

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

**Djavan Antonio Coinaski**

**ECTOMICORRIZAÇÃO E COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE**  
**SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.**  
**CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE**

Frederico Westphalen, RS.  
2019

**Djavan Antonio Coinaski**

**ECTOMICORRIZAÇÃO E COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE  
SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.  
CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ferreira da Silva

Frederico Westphalen, RS.  
2019

Coinaski, Djavan Antonio  
ECTOMICORRIZAÇÃO E COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE  
SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO DE *Ilex paraguariensis* A.  
St.-Hil. CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE /  
Djavan Antonio Coinaski.- 2019.  
111 p.; 30 cm

Orientador: Rodrigo Ferreira da Silva  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós  
Graduação em Agronomia - Agricultura e Ambiente, RS, 2019

1. Erva-mate 2. Metal pesado 3. Ectomicorrizas 4.  
Composto orgânico I. Silva, Rodrigo Ferreira da II. 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.

---

© 2019

Todos os direitos autorais reservados a Djavan Antonio Coinaski. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Linha Sete de Setembro s/n – BR 386, km 40. CEP 98400-000 – Frederico Westphalen, RS, Brasil.

Fone: (55) 9.9936 6668; Endereço eletrônico: djavan\_coinaski@hotmail.com

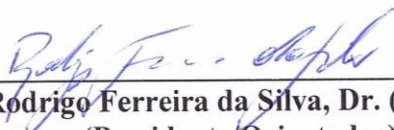
---


Djavan Antonio Coinaski

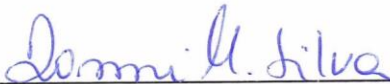
**ECTOMICORRIZAÇÃO E COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE  
SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.  
CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE**

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

Aprovado em 19 de julho de 2019:

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

  
\_\_\_\_\_  
**Fábio Joel Kochem Mallmann, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Danni Maisa da Silva, Dra. (UERGS)**

*Aos meus pais Antonio e Meri  
e à minha irmã Betania  
que sempre torceram e me apoiaram.  
Responsáveis por tudo que sou.*

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar, me manter forte e estar ao meu lado nas horas boas e difíceis.

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

A minha família, meus pais Antonio e Meri, e minha irmã Betania, por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio incondicional e confiança no meu potencial.

A Ana C. Dalberti, pelo incentivo e companheirismo nesta fase da minha vida.

Ao meu orientador, professor e amigo Rodrigo Ferreira da Silva, pela confiança, apoio e orientação neste trabalho.

Ao professor Clóvis O. da Ros pelos ensinamentos, amizade e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Genesio M. da Rosa por disponibilizar infraestrutura que possibilitou a condução dos experimentos. Ao Professor Elder Eloy e Professora Hilda H. Soriani por disponibilizarem equipamentos e laboratórios para avaliações.

Aos membros da banca examinadora, Fábio J. K. Mallmann, Danni M. da Silva e Vanderlei R. da Silva, pela disponibilidade.

Aos técnicos laboratoriais e amigos Andrea da R. Giovenardi, Felipe B. da Luz, Lucindo Somavilla, Marcela de M. Torchelsen e Fernanda Volpatto, pelo auxílio na realização de análises e concessão de equipamentos e materiais.

Aos amigos e colegas do laboratório de microbiologia e biologia do solo que muito contribuíram para a realização deste trabalho: Juliano C. da Silva, Juliano de O. Stumm, Juliano B. Magalhães, Fernanda Devens, Ana P. da Silva, Nicolas L. V. Fin, Claudiane S. Bellocchio, Guilherme Manzano, Victorino M. dos Santos, Daiane S. Andreola, Ricardo Turchetto.

Aos amigos Gerry Rieth, Daniel A. de Borba, Felipe P. Dapper, Nádia Goergen, Marcos A. B. Pires, Jovani de O. Demarco e demais membros do laboratório de física do solo.

Aos amigos que fizeram parte desses momentos, dando apoio e contribuição.

Aos demais professores e funcionários da UFSM-FW.

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

A todos aqueles não citados, mas que contribuíram de uma forma ou de outra e fizeram parte dessa conquista.

**A TODOS, MUITO OBRIGADO!**

*“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda! ”*

(Mário Sergio Cortella)

## RESUMO

### ECTOMICORRIZAÇÃO E COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE

AUTOR: Djavan Antonio Coinaski  
ORIENTADOR: Rodrigo Ferreira da Silva

O cobre (Cu) é um elemento químico considerado essencial para os vegetais, porém, quando em altas concentrações, é um dos principais metais pesados poluentes do solo. O uso de plantas associadas com microrganismos e compostos orgânicos pode promover a redução dos efeitos negativos do contaminante sobre as mesmas. O objetivo geral deste trabalho foi analisar diferentes espécies de fungos ectomicorrízicos e do composto de água residuária de suinocultura no crescimento e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre. Para tal, foram desenvolvidos três trabalhos científicos, sendo que o primeiro trabalho objetivou determinar a influência do uso de fungos ectomicorrízicos no crescimento, tolerância e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre; o segundo trabalho foi avaliar o efeito do composto de água residuária de suinocultura (CARS) no crescimento e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* em solo contaminado com cobre; já no terceiro trabalho objetivou-se determinar a influência do uso de fungos ectomicorrízicos associado ao composto de água residuária de suinocultura no crescimento e acúmulo de cobre em *Ilex paraguariensis* cultivada em solo contaminado com cobre. A inoculação de mudas de *Ilex paraguariensis* com ectomicorrizas UFSC-PT116, UFSC-PT132 e UFSC-SU118 ameniza o efeito de fitotoxicidade provocado pelo excesso de cobre no solo. O isolado ectomicorrízico UFSC-PT116 promove, entre os três testados, o maior crescimento e tolerância de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre. A inoculação de ectomicorrizas em *Ilex paraguariensis* promove menor acúmulo de cobre nas plantas em solos contaminados por este metal pesado. O composto de água residuária de suinocultura (CARS) adicionado ao solo promove aumento do cobre pseudo-total e da fração de cobre adsorvida à matéria orgânica. A proporção média de 30% de composto de água residuária de suinocultura (CARS) no solo proporciona efeito amenizante da toxidez do cobre no solo, favorecendo o crescimento e reduzindo o acúmulo de cobre nas plantas de *Ilex paraguariensis*. O uso de fungos ectomicorrízicos e de CARS amenizam o efeito negativo da dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no crescimento das mudas de *Ilex paraguariensis*. O teor e acúmulo de cobre no tecido vegetal das plantas de *Ilex paraguariensis* são reduzidas quando há associação com o fungo UFSC-PT116 independentemente da adição de CARS no solo.

**Palavras-chave:** Erva-mate. Metal pesado. Ectomicorrizas. Composto orgânico.



## ABSTRACT

### ECTOMICORRIZATION AND SWINE WASTEWATER COMPOST IN THE GROWTH OF *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. CULTIVATED ON SOIL CONTAMINATED WITH COPPER

AUTHOR: Djavan Antonio Coinaski

ADVISOR: Rodrigo Ferreira da Silva

Copper (Cu) is a chemical element considered essential for plants, but when in high concentrations it is one of the main heavy polluting metals in the soil. The use of plants associated with microorganisms and organic compounds can promote the reducing of negative effects of the contaminant on them. The objective of this work was to analyze different species of ectomycorrhizal fungi and swine wastewater compost on copper growth and accumulation in *Ilex paraguariensis* plants grown in copper contaminated soil. To this end, three scientific works were developed, and the first work aimed to determine the influence of the use of ectomycorrhizal fungi on the growth, tolerance and accumulation of copper in *Ilex paraguariensis* plants grown in copper contaminated soil; the second work was to evaluate the effect of swine wastewater compost (CARS) on copper growth and accumulation in *Ilex paraguariensis* plants in copper contaminated soil; the third study aimed to determine the influence of the use of ectomycorrhizal fungi associated with the swine wastewater compound on the growth and accumulation of copper in *Ilex paraguariensis* cultivated in copper contaminated soil. Inoculation of *Ilex paraguariensis* seedlings with ectomycorrhizas UFSC-PT116, UFSC-PT132 and UFSC-SU118 mitigates the phytotoxicity effect caused by excess copper in the soil. The ectomycorrhizal isolate UFSC-PT116 promotes, among the three tested, the highest growth and tolerance of *Ilex paraguariensis* seedlings grown in copper-contaminated soil. The inoculation of ectomycorrhizas in *Ilex paraguariensis* promotes less copper accumulation in plants in soils contaminated by this heavy metal. The swine wastewater compost (CARS) added to the soil increases the pseudo-total copper and the copper fraction adsorbed to organic matter. The average proportion of 30% of swine wastewater compost (CARS) in the soil provides a softening effect of copper toxicity in the soil, favoring growth and reducing the accumulation of copper in *Ilex paraguariensis* plants. The use of ectomycorrhizal fungi and CARS mitigates the negative effect of the 400 mg kg<sup>-1</sup> copper dose on the growth of *Ilex paraguariensis* seedlings. Copper content and accumulation in plant tissue of *Ilex paraguariensis* plants are reduced when associated with the fungus UFSC-PT116 regardless of the addition of CARS in the soil.

**Key-words:** Mate-herb. Heavy metal. Ectomycorrhizae. Organic compost.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1 - Teores pseudo-totais de cobre em função das doses do metal (0, 80, 160, 240, 320, 400 mg kg<sup>-1</sup>) adicionadas ao solo..... 34
- Figura 2 - Altura (A), diâmetro de colo - DC (B), massa seca da parte aérea - MSPA (C), massa seca radicular - MSR (D), área foliar (AF) e área superficial específica de raízes (ASE) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre..... 35
- Figura 3 - Teor de cobre na parte aérea - CuPA (A) e radicular - CuR (B), cobre acumulado na parte aérea - CuAPA (C) e radicular - CuAR (D) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre..... 39
- Figura 4 - Índice de translocação - ITRA (A) e Índice de tolerância - ITOL (B) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre..... 41
- Figura 5 - Fator de bioconcentração (A) e Coeficiente de bioacumulação (B) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre..... 43
- Figura 6 - Taxa de transporte de elétrons (ETR<sub>1500</sub>) (A), Eficiência fotoquímica máxima do PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) (B) e desdobramentos dos efeitos simples significativos dos fatores de variação para o rendimento quântico efetivo do PSII (YII) (C e D) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre..... 45
- Figura 7 - Teor de clorofila total (Chl total) (A) e carotenoides totais (B) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre..... 47
- Figura 8 - Percentual de colonização micorrízica de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre..... 48

### CAPÍTULO II

- Figura 1 - Teores iniciais de cobre pseudo-total no solo (A) e adsorvido à matéria orgânica (B) em função das proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS) aplicadas em solo sem e com adição de 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. O tracejado indica o valor de investigação para áreas agrícolas: 203 mg kg<sup>-1</sup> de Cu (FEPAM, 2014) ..... 62
- Figura 2 - Altura (A), diâmetro de colo - DC (B), número de folhas (C), massa seca da parte aérea - MSPA (D), massa seca radicular - MSR (E) e massa seca total - MST (F) de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo sem e com adição de 400 mg kg<sup>-1</sup>

de cobre e diferentes proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS) .....	64
Figura 3 – Índice de qualidade de Dickson (A), área foliar (B), volume radicular (C), área superficial específica das raízes (D) de mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> cultivadas em solo sem e com adição de 400 mg kg <sup>-1</sup> de cobre e diferentes proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS) .....	67
Figura 4 – Teor de cobre na parte aérea - CuPA (A) e radicular - CuR (B), cobre acumulado na parte aérea - CuAPA (C) e radicular - CuAR (D), cobre acumulado total - CuAT (E) e índice de translocação - ITRA (F) de mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> cultivadas em solo sem e com adição de 400 mg kg <sup>-1</sup> de cobre e diferentes proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS) .....	70

### CAPÍTULO III

Figura 1 – Porcentagem de colonização micorrízica de mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> cultivadas em solo contaminado com 400 mg kg <sup>-1</sup> cobre. Tratamento controle, com inoculação de UFSC-PT116, com inoculação de UFSC-SU118, com adição de composto de água residuária de suinocultura, composto + UFSC-PT116 e composto + UFSC-SU118.....	92
Figura 1 – Índice de crescimento relativo (ICR) da massa seca total de mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> cultivadas em solo contaminado com 400 mg kg <sup>-1</sup> cobre. Tratamento com adição de composto de água residuária de suinocultura, com inoculação de UFSC-PT116, com inoculação de UFSC-SU118, composto + UFSC-PT116 e composto + UFSC-SU118.....	93

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 - Análise química do solo utilizado para a produção das mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	29
--	----

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Teores de nutrientes disponíveis e totais no solo e no composto de água residuária de suinocultura (CARS) utilizado no cultivo de mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	59
--	----

### CAPÍTULO III

Tabela 1 - Teores de nutrientes disponíveis e totais no solo e no composto de água residuária de suinocultura (CARS) utilizado no cultivo de mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	81
Tabela 2 - Altura, diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR), massa seca total (MST), área foliar (AF), área superficial específica de raízes (ASE) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de <i>Ilex paraguariensis</i> , sem e com inoculação dos fungos UFSC-PT116 e UFSC-SU118, sem e com adição de composto de água residuária da suinocultura em solo contaminado com cobre .....	85
Tabela 3 - Cobre na parte aérea (CuPA) e no sistema radicular (CuR), cobre acumulado na parte aérea (CuAPA) e radicular (CuAR), cobre acumulado total (CuAT) e índice de translocação (ITRA) de mudas de <i>Ilex paraguariensis</i> , sem e com inoculação dos fungos UFSC-PT116 e UFSC-SU118, sem e com adição de composto de água residuária de suinocultura em solo contaminado com cobre.....	89

