ufla.br/~danielff/sisvarmanual.pdf>. Acesso em

GAYLARDE, C. C., BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação – aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de aerobióticos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v. edição especial, n. 34, p. 36-43, 2005.

GHOSH, M., SINGH, S. P. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. **Asian Journal on Energy and Environment**, v. 6, n. 4, p. 214-231. 2005.

GRATÃO, P. L., PRASAD, M. N. V., CARDOSO, P. F., LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 7: 53-64.

HALLWELL, B. GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Clarendon Press: Oxford, 1989. 704p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 315p.

KABATA-PENDIAS, A.,; H. PENDIAS. **Trace elements in soils and plants**. CRC Press, Boca Raton, FL. 1992.

KHAN, A. G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, v.41, n.1-2, p.197-207, 2000.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2004. 531p

LÓPES-MOSQUEIRA, M. E.; MOIRÓN, CARRAL, E. Use of dairy-industry sludge as fertilizer for grasslands in northwest Spain: heavy metal level in the soil and plant. **Resource, Conservation and Recycling**, v.30, n2 p.95-109,2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v.2, 368p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v.1. 368p.

MAZEN, A. M. A. Accumulation of four metals in tissues of *Corchorus olitorius* and possible mechanisms of their tolerance. **Biologia Plantarum**, v.48, n.2, p.267-272,2004.

MACNAIR, M. R.; TILSTONE, G. H.; SMITH, S. E. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: TERRY, N.; BANUELOS, G. **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Florida: CRC Press, 2000.p. 235-250.

MACKIE, K. A.; MÜLLER, T.; KANDELER, E. Remediation of copper in vineyards - Amini review. **Journals Environmental Pollution**, California, v. 167, p. 16-26. 2012.

MULGREW, A.; WILLIAMS, P. **Biomonitoring of air quality using plants**: Lichens. Air hygienereport 10, Berlin: 2000. Disponível em: www.umweltbundesamt.de/whocc/AHR10/content2.htm. Acesso em

MARIANO, D. C.; OKUMURA, R. S., Aspectos agronômicos, uso pelo homem e mecanismos da fitorremediação: uma revisão. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v.5, n. edição especial, p. 85-101, 2012.

MARQUES, Marcia; AGUIAR, Christiane Rosas Chafim and SILVA, Jonatas José Luiz Soares da. **Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados**. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* [online]. 2011, vol.35, n.1, pp.1-11. ISSN 1806-9657. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000100001>. Acesso em

MELO, G. M. P.; MELO, V. P.; MELO, W. J. **Metais pesados no ambiente decorrente da aplicação de lodo de esgoto em solo agrícola**. Ministério do Meio Ambiente. 2004. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/CB5F6214/LODOMETAL.pdf>>. Acesso em

MURASHIGE T; SKOOG F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiol. Plant.* 15:473-97, 1962.

MURPHY, A. M. ;COLUCCI, P. E., A tropical forage solution to poor quality ruminant diets: A review of *Lablab purpureus*. **Livest. Res. Rural Dev.**, 11 (2): 112,1999.

NACHTIGALL, G. R.; *NOGUEIRO*, R. C.; ALLEONI, L. R. F. Formas de cobre em solos de vinhedos em função do pH e da adição de cama-de-frango. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.3, p.427-434, mar. 2007

MOÇO, S. S. S. - **Impregnação de fibras de celulose com nanopartículas de prata, óxido de zinco e óxido de cobre para aplicações antibacterianas**. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

MORAES, R. Uma tempestade de luz: a compreensão possibilitada pela análise textual discursiva. **Ciência; Educação**, v.9, n. 2, p.191-211, 2003

NOGUEIROL, R. C.; NACHTIGALL, G. R.; ALLEONI, L. R. F. Distribuição dos teores de cobre em profundidade em diferentes tipos de solos com vinhedos no Rio Grande do Sul. Recife, PE, 2005 In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO – SOLOS, SUSTENTABILIDADE E QUALIDADE AMBIENTAL, 30., 2005, Recife, PE. **Resumos...**Recife, 2005.CD-ROM.

OBRADOR, A.; RICO, M.I.; ALVAREZ, J.M Metal mobility and potential bioavailability in organic matter-rich soil-sludge mixtures: effect of soil type and contact time. **The Science of the Total Environment**, v.206, n.1-2, p.117-126, 1997.