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1 ERVA-MATE ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. -Hil.) .....	18
2.2 COBRE NO SOLO .....	20
2.3 FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS .....	22
2.4 AMENIZANTE ORGÂNICO .....	24
<b>3 CAPÍTULO I - FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS NO CRESCIMENTO, TOLERÂNCIA E ACÚMULO DE COBRE EM MUDAS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE.....</b>	<b>26</b>
3.1 RESUMO.....	26
3.2 ABSTRACT.....	26
3.3 INTRODUÇÃO .....	27
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.4.1 Local .....	29
3.4.2 Delineamento .....	29
3.4.3 Instalação e condução do experimento.....	30
3.4.4 Avaliação morfológica.....	30
3.4.5 Metal no solo e planta .....	31
3.4.6 Parâmetros da fluorescência da clorofila.....	32
3.4.7 Parâmetros da clorofila .....	32
3.4.8 Associação micorrízica.....	33
3.4.9 Análise estatística .....	33
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
3.5.1 Concentração de cobre no solo.....	34
3.5.2 Crescimento das plantas .....	34
3.5.3 Concentração e acúmulo de cobre nas plantas.....	38
3.5.4 Parâmetros da fluorescência da clorofila.....	43
3.5.5 Parâmetros da clorofila .....	46
3.5.6 Percentual de colonização ectomicorrízica .....	48
3.6 CONCLUSÕES .....	49
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

<b>4 CAPÍTULO II - COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE COBRE EM <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.</b>	<b>56</b>
4.1 RESUMO	56
4.2 ABSTRACT	56
4.3 INTRODUÇÃO	57
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	58
<b>4.4.1 Local</b>	<b>58</b>
<b>4.4.2 Delineamento</b>	<b>58</b>
<b>4.4.3 Solo e Composto de água residuária de suinocultura</b>	<b>59</b>
<b>4.4.4 Sementes e Unidade Experimental</b>	<b>59</b>
<b>4.4.5 Instalação e condução do experimento</b>	<b>60</b>
<b>4.4.6 Avaliação morfológica</b>	<b>60</b>
<b>4.4.7 Metal no solo e planta</b>	<b>61</b>
<b>4.4.8 Análise estatística</b>	<b>61</b>
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
<b>4.5.1 Teor de cobre no solo</b>	<b>62</b>
<b>4.5.2 Parâmetros morfológicos das plantas</b>	<b>63</b>
<b>4.5.3 Concentração e acúmulo de cobre nas plantas</b>	<b>68</b>
4.6 CONCLUSÕES	72
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
<b>5 CAPÍTULO III - FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE COBRE EM <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.</b>	<b>77</b>
5.1 RESUMO	77
5.2 ABSTRACT	77
5.3 INTRODUÇÃO	78
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	80
<b>5.4.1 Local</b>	<b>80</b>
<b>5.4.2 Delineamento</b>	<b>80</b>
<b>5.4.3 Solo e Composto de água residuária de suinocultura</b>	<b>80</b>
<b>5.5.4 Fungos micorrízicos</b>	<b>81</b>
<b>5.5.5 Sementes e Unidade Experimental</b>	<b>81</b>
<b>5.5.6 Instalação e condução do experimento</b>	<b>82</b>
<b>5.5.7 Avaliação morfológica</b>	<b>82</b>

5.5.8 Metal na planta.....	83
5.5.9 Associação micorrízica.....	83
5.5.10 Índice de eficiência relativa da massa seca total.....	84
5.5.11 Análise estatística .....	84
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
5.5.1 Parâmetros morfológicos das plantas.....	84
5.5.2 Concentração e acúmulo de cobre nas plantas.....	88
5.5.3 Colonização micorrízica .....	91
5.5.4 Índice de crescimento relativo da massa seca total .....	93
5.6 CONCLUSÕES .....	94
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94
<b>6 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>100</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>102</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cobre (Cu) é um elemento químico considerado essencial para os vegetais (TAIZ et al., 2017), sendo um micronutriente que participa do metabolismo e é parte estrutural de algumas enzimas (GAUTAM et al., 2016). Porém, quando em altas concentrações, o cobre torna-se potencialmente tóxico ao ambiente, sendo um dos principais metais pesados poluentes do solo e águas (ANDREAZZA et al., 2010). A intensificação de atividades industriais, agrícolas, de mineração e de urbanização são as principais causas de contaminação do ambiente por Cu (HLADUN et al., 2015; MACKIE et al., 2012).

As plantas respondem de maneira diferenciada à contaminação do solo com cobre, manifestando necrose nas folhas, desfolhamento precoce, redução no crescimento do sistema radicular, distúrbios fisiológicos e nutricionais (SANTOS et al., 2004; BELLION et al., 2006). O cobre reduz a altura de plantas, massa seca da parte aérea e radicular e área superficial específica de mudas das espécies nativas pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link) e carne-de-vaca (*Pterogyne nitens* Tul) (SILVA et al., 2016). Já para as espécies nativas jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub) e óleo-bálsamo (*Myroxylon peruiferum* L. F.) o teor de clorofila foi reduzido conforme aumento de cobre no solo (MARQUES et al., 2018)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) é uma espécie vegetal nativa da América do Sul, amplamente utilizada nesta região por seu potencial industrial na preparação de bebidas, chás e produtos dermocosméticos (EMBRAPA, 2015). Historicamente, a erva-mate tem sido fundamental para a economia de muitos municípios do Sul do Brasil e, atualmente, é o principal produto não madeireiro do agronegócio florestal na Região Noroeste do RS (EMBRAPA, 2015). A erva-mate torna-se uma alternativa, que além de prevenir possíveis impactos ambientais, permite a ampliação da fonte de renda das famílias rurais com a venda da erva-mate in natura ou processada, desempenhando importância socioeconômica (BERNARDI et al., 2005).

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre fungos do solo e inúmeras plantas vasculares (ANDREAZZA et al., 2011). Os fungos ectomicorrízicos ao se associarem a um hospedeiro provocam deformações em suas raízes, ocorrendo troca de metabólitos e nutrientes entre hospedeiro e fungo (BRUNDRETT et al., 1996). O micélio que se projeta externamente, a partir da raiz colonizada (micorriza), aumenta a área de contato com o solo e permite que maior quantidade de nutrientes e água sejam absorvidos do solo, incrementando seu aporte tanto para o fungo como para a planta (SMITH & READ, 2008).



Além disso, algumas ectomicorrizas podem quelar íons de metais no interior de suas células ou em exsudatos, diminuindo a sua disponibilidade no solo e impedindo que sejam absorvidos pelas raízes, evitando ou reduzindo a contaminação das plantas por esses elementos (TARGHETTA et al., 2013).

A matéria orgânica presente em compostos orgânicos pode promover significativa redução da disponibilidade de metais no solo pelas reações de adsorção e quelação, favorecendo o estabelecimento e desenvolvimento de plantas em locais com altos níveis de contaminação (GABOS et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2012). Inúmeros materiais podem ser utilizados como potenciais amenizantes de toxidez em solos contaminados por metais pesados, havendo destaque para os corretivos de acidez (calcário), fosfatos e materiais orgânicos (SANTOS et al., 2007), como o composto de água residuária de suinocultura (NEGRINI, 2017).

Contudo, é possível que algumas espécies florestais nativas sejam promissoras e apresentem bom potencial na formação de simbiose ectomicorrizica. Nesse sentido, a utilização de fungos ectomicorrízicos e adição de composto de água residuária de suinocultura possibilitam absorção de nutrientes e uma barreira de proteção às raízes, aumentando a tolerância e o crescimento das plantas de erva-mate cultivadas em solo contaminado com cobre.

Para atender esta hipótese, foram desenvolvidos três trabalhos científicos, sendo que no primeiro trabalho objetivou-se determinar a influência do uso de fungos ectomicorrízicos no crescimento, tolerância e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre; no segundo objetivou-se o efeito do composto de água residuária de suinocultura (CARS) no crescimento e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* em solo contaminado com cobre; e no terceiro objetivou-se determinar a influência do uso de fungos ectomicorrízicos associados ao composto de água residuária de suinocultura no crescimento e acúmulo de cobre em *Ilex paraguariensis* cultivada em solo contaminado com cobre. O objetivo geral deste trabalho foi analisar a eficiência de espécies de fungos ectomicorrízicos e do composto de água residuária de suinocultura na tolerância, crescimento e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. -Hil.)

A espécie arbórea *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. pertence à família Aquifoliaceae, da classe das Dicotiledôneas, subclasse Archichlamydes, ordem Celastales, é originária das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, conhecida popularmente como erva-mate, caaguaçu, erva-mate-de-talo-branco, carvalho-branco, orelha de burro, caá, mate, erva, erva-piriquita (VALDUGA et al., 2005; DANIEL, 2009).

A erva-mate uma planta perenifólia, esciófita, seletiva higrófito característica das matas de pinhais podendo atingir até 100 anos de idade (LORENZI, 2000; GREGIANINI & WINGE, 2000;). É uma árvore de crescimento lento a moderado e de altura variável, podendo atingir 25 metros de altura em seu habitat natural, já em cultivo florestal a altura média é de três a cinco metros (PIO-CORRÊA, 1978; CARVALHO, 1994). A *Ilex paraguariensis* é uma espécie dióica, sua floração ocorre dos meses de setembro a dezembro, possui pétalas coloridas para atração de animais, uma vez que sua polinização é realizada por insetos (OLIVA, 2007). A frutificação ocorre de dezembro a abril, possui frutos carnosos, sua coloração muda durante a formação e maturação, indo de verde, vermelho à roxo. (CARVALHO, 2003).

Quanto à morfologia, apresenta ramificação racemosa, copa baixa, densifoliada e folhagem verde-escura (OLIVA, 2007). Suas folhas são simples, alternas, oblongas, estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice, possuem coloração verde escura na face adaxial e verde clara na abaxial, medindo oito a dez centímetros de comprimento e quatro a cinco centímetros de largura, nervuras salientes, já suas bordas são denteadas, especialmente da metade para a extremidade (CARVALHO, 1994; GUPTA, 1995).

A erva-mate possui abrangência de aproximadamente 540.000 km<sup>2</sup>, ocorrendo nos territórios do Brasil, Paraguai e Argentina, situados entre as latitudes 21° e 30 °S e longitudes de 48° 30' e 56° 10' W, com altitudes variando entre 500 e 1.000 m (OLIVA, 2007), podendo ocorrer em regiões situadas fora desses limites, porém de maneira mais esparsa (SAIDELES et al., 2010). No Brasil pode ser encontrada nos estados de Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 1), correspondendo a uma área de 450.000 km<sup>2</sup> coincidindo com as áreas das bacias hidrográficas dos Rios Paraná, Paraguai, Iguazu e Uruguai (OLIVA, 2007; GEHARDT, 2013). A espécie se adapta bem a locais de sombreamento, crescendo principalmente em Floresta Ombrófila Mista de Montana com

ocorrência de *Araucaria angustifolia*, e outras espécies pertencentes principalmente às famílias, Lauraceae, Myrtaceae, Asteraceae e Fabaceae (CARVALHO, 2003).

A erva-mate se desenvolve bem em solos úmidos e bem drenados (MARTINS, 1949; OLIVEIRA & ROTTA, 1985; SAIDELLES et al., 2005), não ocorrendo em solos hidromórficos. É tolerante a solos de baixa fertilidade natural, se desenvolve em solos degradados, e se adapta bem em solos com baixo teor de nutrientes e alto teor de alumínio trocável (MEDRADO et al., 2004). Como a espécie é altamente tolerante ao acúmulo de alumínio em suas folhas, se adapta a solos alíticos (FOSSATI & REISSMANN, 1997). Ainda, se desenvolve bem em solos com valores de pH baixo, contudo, não suporta solos compactados, ou pedregosos, em torno de 80% de seu sistema radicular concentrar-se na camada superficial (MEDRADO et al., 2004). A sua ocorrência é mais frequente em solos de textura média (entre 15 e 35% de argila) e argilosa (acima de 35%) (OLIVEIRA & ROTTA, 1985).

A *Ilex paraguariensis* contém muitos compostos e substâncias que auxiliam na saúde do homem, tais como alcaloides, esteroides e/ou triterpenos, flavonoides, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, além de macronutrientes e micronutrientes (VALDUGA et al., 1997; BRACESCO et al., 2011), além da presença de polifenóis, saponinas, minerais, vitaminas, flavonoides, aminoácidos e metilxantinas. As metilxantinas em maior quantidade são cafeína e teobromina (MAZUR et al., 2014).

Devido a sua grande diversidade de compostos químicos foliares, a espécie também é empregada na produção de medicamentos, produtos de higiene geral e de uso pessoal, insumo para outros alimentos, sendo excelente bactericida, esterilizante e antioxidante, podendo ser usada no tratamento de esgotos e reciclagem do lixo urbano (MACCARI JUNIOR & MAZUCHOWSKI, 2000). A tabela 1 apresenta alguns dos exemplos de derivados tradicionais e potenciais de folhas de erva-mate citados.

Pesquisas científicas comprovam a influência das propriedades da folha de erva-mate no organismo humano, atuando nos sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo, como diurético, antioxidante, eupéptico e colerético, entre outras (GUGLIUCCI, 1996; SCHINELLA et al., 2000). Além dos efeitos terapêuticos, estudos sobre a espécie têm revelado diversas propriedades nutritivas e fisiológicas, conferindo um grande potencial de aproveitamento (VALDUGA, 1995).

A produção mundial de erva-mate está concentrada na Argentina, Brasil e Paraguai (SEAB-PR, 2015). Segundo dados do IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015), a produtividade da erva-mate verde, no ano de 2013, no Brasil foi de 860 mil

toneladas, na Argentina, de 690 mil toneladas e no Paraguai, 85 mil toneladas. Destas 860 mil toneladas produzidos no Brasil, 515 mil toneladas são oriundas de ervateiras plantadas, e os demais 345 mil toneladas obtidas de forma extrativista (IBGE, 2015). O maior produtor de erva-mate plantada foi o Rio Grande do Sul, que produziu 265 mil toneladas de erva-mate, cerca de 52% do total, seguido do Paraná, com 195 mil toneladas, aproximadamente de 38% da produção nacional. No entanto, o Paraná é o maior extrativista de ervais nativo, representando 74% da produção nacional nesta categoria (IBGE, 2015).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2011), a erva-mate foi um dos produtos não madeireiros do extrativismo vegetal que mais se destacaram em 2010 pelo valor da produção, que chegou a 100,5 milhões de reais. Considerando que 99,9% da produção está concentrada na Região Sul, este valor mostra a importância econômica da cultura da erva-mate nesta região.

Entretanto, a exportação de outros produtos de erva-mate, como a erva pronta para o consumo, chá mate ou adicionada de aromatizantes, com maior valor agregado, seguem estável e superior a importação, sendo o Uruguai o principal destino destes produtos (SEAB-PR, 2014). Por não possuir produção própria e ser um grande consumidor do produto, o Uruguai é o principal importador de erva-mate cancheada do Brasil. Outros tipos de mate tem um volume crescente de exportação, para aproximadamente trinta países (SEAB-PR, 2015).

## 2.2 COBRE NO SOLO

O cobre é um elemento químico que ocorre naturalmente no solo, sendo considerado micronutriente, essencial para os vegetais, no entanto, quando presente em elevadas concentrações, pode causar danos ao ambiente e a cadeia alimentar (CHAVES et al., 2010). Conforme Manoj *et al.* (2012) os metais pesados entram na cadeia alimentar e causam distúrbios metabólicos e fisiológicos nos organismos. Por definição, metal pesado refere-se aos elementos químicos que apresentam densidade igual ou maior do que  $6 \text{ g cm}^{-3}$  (CAIRES, 2005; TAIZ et al., 2017; YRUELA, 2013), o cobre (Cu) possui densidade média de  $8,96 \text{ g cm}^{-3}$  (KING, 1996). No caso do cobre, suas formas mais comuns na solução do solo são os quelatos orgânicos solúveis (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1992), sendo considerado um elemento pouco móvel nos solos.

Áreas contaminadas são locais que podem configurar riscos à saúde pública e ao meio ambiente, conforme a resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), sem que haja intervenção, o valor orientador como limite

máximo para o cobre total em áreas agrícolas é de 200 mg kg<sup>-1</sup> (CONAMA,2009). Contudo, a portaria N°85/2014 da Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) indica um valor de referência de qualidade (VQR) de 203 mg kg<sup>-1</sup> para cobre total em solos originados de rochas vulcânicas do planalto do estado do Rio Grande do Sul, classificado de acordo com as províncias geomorfológicas/geológicas (FEPAM, 2014). O aumento do teor de cobre no solo pode ocorrer de forma natural, através do intemperismo de rochas oriundas de material de origem que contenha metais pesados em sua constituição (HUGEN et al., 2013).

A contaminação do solo pelo cobre tem se tornado comum em várias regiões do Rio Grande do Sul. A intensificação das atividades antrópicas vem aumentando a poluição do solo por metais pesados (ANDREAZZA et al., 2010). Atividades antrópicas como o uso de agrotóxicos, fungicidas, irrigação de águas residuárias, industrialização, urbanização, mineração e o uso de resíduos urbanos tem provocado aumento nos níveis deste elemento (MATEOS-NARANJO et al., 2013). As atividades agrícolas e industriais podem aumentar a quantidade de cobre no solo, fato que pode alterar a população de microrganismos, a atividade biológica (LI et al., 2016) e, conseqüentemente, a capacidade produtiva do solo.

De acordo com Andrezza et al. (2013), no estado do Rio Grande do Sul a maioria dos solos contaminados por cobre, estão sob cultivo de vitivinicultura na serra do Nordeste e em áreas de mineração na serra do Sudeste. Aplicações frequentes de fungicidas à base de cobre para o controle de doenças foliares em videiras fazem com que este metal se acumule no solo, principalmente nas camadas superiores do solo (BRUNETTO et al., 2014). Altas concentrações de cobre na biosfera causam redução na qualidade ambiental e vitalidade dos seres vivos, além de alta persistência no ambiente (NAGAJYOTI et al., 2010; ALI et al., 2013; STANKOVIC et al., 2014).

O cobre (Cu) é um elemento químico considerado essencial para as plantas, participando como catalisador de reações bioquímicas no metabolismo de carboidratos e nitrogênio, na síntese de clorofila e na constituição de proteínas em plantas (TAIZ et al., 2017). Ainda que o cobre seja considerado um elemento essencial, em quantidades excessivas podem levar a alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas, como danos às raízes, inibição da absorção de nutrientes e redução das taxas de fotossíntese e crescimento das plantas (MICHAUD et al., 2008; TOSELLI et al., 2009; LEQUEUX et al., 2010; CAMBROLLÉ et al., 2015) além do estresse oxidativo nas plantas, devido ao aumento na produção de radicais livres de oxigênio altamente tóxicos que danificam lipídeos e proteínas da membrana celular, aminoácidos e ácidos nucléicos (THOUNAOJAM et al., 2012; MORAES et al., 2015).

O Cu está associado ao transporte de elétrons entre as membranas durante o processo fotossintético e quando disponível em sua forma livre, produz radicais livres com alta capacidade de oxidação, danifica as membranas celulares (WILLIAMS, 2015). No entanto, os sintomas de toxicidade podem ser observados em várias regiões das raízes causando o encurtamento e engrossamento da raiz e o aumento das raízes laterais (CHEN et al., 2013; ZHANG et al., 2014), refletindo em uma absorção reduzida de nutrientes e água que podem inibir o crescimento das plantas e o aumento da biomassa das raízes e dos ramos (KOPITTKE et al., 2009; TOSELLI et al., 2009).

### 2.3 FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre fungos do solo e inúmeras plantas vasculares (BRUNDRETT et al., 1996). O termo ectomicorriza (ECM) foi proposto na pesquisa realizada pela Universidade Estadual de Oregon, Estados Unidos, por Peyronel et al. (1969), nesta simbiose, as hifas cobrem as radículas, formando uma espécie de manto fora dos espaços intercelulares, mas que se vincula nas células corticais da raiz. Estes autores afirmam que este complexo sistema é denominado “Rede de Hartig”. As estruturas diagnosticadas são: a) manto fúngico; b) Rede de Hartig; e c) micélio externo vegetativo que emerge das raízes.

Registros fósseis indicam que as associações ectomicorrízicas surgiram há pelo menos 50 milhões de anos (COSTA et al., 2003). Segundo os mesmos autores, no Brasil, os levantamentos de ECM são recentes, sugerindo a urgência em se identificar os recursos genéticos disponíveis e o papel da simbiose ectomicorrízica nos ecossistemas do cerrado, nas florestas nativas e nos plantios florestais.

Dentre as inter-relações biológicas estabelecidas no solo, a simbiose entre planta e micro-organismos heterotróficos, como o caso das micorrizas, destaca-se pelos benefícios proporcionados à produção vegetal (SMITH e READ, 2008). As micorrizas são consideradas a simbiose de maior expressão ecológica e econômica entre fungos do solo e raízes de plantas superiores (BRADY & WEIL, 2002), representando alternativa para o estabelecimento de mudas a campo e para a manutenção e estabilidade das florestas (OLIVEIRA et al., 2008). Os fungos ectomicorrízicos (fECM) são importantes agentes estruturadores de comunidades florestais, favorecendo a sucessão e resiliência, especialmente durante períodos de alterações climáticas (SMITH e READ, 2008).

Os fungos ectomicorrízicos possuem destaque pela associação simbiótica mutualística com as espécies vegetais, a qual contribui beneficemente no desenvolvimento das plantas em decorrência da maior proteção das raízes e absorção de nutrientes (PEROTTO & BONFANTE, 1997). Segundo Smith & Read (2008), os fungos ectomicorrízicos trazem benefícios principalmente em situações desfavoráveis à planta hospedeira, como fatores climáticos e edáficos limitantes. São capazes de armazenar metabólitos e nutrientes e funcionam, assim, como um sistema de reserva para situações de escassez nutricional ou crescimento ativo de ambos (SMITH & READ, 2008). As ectomicorrizas contribuem efetivamente para absorção de Ca, K, Mg e micronutrientes pela planta hospedeira em razão do menor diâmetro das hifas, as quais podem explorar pequenos poros inacessíveis às raízes (SILVA et al., 2007).

Durante a formação ectomicorrízica, as raízes sofrem profundas alterações morfológicas e fisiológicas, passando a atuar de forma integrada com o fungo, havendo ganhos de adaptabilidade e sobrevivência destes simbiossiontes (BARKER et al., 1998). Esta associação proporciona aumento da área de contato com o solo, permitindo maior quantidade de nutrientes e água sejam retirados do solo, incrementando seu aporte tanto para o fungo, como para a planta (SMITH & READ, 2008), promove resistência ao estresse hídrico, a extremos de temperatura e acidez do solo (POZO & AZCON-AGUILAR, 2007) e patógenos do sistema radicular (BAUMERT et al., 1997).

Determinadas espécies de fungos podem, ainda, apresentar elevada tolerância a metais pesados (MEDVE & SAYRE, 1994). Esse efeito tem sido atribuído à habilidade dessas associações em reter os metais no micélio fúngico, evitando a translocação destes para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (COLPAERT & VAN ASSCHE, 1993; AGGANGAN et al., 1998). Algumas espécies de fungos podem acumular altas concentrações de metais em seus corpos de frutificação (TURNAU, 1991), ou em outros tecidos fúngicos, na parede celular e em compartimentos internos (GADD, 1993; BLAUDEZ et al., 2000; GRAZZIOTTI et al., 2001; BELLION et al., 2006). Bertolazzi et al. (2010) comentaram sobre a capacidade de retenção de metais pesados pelo micélio das ECM e que sua densidade pode funcionar como uma barreira física para que estes contaminantes não sejam absorvidos pela planta hospedeira.

Moreira & Siqueira (2006) atribuem essa habilidade a mecanismos que incluem processos externos às hifas, ligação a polímeros da parede celular e processos internos nas células dos fungos, em que os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados. Isso ocorre pela capacidade de alguns desses fungos em quelar íons de metais

no interior de suas células ou em exsudatos, retirando-os do solo e impedindo a absorção radicular (TARGHETTA et al., 2013). A simbiose ectomicorrízica pode auxiliar no desenvolvimento de espécies florestais em solo contaminado com metais pesados, possibilitando o aproveitamento de áreas contaminadas por cobre (SILVA et al., 2010).

Em excesso no solo, o cobre pode ter influência negativa sobre a associação micorrízica. A redução do número de frutificações e espécies de basidiomicetos foi observada conforme ocorria o aumento do nível de contaminação por As, Cd, Cu, Pb e Zn (RUHLING & SODERSTROM, 1990). Foi verificado que conforme a espécie e tipo de metal, há respostas diferenciadas entre os fungos ectomicorrízicos (HARTLEY et al., 1997). O cobre pode causar inibição da colonização em plantas (GRAZZIOTTI, 1999).

Os fungos ectomicorrízicos apresentam especificidade quanto ao hospedeiro (SOUSA et al., 2012) e a taxa de colonização é dependente da interação entre o fungo e a planta (GRAZZIOTTI; SIQUEIRA; MOREIRA, 2003; BRUNDRETT et al., 2005), podendo associar-se ou não, dependendo da espécie vegetal (SILVA; ANTONIOLLI; ANDREAZZA, 2003; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Há a existência de poucos estudos relacionados à formação de ectomicorriza com espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul. É possível que algumas espécies florestais nativas sejam promissoras e potenciais na formação de ectomicorriza podendo ser indicadas para serem usadas em locais contaminados com cobre.

#### 2.4 AMENIZANTE ORGÂNICO

Quando existem altas concentrações de metais no solo, o crescimento vegetal pode se tornar limitado como resultado dos efeitos do contaminante sobre as plantas. Neste caso, é recomendado principalmente que o contaminante seja estabilizado, promovendo assim a adsorção de metais e redução de seu conteúdo disponível a um nível que seja tolerado pelas plantas (GABOS et al., 2011). Neste caso, matéria orgânica é considerada como o principal ligante para metais pesados (JORGE et al., 2010), reduzindo assim sua disponibilidade para as plantas (RIBEIRO FILHO et al., 2001).

A aplicação de amenizantes orgânicos reduz a disponibilidade de metais pelas reações de adsorção e complexação (PARK et al., 2011). A disponibilidade de íons metálicos no ambiente pode ser reduzida significativamente pela matéria orgânica, devido principalmente pela presença de substâncias ricas em grupos funcionais com cargas negativas, tais como ácidos carboxílicos e hidroxilas fenólicas e alcoólicas, que são os locais que podem adsorver os metais em solução (MORREIRA et al., 2012), provocando a diminuição da absorção pelos



vegetais e a lixiviação (PARK et al., 2011), possibilitando o estabelecimento dos vegetais onde a contaminação apresenta níveis elevados (SANTOS et al., 2010).