OLIVEIRA, D. L.; ROCHA, C.; MOREIRA, P. C. LAUDARES, S. O. Plantas nativas do cerrado: uma alternativa para fitorremediação. **Revista Estudos**, Goiânia, v. 36, n. 11-12, p.1141-1159, 2009.

OLIVEIRA, L. M. **Potencial de samambaias para fitorremediação de arsênio**. 2012. 105f. Tese (Doutorado em Ciência do solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PAIM, A. F. **Cultivo in vitro e análise da anatomia foliar de *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC.) J. Mattos**. 2014. 60f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 40p.

PAIVA, H. N. et al. Influência de doses crescentes de chumbo sobre o teor e o conteúdo de nutrientes e Pb em mudas de Ipê-Roxo (*Tabebuia impetiginosa*(Mart.) Standl.). **Revista Árvore**,v.27, n.1, p.151-158, 2003.

PICKENS, A. K., WOLF, J., AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, n.42, p.348-353, 2006.

PRALON, A. Z.; MARTINS, M. A. Utilização do resíduo industrial Ferkal na produção de mudas de *Mimosa caesalpinifolia*, em estéril de extração de argila, inoculadas com fungos micorrízicosarbusculares e rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, n.1, p.55-63. 2001.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review Plant Biology**, v. 56, p. 15-39, 2005.

SANTOS, C. F.; NOVAK, E. Plantas nativas do cerrado e possibilidades em fitorremediação. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 7, n. 1, p. 67-77, 2013.

SERAFINI, L. A., BARROS, N. M., AZEVEDO, J.L.; **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**, Livraria e editora Agropecuária, 2001, Guaíba, RS.

SILVA, A.C., VIDAL, M.; PEREIRA, M.G. Impactos ambientais causados pela mineração e beneficiamento de caulim. **Revista Escola de Minas**, n.54, p.64-72. 2001.

SILVA, R. F., LUPATINI, M. e ANTONIOLLI, Z. I. COMPORTAMENTO DE *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadeniarigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 103-110, jan.-mar., 2011

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeiras de Santa Catarina**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 1978. 320p.

RIZZINI, C.T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. *In Anais do III Simpósio sobre cerrado* (M.G. FERRI, coord.). Editora Edgard Blücher, São Paulo, p.61-64, 1971.

SANTOS JÚNIOR, A. V. - **Avaliação da sustentabilidade da mineração de cobre e manganês em Carajás (PA) utilizando o método gaia e os indicadores de ecoeficiência**. 2005. 157f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SHEN, H. S. ;SUNDSTOL, F. ; Ni, D. B. Studies on untreated and urea-treated rice straw from three cultivation seasons. 2. Evaluation of straw quality through *in vitro* gas production and *in sacco* degradation measurements. **Anim. FeedSci. Technol.**, 74 (3): 193-212, 1998.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 25p. (Circular técnica, 56).

SOUTO, K. M. **Fitorremediação de solo de várzea contaminado com os herbicidas imazetapir e imazapique**. 2011. 111f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SUN, X. Y. et al. - Copper Tolerance and Biosorption of during Alcoholic Fermentation. **Plosone**, vol. 10, no 6, p. 1-18, 2015.

TORRES, A. C., et al.. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

TIBURTIUS, E. R. L. **Remediação de solos e águas contaminadas por compostos orgânicos voláteis (BTX), utilizando processos fenton e lavagens com biosurfactantes**. 2008. 179f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TURNER, R.G. Heavy metal tolerance in plants. In: RORISON, I. H. (Ed.) **Ecological aspects of the mineral nutrition of plants**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1969. p.399-410.

WILLADINO, L., PEREIRA, J. S.; CÂMARA, T. R. Ajuste de protocolo para micropropagação de variedades selecionadas de acerola. In: Resumos do 17º Congresso Brasileiro de Fruticultura, Pelotas, 2001. Disponível em: http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/propagacao/326.htm. Acesso em

WOOLHOUSE, H. W. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In: LANGE, O.L. et al. (Eds.). **Encyclopedia of plant physiology**. 3.ed. Berlin: Springer, 1983. V.12 p.245-289.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, n.17, p. 145-156, 2005.