Dentre os amenizantes estudados tem-se a utilização de compostos orgânicos (PARK et al., 2011) que modificam a disponibilidade dos metais no solo, pela alta capacidade que as substâncias húmicas e ácidos fúlvicos possuem de interagir com íons metálicos, substâncias orgânicas e minerais, formando complexos solúveis e não solúveis com diferente estabilidade e propriedades físico-químicas (MUDHOO et al., 2012).

O efeito da adição de materiais orgânicos na disponibilidade de metais pesados depende de vários fatores, entre eles a natureza da matéria orgânica, a degradabilidade, o teor de sais, o efeito no pH do solo e o potencial de redox, assim como o tipo de solo onde será aplicado e o metal em questão (ROSS, 1994; SHUMAN, 1999). É importante ressaltar que a adição de matéria orgânica ao solo tanto pode reduzir quanto aumentar a disponibilidade dos elementos para as plantas (SANTOS et al., 2007). Conforme destacado por Chen & Aviad (1990), a adição de matéria orgânica polimérica causa a redução da disponibilidade de metais para as plantas, porém a matéria orgânica de baixo peso molecular pode causar aumento de sua disponibilidade no solo.

A produção do CARS consiste na mistura de águas residuárias de suinocultura com material celulósico (serragem ou maravalha) em leiras de compostagem, que condiciona a absorção e evaporação da fração líquida, com posterior decomposição da fração sólida e eliminação de microrganismos patogênicos, sendo utilizado como adubo orgânico após a sua estabilização (PRÁ et al., 2005).

Devido à sua natureza orgânica, o composto de água residuária de suinocultura pode possuir condições de proporcionar o crescimento de plantas em solo com altas concentrações de cobre, promovendo efeito amenizante da toxidez do metal. Resultados promissores com a utilização do composto de água residuária de suinocultura foram encontrados por Welter (2018) no crescimento de plantas de morangueiro (*Fragaria* sp.) e Negrini (2017) na redução do efeito tóxico de cobre em plantas de eucalipto (*Eucalyptus grandis*).

### 3 CAPÍTULO I - FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS NO CRESCIMENTO, TOLERÂNCIA E ACÚMULO DE COBRE EM MUDAS DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE

#### 3.1 RESUMO

O cobre, quando em altas concentrações, é um dos principais metais pesados poluentes do solo. As plantas se diferenciam quanto à tolerância e toxicidade aos metais, o que lhes permite crescer e produzir até mesmo em solos com alta concentração de contaminantes. Objetivou-se neste trabalho determinar a influência do uso de fungos ectomicorrízicos no crescimento, tolerância e acúmulo de cobre em plantas de erva-mate cultivadas em solo contaminado com cobre. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4x6), sendo quatro possibilidades de uso dos inóculos: sem inóculo e 3 ectomicorrizas (UFSC-PT116 - *Pisolithus microcarpus*, UFSC-PT132 - *Pisolithus tinctorius* e UFSC-SU118 - *Suillus cothurnatus*) e seis doses de cobre adicionadas ao solo (0, 80, 160, 240, 320 e 400 mg kg<sup>-1</sup>), com sete repetições. Avaliou-se a altura da parte aérea, diâmetro do colo, massa seca da parte aérea e sistema radicular, área foliar, área superficial específica de raízes, teores e acúmulo de cobre na parte aérea e radicular, índice de translocação e tolerância, fator de bioconcentração, coeficiente de bioacumulação, parâmetros da clorofila e da fluorescência da clorofila e associação micorrízica. A inoculação de mudas de *Ilex paraguariensis* com ectomicorrizas UFSC-PT116, UFSC-PT132 e UFSC-SU118 ameniza o efeito de fitotoxicidade provocado pelo excesso de cobre no solo. O isolado ectomicorrízico UFSC-PT116 promove, entre os três testados, o maior crescimento e tolerância de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre. A inoculação de ectomicorrizas em *Ilex paraguariensis* promove menor acúmulo de cobre nas plantas em solos contaminados por este metal pesado.

**Palavras-chave:** Erva-mate. Micorrizas. Metal pesado. Contaminação do solo.

#### 3.2 ABSTRACT

The copper, when in high concentrations, is one of the major heavy metals pollutants in the soil. Plants differ in tolerance and toxicity to metals, allowing them to grow and produce even in soils with high concentrations of contaminants. The objective of this work was to determine the influence of ectomycorrhizal fungi on the growth, tolerance and accumulation of copper in herb mate plants grown in soil contaminated with copper. The design was completely randomized in factorial arrangement (4x6), with four possibilities of inoculum use: without inoculum and 3 ectomycorrhizae (UFSC-PT116 - *Pisolithus microcarpus*, UFSC-PT132 - *Pisolithus tinctorius* e UFSC-SU118 - *Suillus cothurnatus*) and six copper doses added to soil (0, 80, 160, 240, 320 and 400 mg kg<sup>-1</sup>) with seven replicates. It was evaluated the height of the aerial part, diameter of the lap, dry mass of the aerial part and root system, leaf area, specific surface area of roots, contents and accumulation of copper in the aerial part and radicular, translocation index and tolerance, bioconcentration factor, bioaccumulation coefficient, chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters and mycorrhizal association. Inoculation of *Ilex paraguariensis* seedlings with ectomicorrizas UFSC-PT116, UFSC-PT132 and UFSC-SU118 mitigates the toxicity effect caused by excess copper in the soil. The UFSC-PT116 isolate promotes, among the three tested, the highest

growth and tolerance of *Ilex paraguariensis* seedlings growth in copper contaminated soil. The inoculation of ectomycorrhizae in *Ilex paraguariensis* promotes less copper accumulation in the plants in soils contaminated by this heavy metal.

**Key-words:** Mate-herb. Mycorrhizae. Heavy metal. Soil contamination.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é considerado um micronutriente essencial às plantas, porém quando em altas concentrações, é um dos principais metais pesados poluentes do solo (ANDREAZZA et al., 2010). Plantas cultivadas em solos com altos teores de cobre podem acumular esse metal em seus tecidos e desenvolver sintomas de toxicidade (KABATA-PENDIAS, 2011), reduzindo o crescimento em decorrência de alterações morfológicas (AMBROSINI et al., 2015; BOCHICCHIO et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2016), bioquímicas e fisiológicas da planta (CAMBROLLÉ et al., 2012; MATEOS-NARANJO et al., 2013). As áreas com solos contaminados por cobre têm aumentado ao longo do tempo, resultantes das atividades antrópicas, como o uso arbitrário de agrotóxicos, fungicidas, irrigação de águas residuárias, industrialização, mineralização e uso de resíduos urbanos (MATEOS-NARANJO et al., 2013). Conforme a resolução nº 420 do CONAMA (2009), a concentração de 200 mg de cobre  $\text{kg}^{-1}$  de solo indica a necessidade de intervenção em área agrícola, pois configura risco à saúde pública e meio ambiente.

As plantas respondem de maneira diferenciada à contaminação do solo por cobre (SILVA et al., 2011). Algumas espécies de planta apresentam mecanismos adaptativos que as tornam mais tolerantes a toxicidade em altas concentrações de metais (LEQUEUX et al., 2010). Algumas plantas podem tolerar níveis elevados de cobre podendo acumular concentração desse elemento superior a 1000 mg  $\text{kg}^{-1}$  de massa seca por meio de mecanismos bioquímicos (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). O cobre é um elemento essencial para produtividade em plantas e participa do metabolismo de carboidratos, do nitrogênio, da síntese de lignina e de clorofila (MARSCHNER, 1995; GRASSI FILHO, 2005). Entretanto, a maioria das plantas manifesta sintomas de toxidez como necrose e redução no crescimento do sistema radicular (SOARES et al., 2000), necrose das folhas, desfolhamento precoce e redução do crescimento aéreo da planta (GRASSI FILHO, 2005).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma árvore perene, da família Aquifoliaceae, nativa da América do Sul (DARTORA, 2010; LORENZI, 2000). A cultura da erva-mate tem grande valor comercial e social, suas folhas e ramos finos são processados e

beneficiados para darem origem a bebidas estimulantes feitas por infusões, como chimarrão, tereré e chá mate (SAIDELLES et al., 2010), além de ser muito empregada na indústria alimentícia, de cosméticos, bebidas e farmacêuticas, devido à diversidade de compostos fitoquímicos presente (JACQUES et al., 2007). Contudo, é incipiente o que se sabe sobre o crescimento da erva-mate em áreas contaminadas com cobre, a acumulação do metal nesta espécie nativa e tampouco os níveis de acúmulo na parte aérea da planta.

O uso de fungos micorrízicos pode ser uma alternativa para melhorar o desenvolvimento de plantas em áreas contaminadas (DELLAI, et al, 2014). Esses fungos formam associações simbióticas com plantas vasculares aumentando a área explorada pelas raízes por meio de suas hifas no solo (BRUNDRETT et al., 1996; SMITH & READ, 2008). A literatura tem indicado pesquisas que evidenciam o efeito benéfico da associação micorrízica no crescimento vegetal como estudos realizados com o uso de *Pisolithus microcarpus* no crescimento de mudas de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) (DELLAI et al., 2014) e mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) taub.) (SILVA et al., 2010) em solo contaminado com cobre e, com isso, demonstrado a eficiência desta associação na tolerância das plantas a metais pesados (KABATA-PENDIAS, 2010), além de proporcionar à planta hospedeira maior tolerância a substâncias tóxicas no solo (GRAZZIOTTI et al., 2003).

Os microrganismos do solo, como os fungos ectomicorrízicos, podem ser uma alternativa para auxiliar o crescimento de plantas em áreas com excesso de metais pesados, reduzindo o efeito tóxico ocasionado por estes elementos. Além de favorecer o crescimento de plantas, os fungos micorrízicos melhoram a absorção de nutrientes essenciais e reduzem estresses bióticos e abióticos causados aos vegetais (ROSSETO et al., 2012). Isso ocorre pela presença de mecanismos que possibilitam alterar a biodisponibilidade desses elementos no ambiente micorrizosférico, controlando a absorção das raízes, e também mecanismos que protegem as plantas desses contaminantes (FERREIRA et al., 2016), como a própria colonização do córtex da raiz, desenvolvendo um micélio que envolve as raízes das plantas (CORNEJO et al., 2013).

Entretanto, não se têm evidenciado trabalhos sobre a resposta da espécie *Ilex paraguariensis* à associação micorrízica e seu crescimento em solo contaminado com cobre. Nesse sentido, ainda persiste a dúvida sobre a possibilidade do uso de fungos ectomicorrízicos em associação com a erva-mate como alternativa de redução do acúmulo de cobre, do aumento da tolerância e crescimento da planta cultivadas em solos contaminados com esse metal. Deste modo, objetivou-se neste trabalho determinar a influência do uso de fungos

ectomicorrízicos no crescimento, tolerância e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Local

O experimento foi conduzido em ambiente protegido, na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *Campus* de Frederico Westphalen, entre os meses de agosto e novembro de 2018. O solo utilizado no experimento foi caracterizado como um Latossolo Vermelho, coletado em área agrícola na camada de 0 - 20 cm, cujos atributos químicos e físicos estão especificados na Tabela 1, conforme metodologia descrita por Mann e Ritchie (1993) para o cobre trocável e por Tedesco et al. (1995) para os demais atributos.

Tabela 1 – Análise química do solo utilizado para a produção de mudas de *Ilex paraguariensis*.

pHágua 1:1	Ca+Mg -----	Al cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	H+Al -----	P -----	K mg kg <sup>-1</sup>	Cu -----	M.O. ---- %	Argila -----
5,3	2,23	0,0	3,3	6,5	126,5	12,73	1,1	62,00

Fonte: Autor (2019).

#### 3.4.2 Delineamento

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 6, sendo quatro possibilidades de uso de fontes de inóculos: sem inóculo e 3 ectomicorrizas (UFSC-PT116 - *Pisolithus microcarpus*, UFSC-PT132 - *Pisolithus tinctorius* e UFSC-SU118 - *Suillus cothurnatus*) e seis doses de cobre adicionadas ao solo [0 (teor natural do solo), 80, 160, 240, 320 e 400 mg kg<sup>-1</sup>], com 7 repetições.

Os fungos ectomicorrízicos (UFSC-PT116 - *Pisolithus microcarpus*, UFSC-PT132 - *Pisolithus tinctorius* e UFSC-SU118 - *Suillus cothurnatus*) foram obtidos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os fungos ectomicorrízicos foram multiplicados 30 dias antes da implantação do experimento em meio sólido (Melin-Norkrans Modificado) (MARX, 1969), em placas de Petri, submetidos a estufa incubadora BOD a 25°C.

### 3.4.3 Instalação e condução do experimento

As sementes da espécie de erva-mate utilizadas no experimento foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), unidade de Chapecó, SC. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, semeadas em sementeira com substrato marca Carolina Soil® esterilizado em autoclave com temperatura de 121°C em 3 ciclos de 30 minutos, sendo irrigadas com água destilada. Quando as mudas apresentaram um par de folhas definitivas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade volumétrica de 1.000 cm<sup>3</sup>, sendo considerado uma unidade experimental (UE).

As doses de cobre foram aplicadas 30 dias antes do transplante das mudas na forma de solução de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), sendo diluídas em 50 mL de água destilada para possibilitar homogeneização no solo. A inoculação dos fungos ectomicorrízicos nas mudas foram através de inoculante, utilizando-se o micélio fúngico de 10 placas de Petri, totalizando 21 colônias, o qual foi triturado em liquidificador com 500 mL de água destilada por 10 segundos. Para inoculação foi aplicado 10 mL dessa solução, por meio de uma seringa graduada, diretamente nas raízes e no solo de cada tratamento em contato com as raízes no momento da repicagem e plantio das mudas. A testemunha sem inoculação também recebeu 10 mL de uma solução contendo somente o meio de cultura MNM.

O experimento foi conduzido por 120 dias após o transplante das mudas. No decorrer deste período foram realizadas irrigações diárias, com uso de regador de plástico capacidade 5 litros, mantendo-se a umidade do solo a 70-80% da capacidade de campo. Para atender às exigências do delineamento experimental, semanalmente foi realizado rodízio das UEs.

### 3.4.4 Avaliação morfológica

Ao final do experimento foi quantificada a altura da parte aérea (H), com régua graduada, do colo das mudas até o ápice caulinar; o diâmetro do colo (DC), com paquímetro digital marca Black Jack Tools; número de folhas (NF); a massa seca do sistema radicular (MSR) e da parte aérea (MSPA), ambos separados na região do colo da muda e secos em estufa a 60±1 °C até massa constante, pesadas em balança analítica e calculada a massa seca total (MST) pela soma das MSR e MSPA. Com base nestes parâmetros foi calculado a relação altura/diâmetro e o índice de qualidade de Dickson (IQD), que representa a qualidade

morfológica das mudas a serem levadas a campo, de acordo com a Equação 1 (DICKSON, 1960).

$$IQD = \frac{MST}{\frac{H}{DC} + \frac{MSPA}{MSR}} \quad (1)$$

As raízes foram separadas do solo por meio de lavagem em água corrente usando peneiras com malha de diâmetro de 0,5 mm. Após a lavagem das raízes, ocorreu a digitalização das raízes com o uso de escâner (HP D110). Após a digitalização das imagens radiculares, a área superficial específica (ASE), o comprimento radicular (CR) e o volume de raiz (VR) foram determinados pelo processamento das imagens no programa para análises de fibras e raízes, Safira 2.0 (JORGE & SILVA, 2010). A área foliar (AF) foi medida e analisada pelo software ImageJ (versão 2.0; US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) (SCHNEIDER et al., 2012), utilizado para medir todas as imagens off-line.

### 3.4.5 Metal no solo e planta

Ao final do experimento foram coletadas amostras de solo de cada tratamento e determinados os teores pseudo-totais, conforme a metodologia 3050b, descrita em USEPA (1996), utilizando-se 0,5g de solo, onde é utilizado ácido nítrico e água oxigenada que liberam os metais ligados à matéria orgânica, aos óxidos e a outras frações minerais e posterior determinação em espectrofotometria de absorção atômica, conforme descrito por Miyazawa et al. (2009).

Após a aferição da massa seca de raízes e parte aérea, as mesmas foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha de 10 mesh para a determinação dos teores de cobre no tecido vegetal, através de digestão nítrico-perclórica (3:1) e determinação em espectrofotometria de absorção atômica, conforme descrito por Miyazawa et al. (2009).

Com base na MST, nos teores de cobre ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) do sistema radicular (CuR) e da parte aérea (CuPA), nas quantidades acumuladas de cobre ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) no sistema radicular (CuAR), na parte aérea (CuAPA) e no total das mudas (CuAT), na dose zero de cobre ( $d_0$ ) e nas doses de 80 à 400  $\text{mg kg}^{-1}$  ( $d_n$ ), foi calculado o índice de tolerância (Itol), conforme a Equação 2, e o índice de translocação (Itra), com base na Equação 3. O Itol estima a capacidade das mudas crescerem em ambientes com elevada concentração de cobre (WILKINS, 1978) e o Itra corresponde à porcentagem total absorvida de cobre que foi

transportado para a parte aérea (ABICHEQUER & BOHNEN, 1998). O fator de bioconcentração foi determinado pela razão entre a concentração de metal nas raízes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e a concentração pseudo-total no solo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), enquanto o fator de bioacumulação foi determinado pela razão entre a concentração de metal na parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e a concentração pseudo-total no solo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), conforme Yoon et al. (2006).

$$I_{\text{tol}} = \frac{\text{MSTdn}}{\text{MSTdo}} * 100 \quad (2)$$

$$I_{\text{tra}} = \frac{\text{CuAPAdn}}{\text{CuATdn}} * 100 \quad (3)$$

### 3.4.6 Parâmetros da fluorescência da clorofila

Os parâmetros de fluorescência da clorofila foram medidos na terceira folha visualmente sadia e completamente expandida usando um fluorômetro modulado modelo JuniorPam (Walz, Alemanha), no período de início da manhã, das 06h00 - 08h00. A fluorescência inicial ( $F_0$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m$ ) foram medidas antes e depois, respectivamente, das folhas receberem um pulso de luz saturante de  $10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A fluorescência variável ( $F_v$ ) é calculada com base no incremento da fluorescência inicial até a máxima ( $F_m - F_0$ ) e a eficiência fotoquímica máxima do Fotossistema II - PSII ( $F_v/F_m$ ) é calculada como a razão da fluorescência variável sobre a máxima (LICHTENTHALER, 1987). A taxa de transporte de elétrons ( $\text{ETR}_{1500}$ ) foi medida através de curvas de luz (taxa de transporte de elétrons contra radiação fotossinteticamente ativa [PAR]). Curvas de luz foram medidas submetendo cada amostra a nove níveis de radiação (0, 125, 190, 285, 420, 625, 820, 1150 e  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), durante 10 segundos.

### 3.4.7 Parâmetros da clorofila

Os teores de clorofilas a (Chl a), b (Chl b), total (Chl Total) e carotenoides totais foram determinados a partir da mesma folha utilizada na análise de fluorescência, amostras destas folhas foram coletadas e acondicionadas imediatamente em freezer a  $-4^\circ\text{C}$  até o momento das análises. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em 5,0 ml de acetona 80% (v/v) e posteriormente centrifugadas a 4000 rpm durante 3 min. As absorbâncias do sobrenadante foram medidas a 480, 645 e 663 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-VIS,



sendo as concentrações dos pigmentos e carotenóides calculados de acordo com Hendry & Price (1993).

#### **3.4.8 Associação micorrízica**

A avaliação da colonização micorrízica nas raízes foi realizada por meio de dois procedimentos: a) a olho nu e sob lupa, busca-se detectar alterações morfológicas, possivelmente provocadas por fungos ectomicorrízicos; b) aplicou-se a técnica de clarificação e coloração das raízes com Azul de Trypan 0,05%, para visualização das ectomicorrizas em microscópio e em lupa (BRUNDRETT et al., 1996). A colonização ectomicorrízica foi estimada em 5 repetições por planta pelo método da placa quadriculada (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980).

#### **3.4.9 Análise estatística**

A análise estatística teve como modelo matemático:  $Y_{ij} = m + a_i + d_j + (ad)_{ij} + e_{ij}$ , em que:  $Y_{ij}$  é uma observação referente ao tratamento "nível i do fator A (micorrizas) com o nível j do fator D (doses de Cu)"; m é a média geral do experimento;  $a_i$  é o efeito do nível i do fator A;  $d_j$  é o efeito do nível j do fator D;  $(ad)_{ij}$  é o efeito da interação do nível i do fator A com o nível j do fator D;  $e_{ij}$  é o efeito aleatório do erro experimental.

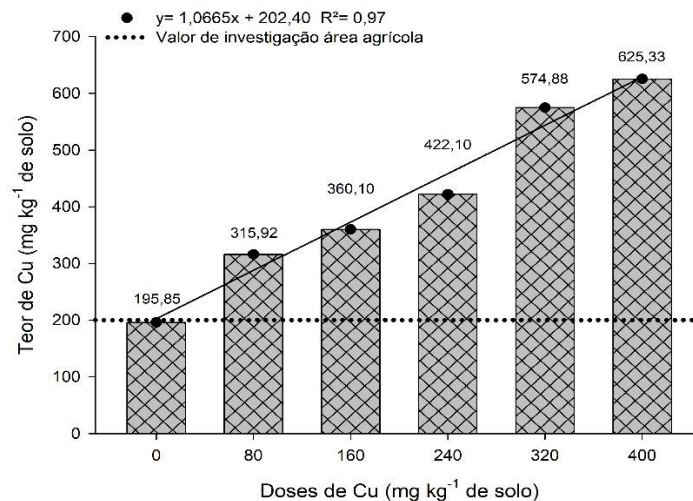
Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando apresentaram interação significativa foram submetidos à análise de regressão do fator de variação quantitativo (doses) dentro de cada nível do fator qualitativo (inóculos micorrízicos). Para os parâmetros sem interação, foram desdobrados os efeitos simples, sendo as médias do fator qualitativo (Fator A) comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro e as médias do fator quantitativo (Fator D) submetidos à análise de regressão polinomial pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Concentração de cobre no solo

As doses de cobre aplicadas no solo proporcionaram aumento nas concentrações pseudo-totais de cobre de forma linear (Figura 1), atingindo valores acima do limite estabelecido pela legislação para investigação em áreas agrícolas, que é de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  (CONAMA, 2009). Tais valores superam também o valor de referência de qualidade definido pela FEPAM (2014), que é de  $203 \text{ mg kg}^{-1}$  para solos oriundos de rochas vulcânicas do Planalto do Estado do Rio Grande do Sul.

Figura 1 - Teores pseudo-totais de cobre em função das doses do metal ( $0, 80, 160, 240, 320, 400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) adicionadas ao solo.

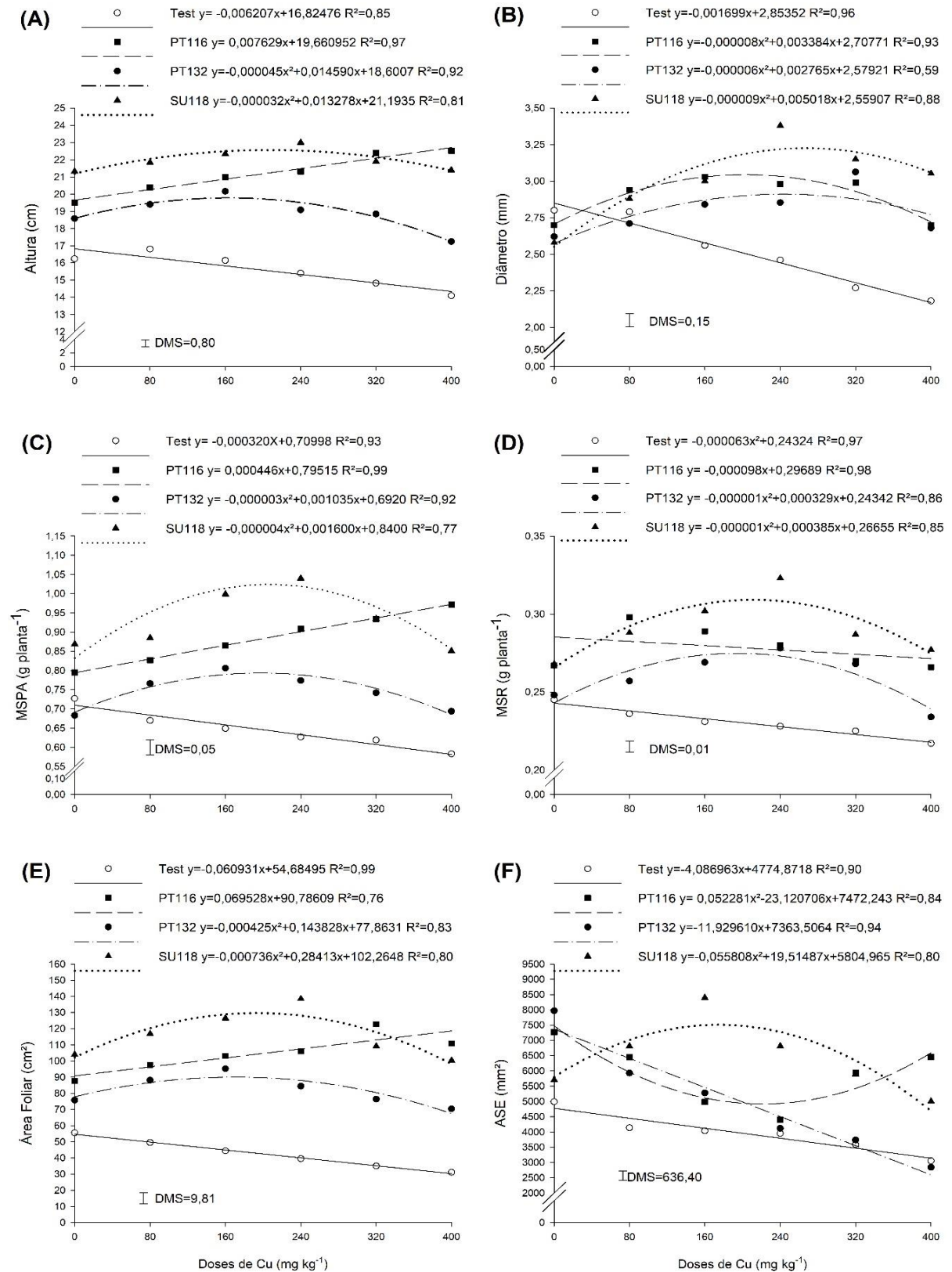


Fonte: Autor (2019).

#### 3.5.2 Crescimento das plantas

As plantas de erva-mate evidenciaram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as espécies de isolados ectomicorrízicos e as doses de cobre aplicadas no solo para os parâmetros: altura de planta (AP), diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR), massa seca total (MST), área foliar (AF) e área superficial específica (ASE) das raízes (Figura 2).

Figura 2 – Altura (A), diâmetro de colo - DC (B), massa seca da parte aérea – MSPA (C), massa seca radicular - MSR (D), área foliar (AF) e área superficial específica de raízes (ASE) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre.



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).

As doses de Cu aplicadas no solo induziram redução na altura das mudas sem inoculação, enquanto os tratamentos inoculados foram significativamente superiores, sendo que o isolado UFSC-PT116 promoveu aumento na altura, obtendo valor estimado 58,4% maior que a testemunha na dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 2A). Tais resultados corroboram com Dellai et al. (2018) com eucalipto saligna (*Eucalyptus saligna* Sm.), nos quais as mudas produzidas em solo contaminado com cobre apresentaram maior altura quando inoculadas com o isolado UFSC-PT116. Ao se associarem com o sistema radicular das plantas, os fungos ectomicorrízicos aumentam a absorção de água e nutrientes do solo, enquanto que, o manto fúngico localizado na superfície das raízes atua como uma barreira física e química a metais pesados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; SMITH & READ, 2008). É possível que tenham ocorrido alterações fisiológicas, resultando na redução da altura das plantas sem inoculação com o aumento gradativo das doses de cobre adicionadas no solo, em contrapartida, os resultados demonstram que a inoculação com os isolados testados possibilita menor toxidez do Cu sobre a altura da erva-mate.

O diâmetro de colo (DC) foi reduzido com as doses de cobre nas plantas sem inoculação, atingindo redução de 31,3% na maior dose, enquanto os isolados ectomicorrízicos apresentaram resposta quadrática (Figura 2B). O isolado UFSC-SU118 mostrou maior crescimento (3,25 mm) do DC na dose estimada 278,77 mg kg<sup>-1</sup>, sendo 6,0% maior que o isolado UFSC-PT116 com 3,06 mm na dose 211,50 mg kg<sup>-1</sup>. Dellai et al. (2014) relata que o diâmetro do colo foi reduzido significativamente quando inoculado com o fungo UFSC-PT116, o que difere dos resultados encontrados no presente trabalho para erva-mate. O cobre em concentrações superiores às necessárias para o crescimento ótimo de cada planta, pode inibir o crescimento e interferir com processos celulares importantes como a fotossíntese (TAIZ et al., 2017). Para transplante das mudas para o campo, recomenda-se um DC mínimo de 2,0 mm (WENDLING & DUTRA, 2010), onde os três isolados, assim como sem inoculação, apresentam valores de diâmetro do colo adequados nas doses de Cu estudadas.

A massa seca da parte aérea das mudas de erva-mate sem inoculação foi reduzida linearmente com o aumento das doses de cobre, enquanto que o isolado UFSC-PT116 promoveu aumento linear, com crescimento de 22,6% entre a dose zero e a dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> e, quando comparado à testemunha sem inoculação, apresentou massa seca da parte aérea superior em 67,2%, na dose 400 mg de Cu kg<sup>-1</sup> de solo (Figura 2C). Estes resultados corroboram com Silva et al. (2010), que encontraram redução na MSPA em mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) com até 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre adicionado ao solo. Segundo Steffen et al. (2012), a aplicação do fungo ectomicorrízico UFSC-PT116

(*Pisolithus microcarpus*) e óleo essencial de eucalipto promove maior desenvolvimento da parte aérea de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.).

Contudo, plantas submetidas a doses elevadas de cobre podem apresentar desfolhamento precoce além de redução no crescimento da parte aérea (GRASSI FILHO, 2005). Além da redução da massa seca, comumente são observados sintomas de clorose na parte aérea das plantas (YRUELA, 2013), devido à substituição do íon  $Mg^{2+}$  na molécula de clorofila por  $Cu^{2+}$ , resultando na quebra da fotossíntese (KÜPPER et al., 1996). Referidos resultados indicam que a inoculação do isolado UFSC-PT116 promove resposta positiva no crescimento (Figura 2C) das mudas de erva-mate em solo contaminado por cobre.

A massa seca radicular (MSR) foi reduzida em 14,2% e 16,0%, respectivamente, nas plantas sem inoculação e inoculadas com o isolado UFSC-PT116, com as doses de cobre aplicadas no solo, enquanto os isolados UFSC-SU118 e UFSC-PT132 tiveram resposta quadrática, com ponto de máxima nas doses de 192,5 e 164,5  $mg\ kg^{-1}$ , respectivamente (Figura 2D), mas que na dose 400  $mg\ kg^{-1}$  apresentaram, respectivamente, MSR muito próxima e inferior ao tratamento sem adição de Cu. Esse resultado corrobora com os de Weirich et al. (2018) que também obtiveram maior massa seca radicular no eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson) sem inoculação e menor quando inoculada com o isolado UFSC-PT116. Altas quantidades de cobre no solo causam toxicidade às plantas, inibição no crescimento de raízes e redução da fotossíntese (YRUELA, 2009).

Apesar de haver redução da MSR no isolado UFSC-PT116 (Figura 2D), a formação da associação micorrízica tem como resultado final o aumento da área de absorção radicular da planta por causa da presença das hifas do fungo (SMITH & READ, 2008), modificando a arquitetura das raízes (BRUNDRETT, 2008), que se tornam mais curtas e muito ramificadas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Para a planta é mais eficiente em relação ao gasto de energia, possibilitar o desenvolvimento de hifas do que produzir raízes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), onde as hifas fúngicas geralmente desempenham a função dos pelos radiculares (SOUZA et al., 2006), induzindo segundo Bertolazi et al. (2010) o crescimento de plantas em solos degradados e com baixa disponibilidade de nutrientes. Assim, mesmo com redução da massa seca radicular, nas plantas micorrizadas há um ganho em relação a testemunha, em todas as doses.

O isolado UFSC-PT116 promoveu aumento na área foliar (AF) das mudas de erva-mate de 30,6%, na dose 400  $mg\ kg^{-1}$  de solo obteve maior AF que os demais tratamentos, já as mudas sem inoculação evidenciaram redução de 44,5% conforme aumento nas doses de

cobre (Figura 2E). A área foliar do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) apresentou redução linear com aumento das doses de cobre e, quando submetido a dose 100 mg kg<sup>-1</sup>, foi 69% menor em relação a testemunha (CHAVES et al., 2010). A área foliar é responsável pela produção de fotoassimilados necessários para a demanda metabólica e formação de novas estruturas vegetais (SILVA et al., 2018). Verifica-se o efeito depreciativo do cobre no aparelho assimilatório das plantas, sendo mais intenso nas plantas sem inoculação, contudo, houve aumento da área foliar com o isolado UFSC-PT116 (Figura 2E) elevando a massa seca da parte aérea (Figura 2C) da erva-mate, indicando haver grande correlação entre esses dados.

A área superficial específica de raízes (ASE) foi reduzida com as doses de cobre nas plantas sem inoculação e com o isolado UFSC-PT132, já o isolado UFSC-PT116 apresentou efeito quadrático, porém na dose 400 mg kg<sup>-1</sup> manifestou a maior ASE dos 4 tratamentos (Figura 2F). A análise de regressão revelou redução para a ASE das mudas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link) e carne-de-vaca (*Pterogyne nitens* Tul), e aumento quadrático para a timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* Vell.) até a dose de 81 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no solo (SILVA et al., 2016). O maior desenvolvimento do sistema radicular em solo contaminado é desejável, pois irá possibilitar maior absorção de água e nutrientes (CAIRES et al., 2011). Estes resultados evidenciam que o isolado UFSC-PT116 proporcionou maior resistência às mudas de erva-mate que os demais isolados e o tratamento testemunha, quando submetidas à contaminação por doses crescentes de cobre.

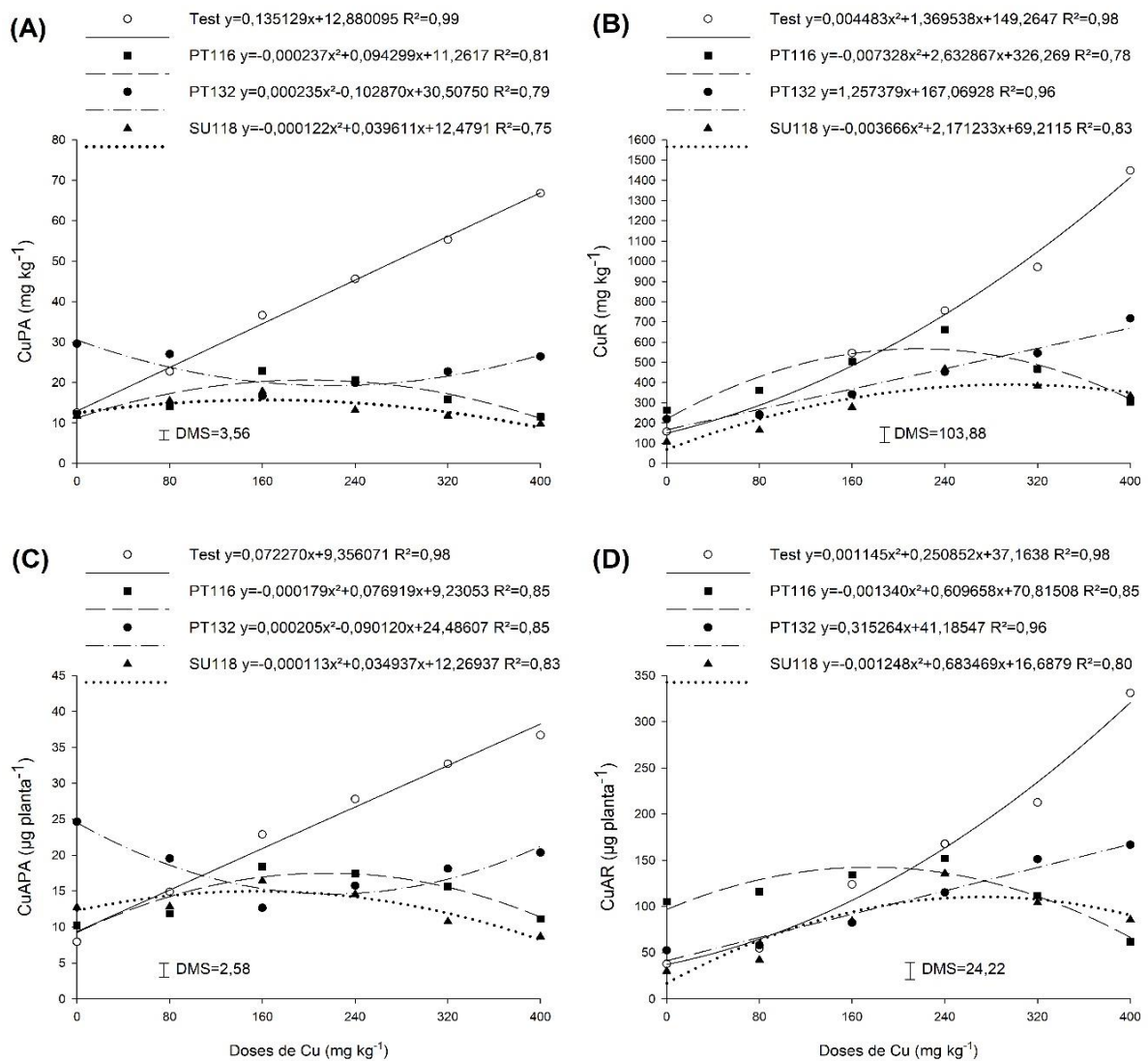
### 3.5.3 Concentração e acúmulo de cobre nas plantas

O teor de cobre na parte aérea (CuPA) e no sistema radicular (CuR), a quantidade de cobre acumulado na parte aérea (CuAPA) e no sistema radicular (CuAR) (Figura 3) erva-mate apresentaram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os isolados ectomicorrízicos e as doses de cobre aplicadas no solo.

O teor de cobre na parte aérea aumentou com aumento de 419,6% no tratamento sem inoculação entre a dose inicial e final testada, enquanto os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118 apresentaram ponto de máxima nas doses 198,9 mg kg<sup>-1</sup> e 162,3 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3A), sendo importante salientar que, na maior dose estudada (400 mg kg<sup>-1</sup>), os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118 tiveram reduções na concentração do metal na ordem de 83,4% e 86,8%, respectivamente, em relação as plantas sem inoculação. De Marco et al. (2017) relataram que o *E. grandis* apresentou aumento no teor de CuPA até a dose estimada 196,1 mg kg<sup>-1</sup>. O excesso de cobre nas plantas pode levar a distúrbios

fisiológicos, bioquímicos e morfo-anatômicos, causando inibição de seu desenvolvimento (SANCHEZ-PARDO et al., 2014; GAUTAM et al., 2016). Desse modo, houve um aumento expressivo de cobre na parte aérea quando a erva-mate foi cultivada em doses altas deste metal no solo, atingindo valores acima dos limites máximos de tolerância de contaminantes inorgânicos, de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre previstos pela ANVISA (1998). Os resultados encontrados indicam que na presença das micorrizas há redução no teor de cobre na parte aérea das plantas de erva-mate.

Figura 3 – Teor de cobre na parte aérea - CuPA (A) e radicular - CuR (B), cobre acumulado na parte aérea - CuAPA (C) e radicular - CuAR (D) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre.



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).

O tratamento sem inoculação apresentou aumento de 847,57% no teor de cobre nas raízes (CuR) da erva-mate entre a dose zero e  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ , sendo significativamente maior

que os demais tratamentos, enquanto o isolado UFSC-PT132 obteve aumento de 201%, apresentando o maior valor entre os isolados na maior dose de Cu. Os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118 apresentaram resposta quadrática, com ponto de máxima nas doses estimadas em 179,6 e 296,13 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3B). Contudo, percebe-se que em determinadas doses, na presença dos fungos ectomicorrízicos, o teor de cobre no tecido das raízes e parte aérea das plantas foi menor, assim como constatado por Fogarty & Tobin (1996) e Gadd (1993) que têm evidenciado uma estreita relação entre a produção de pigmentos extracelulares por fungos e a bioadsorção de metais. Desta forma, conforme constatado por Bertolazzi et al. (2010), os isolados ectomicorrízicos, podem reter o cobre em seu micélio e serem capazes de adsorver o metal, evitando que seja absorvido pelas raízes da erva-mate.

Os resultados evidenciaram efeito linear do aumento da dose de Cu no acúmulo de cobre na parte aérea (CuAPA) nas plantas da erva-mate sem inoculação, que atingiu valor de 38,2 µg planta<sup>-1</sup> na maior dose, o que representa 309,2% de aumento. Já os isolados ectomicorrízicos proporcionaram significativamente menor acúmulo de cobre em relação ao tratamento sem inoculação, com resposta quadrática máxima para os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118 ocorrendo em 214,85 e 154,58 mg kg<sup>-1</sup> e acúmulos correspondentes a 17,49 e 14,96 µg planta<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3C). Em estudo com mudas de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), De Marco et al. (2017) encontraram o máximo acúmulo de cobre na parte aérea de 39,0 µg planta<sup>-1</sup> na dose de 57,1 mg kg<sup>-1</sup> de cobre aplicado no solo. Valores como os encontrados no presente estudo são fontes para potenciais estudos quanto aos possíveis benefícios ou problemas associados ao consumo dos subprodutos gerados a partir de plantas de erva-mate oriundas de áreas com solos contaminados por cobre. Verifica-se que, na presença dos fungos ectomicorrízicos, o acúmulo de cobre no tecido aéreo das plantas foi significativamente menor que nas plantas sem inoculação.

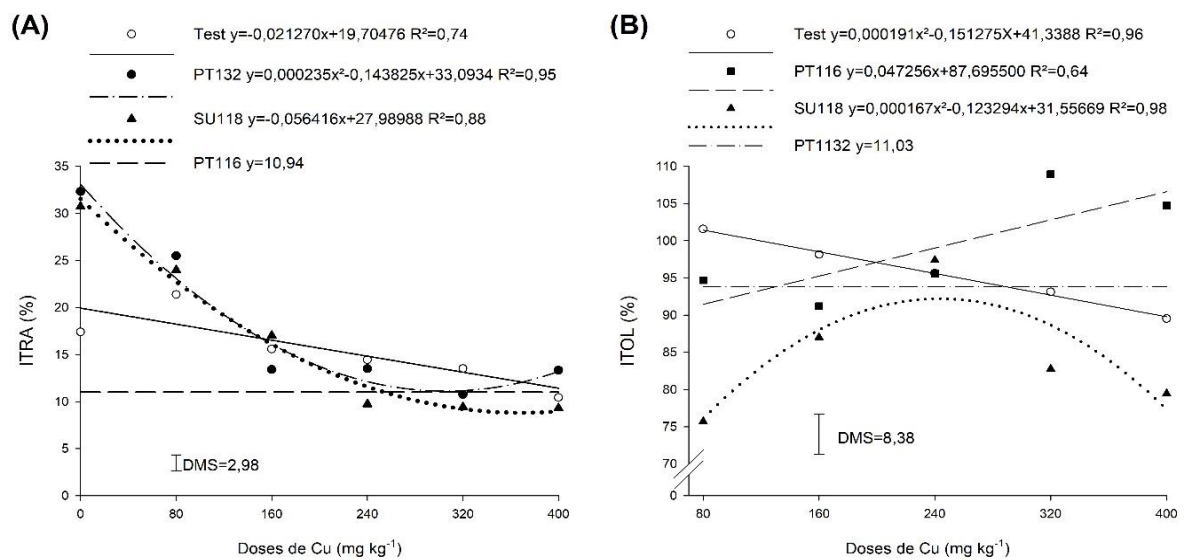
As plantas erva-mate sem inoculação tiveram aumento quadrático de cobre acumulado na raiz na ordem de 283,54 µg planta<sup>-1</sup> entre a menor e a maior dose testada. Verificou-se também efeito quadrático no acúmulo de cobre sobre os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118, com maiores concentrações de 140,15 e 110,26 µg planta<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3D). Na maior dose testada (400 mg kg<sup>-1</sup>) os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118 apresentaram acúmulo de cobre no sistema radicular de 68,7% e 71,8% menor, respectivamente, que a testemunha. Silva et al. (2010) verificaram que o isolado de fungo ectomicorrízico UFSC-PT116 (*Pisolithus microcarpus*) reduziu significativamente a absorção de cobre pelas mudas de canafístula na dose de 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. O acúmulo desse metal nas raízes é uma das principais estratégias de tolerância para evitar sua translocação para os



tecidos fotossintéticos (CAMBROLLÉ et al., 2013). Desse modo, evidencia-se que os isolados UFSC-PT116, UFSC-PT132e UFSC-SU118 podem reduzir a absorção de metais pelas raízes da erva-mate em doses elevadas de cobre.

Os índices de translocação e de tolerância (Figura 4), o fator de bioconcentração e coeficiente de bioacumulação de cobre (Figura 5) apresentaram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre isolados ectomicorrízicos e as doses de cobre aplicadas no solo.

Figura 4 – Índice de translocação – ITRA (A) e Índice de tolerância – ITOL (B) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre.



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).

As equações de regressão mostraram efeitos distintos entre os tratamentos, com redução no índice de translocação (ITRA) de 8,5% na dose máxima de Cu na testemunha e redução quadrática até as doses estimadas de 369 e 306 mg kg<sup>-1</sup> de solo para UFSC-SU118 e UFSC-PT132, respectivamente (Figura 4A). Ocorreu redução no índice de translocação em mudas de timbaúva e pata-de-vaca, com ponto mínimo em 223 e 207 mg kg<sup>-1</sup> de solo conforme o aumento das doses de cobre (SILVA et al., 2015). O cobre está fortemente ligado às paredes celulares das raízes, não sendo prontamente móvel na planta, resultando em baixa translocação do metal para a parte aérea (KABATA-PENDIAS, 2011).

De acordo com Pulford e Watson (2003), regular a absorção de metais no sistema radicular e a baixa translocação para a parte aérea são considerados mecanismos que o sistema radicular pode utilizar para contribuir para aumentar a tolerância da planta a metais pesados. Quanto mais baixo ou próximo a zero o índice de translocação, maior a

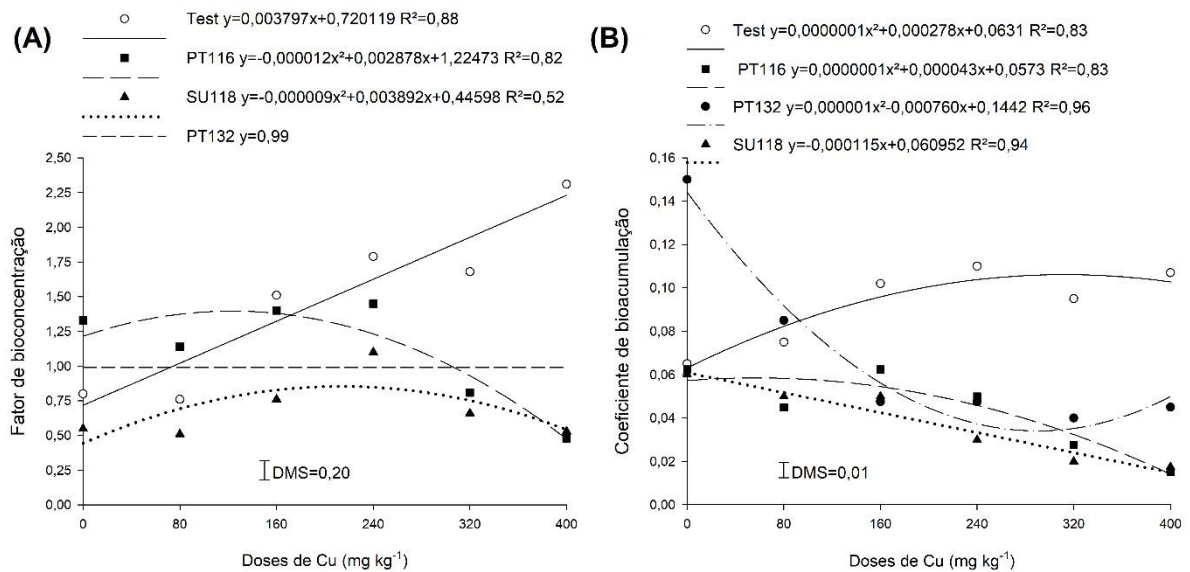
probabilidade de sobrevivência e crescimento da planta em ambiente contaminado e menor translocação para a parte aérea (BRANZINI et al., 2012), fator importante quando se trata de plantas cuja finalidade de alimentação humana são folhas e ramos, como é o caso da erva-mate.

O índice de tolerância (ITOL) foi reduzido nas mudas sem inoculação em 14,20% na dose mais alta de cobre, já a inoculação com o isolado UFSC-PT116 evidenciou resposta positiva, com aumento de 91,4% para 106,59% entre a dose 80 e 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no solo, respectivamente (Figura 4B). Doses de cobre também causaram redução no índice de tolerância das plantas de *Senna multijuga* (DE MARCO et al., 2017), corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho para as plantas sem inoculação. As micorrizas exercem um papel chave para reduzir o efeito tóxico do cobre à planta, na membrana plasmática desempenha função de homeostase dos contaminantes, controlando ou evitando a entrada do metal na célula (ALI et al., 2013). Desse modo, os resultados deste trabalho indicam que a inoculação com o isolado UFSC-PT116 apresenta-se como um mecanismo de tolerância ao cobre, permitindo maior crescimento das mudas de erva-mate em solo contaminado.

O fator de bioconcentração foi superior no tratamento sem inoculação, apresentando aumento de 0,72 para 2,23 nos valores estimados entre as doses testadas. Já os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118 apresentaram ponto de máxima de 1,39 e 0,86 nas doses estimadas de 119,91 e 216,22 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 5A). Na dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> verificou-se que a bioconcentração de Cu nas plantas sem inoculação foi 395,5 e 298,2% superior aos isolados UFSC-SU118 e UFSC-PT116, respectivamente, fato que se deve a menor massa seca obtida pelas plantas sem inoculação, submetidas a crescentes doses de cobre no solo (Figura 2C e 2D).

Plantas que apresentam fator de bioconcentração maior que 1,0 podem ser recomendadas para fitoextração de contaminantes do solo (MCGRATH & ZHAO, 2003). Esse resultado é de extrema importância para o isolado UFSC-PT116, pois além de proporcionar às plantas um potencial de fitoextração até a dose 320 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 5A), possui menor índice de translocação (Figura 4A) e menor acúmulo de cobre na parte aérea (Figura 3C), retendo o metal absorvido no sistema radicular.

Figura 5 – Fator de bioconcentração (A) e Coeficiente de bioacumulação (B) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre.



DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).

O coeficiente de bioacumulação apresentou valores abaixo de 1,0 para todos os tratamentos nas crescentes dose de cobre no solo (Figura 5B). Resultados semelhantes foram verificados por Negrini (2017) em solo contaminado com cobre, com as espécies *E. grandis*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *C. citriodora* e Silva et al. (2017) para o *E. grandis*, em solo contaminado com zinco, no qual apresentaram valores abaixo do valor classificatório (1,0). Com a presença de fungos ectomicorrízicos, a erva-mate apresenta baixa eficiência em translocar cobre para a parte aérea, ao mesmo tempo em que o fator de bioacumulação de cobre é reduzido drasticamente em todas as doses do metal adicionadas ao solo (Figura 5B), isso demonstra a capacidade dos fungos ectomicorrízicos em permitir o desenvolvimento da erva-mate em situações de altas doses de contaminante no solo.

### 3.5.4 Parâmetros da fluorescência da clorofila

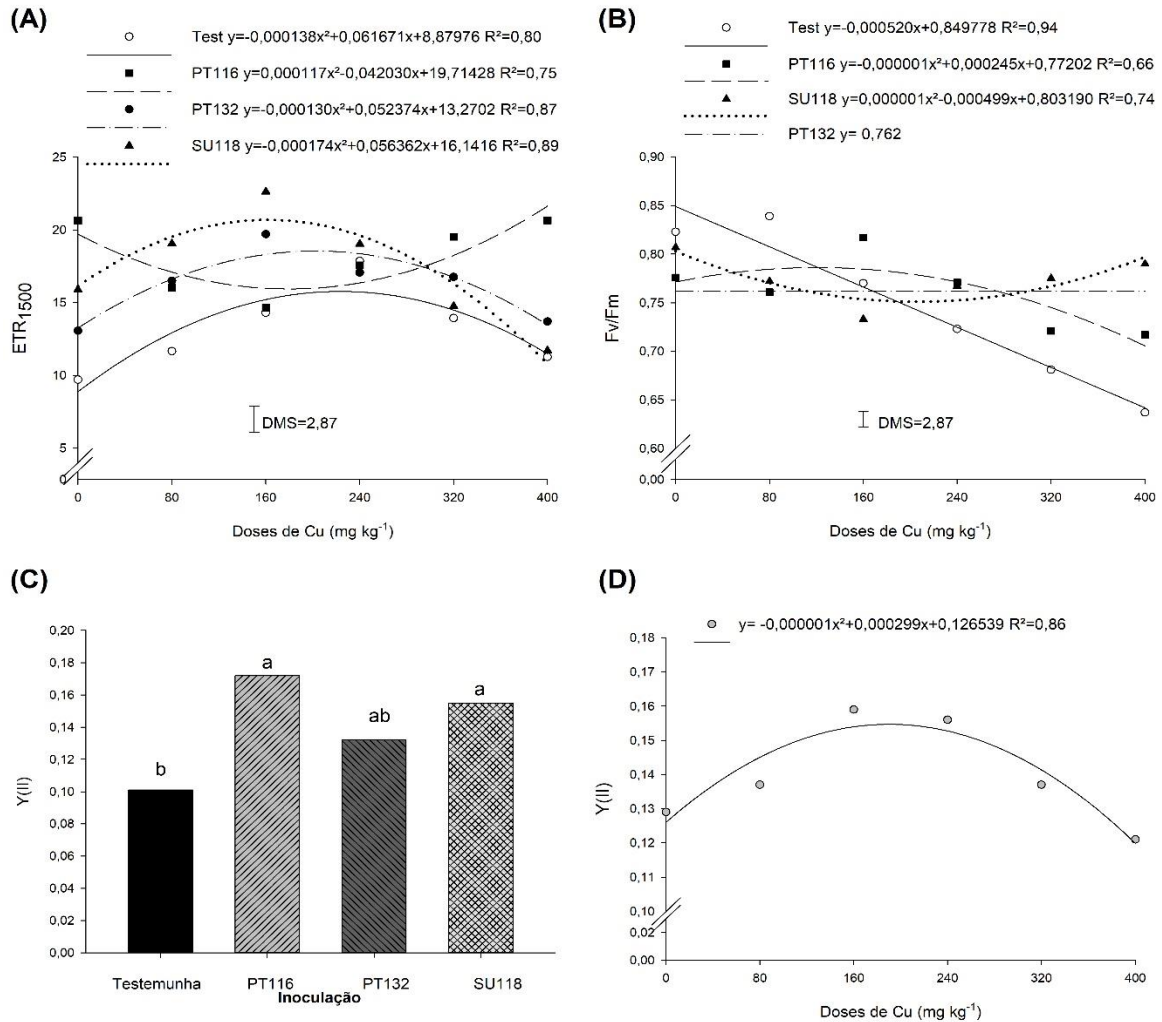
O parâmetro fisiológico de fluorescência da clorofila referente a taxa de transporte de elétrons (ETR<sub>1500</sub>) apresentou redução quadrática, com ponto mínimona dose 179,6 mg kg<sup>-1</sup> para o isolado UFSC-PT116, tendo aumento em doses posteriores, diferindo dos demais tratamentos em todas as doses de cobre. O isolado UFSC-SU118 apresentou ponto de máxima em 161,95 mg kg<sup>-1</sup> de cobre (Figura 6A). De acordo com Lichtentaler et al. (2005), quando a quantidade de clorofila associada ao PSII reduz, consequentemente, a fração de energia

absorvida na etapa fotoquímica reduzirá, tendo influência negativa também na cadeia de transporte de elétrons, sendo desfavorável para a planta. As oscilações constatadas na taxa de transporte entre as diferentes doses de cobre no solo se devem a algum estresse biótico ou abiótico que a planta veio a sofrer (BOWN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002). Podendo assim inferir que as plantas foram beneficiadas principalmente com o isolado UFSC-PT116, e que a presença dos fungos reduz o estresse provocado pelo cobre, pois houve menor concentração de Cu nos tecidos da parte aérea quando as mudas foram inoculadas com micorrizas.

A eficiência máxima do PSII (Fv/Fm) evidenciou interação significativa entre as doses de cobre e inoculações (Figura 6B), mostrando tendência de aumento para o isolado UFSC-SU118 somente a partir da dose 249,5 mg kg<sup>-1</sup>. O isolado UFSC-PT116 apresentou eficiência máxima de 0,78 até 122,5 mg kg<sup>-1</sup>, já o tratamento testemunha apresentou redução de 32,4% entre a dose zero e 400 mg kg<sup>-1</sup>. Silva et al. (2014) verificaram melhora no parâmetro Fv/Fm em plantas de abacaxizeiro quando inoculadas com fungos micorrízicos, tendo como consequência a diminuição na perda de energia pelas plantas em forma de calor. A redução nos valores de Fv/Fm são indicativos de fotoinibição, representando perdas na eficiência do aproveitamento da luz pelas plantas (THACH et al., 2007).

A fluorescência é também conhecida como uma das partes da energia que as plantas absorvem e que é perdida, ou seja, não utilizada para a produção de energia (BAKER & ROSENQVIST, 2004). A eficiência máxima do PSII (Fv/Fm) é o parâmetro fisiológico que melhor define o estado fotossintético em que a planta se encontra, onde valores inferiores a 0,83 podem representar indicativos de estresse e caso se agrave, de um futuro dano no aparato fotossintético das plantas (ROUSSEAU et al., 2013). A inoculação dos fungos ectomicorrízicos nas plantas de erva-mate melhorou o parâmetro Fv/Fm (Figura 6B) em doses elevadas de cobre (acima de 240 mg kg<sup>-1</sup>), possibilitando redução na perda de energia pelas plantas na forma de calor, promovendo melhora na taxa fotossintética.

Figura 6 – Taxa de transporte de elétrons ( $ETR_{1500}$ ) (A), Eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) (B) e desdobramentos dos efeitos simples significativos dos fatores de variação para o rendimento quântico efetivo do PSII ( $Y_{II}$ ) (C e D) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre.



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019). \*Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Não houve interação significativa entre o fator inoculação e doses de cobre para o rendimento quântico efetivo do PSII ( $Y_{II}$ ). Ao analisar o efeito simples inoculação, evidencia-se que os resultados nos tratamentos com inoculação foram superiores aos da testemunha, não diferindo entre os isolados (Figura 6C). O rendimento quântico efetivo do PSII ( $Y_{II}$ ) é indicador da fração de energia absorvida pela clorofila associada ao PSII que foi utilizada na etapa fotoquímica, informando a quantidade de elétrons transportados e funcionando como indicativo de como está a fluidez do processo fotossintético (LICHTENTALER et al., 2005). Este resultado evidencia maior rendimento quântico efetivo do PSII ( $Y_{II}$ ) com a presença dos isolados ectomicorrízicos, revelando maior aproveitamento de energia luminosa pelas plantas

em comparação ao sem inoculação, culminando em maior proporção de energia absorvida pelas mesmas.

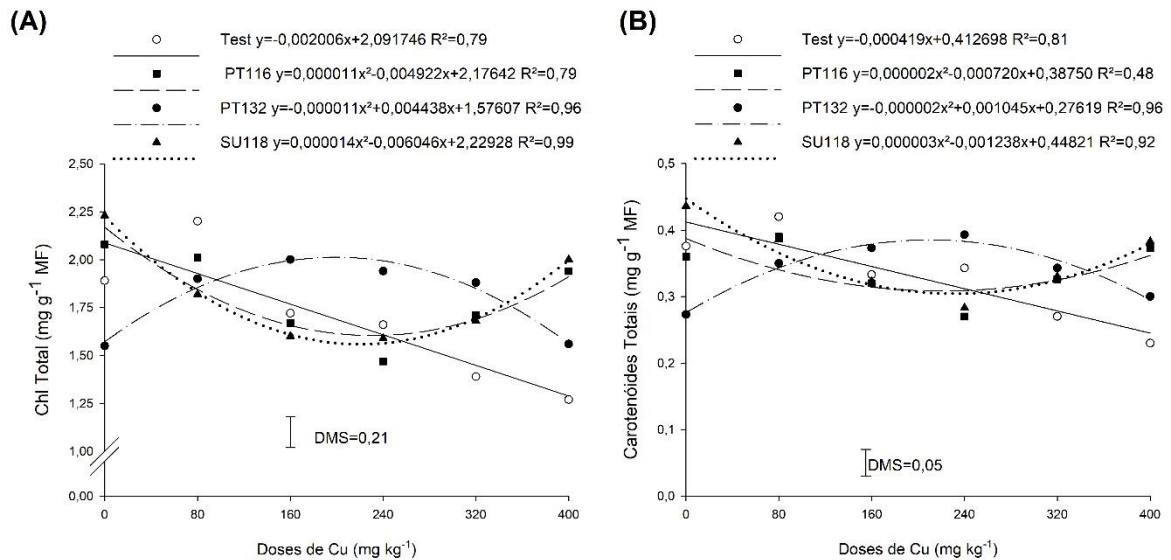
Desdobrando o efeito simples de doses para o rendimento quântico efetivo do PSII (YII) evidencia-se efeito quadrático com ponto de máxima na dose estimada de cobre de 149,5 mg kg<sup>-1</sup> de solo (Figura 6D). As espécies *E. dunnii* e *E. grandis*, submetidas a solo contaminado por cobre podem ter sofrido danos no fotossistema II, refletindo em redução do rendimento quântico efetivo do PSII (YII), prejudicando também o menor crescimento e desenvolvimento de planta (NEGRINI, 2017). Podemos relacionar com o crescimento de planta, onde com os isolados ectomicorrízicos também foram maiores, demonstrando maior eficiência do aparato fotossintético.

### 3.5.5 Parâmetros da clorofila

Os teores de clorofila total (Chl a + Chl b) nas folhas apresentaram redução linear para testemunha com decréscimo de 38,7%. Para tanto, as inoculações promoveram redução quadrática nos teores de clorofila com a adição das doses de cobre nos isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118,, onde atingiram teores de 1,80 e 2,05 mg g<sup>-1</sup> MF, respectivamente, na maior dose testada (Figura 7A). Marques et al. (2018), trabalhando com mudas de *Hymenaea courbaril* e *Peltophorum dubium* verificaram tendência de redução nos teores de clorofila total nas plantas para a maior concentração de cobre no solo (400 mg kg<sup>-1</sup>), quando comparadas às plantas do tratamento controle. Vários autores relataram o efeito do excesso de cobre na clorofila, resultando na degradação deste pigmento (NAIR et al., 2014; ADREES et al. 2015), estando de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho no tratamento sem inoculação.

A toxicidade do cobre diminui a biossíntese, além de reduzir o conteúdo de clorofila, devido a danos nas membranas tilacóides (ADREES et al., 2015). No entanto, nas plantas inoculadas com os fungos UFSC-PT116 e UFSC-SU118 não foram observados sintomas visíveis de clorose nas folhas pela redução de clorofila e o crescimento das plantas não foi afetado negativamente. É possível que esse resultado esteja relacionado aos mecanismos que as plantas micorrizadas usaram para evitar a translocação de cobre para a parte aérea, acumulando o cobre no sistema radicular. Ao estudar diversas plantas da família Fabaceae, Kaschuk et al. (2010) concluiu através de meta-análises, que a associação micorrízica aumentou a atividade fotossintética das plantas, resultando também, em aumento no teor de clorofila das mesmas.

Figura 7 – Teor de clorofila total (Chl total) (A) e carotenoides totais (B) de mudas de *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre.



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).

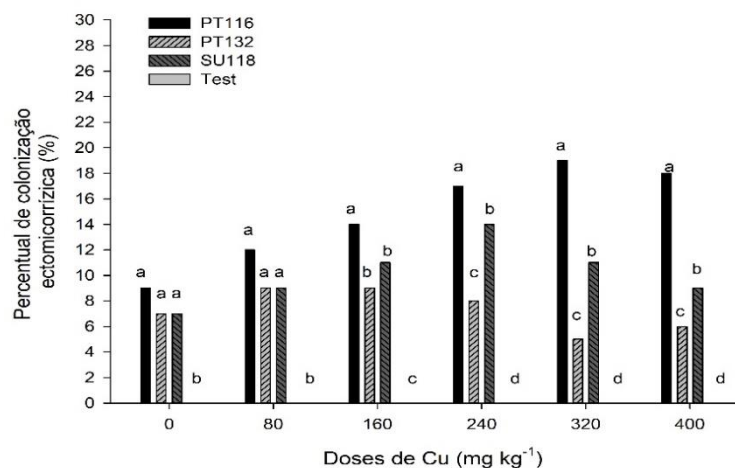
Os teores de carotenoides totais (Figura 7B) apresentaram redução linear no tratamento testemunha sem inoculação, na ordem de  $0,16 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ . As plantas inoculadas com os fungos UFSC-PT116 e UFSC-SU118 reduziram até as doses 180 e  $206,33 \text{ mg kg}^{-1}$ , porém após promoveram aumento nos teores de carotenoides, cerca de  $0,41$  e  $0,43 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ , respectivamente, resultando em valores  $39,8$  e  $41,8\%$  superiores que a testemunha na dose  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre no solo. Tristão et al. (2006) observaram concentrações mais elevadas de carotenoides em mudas de cafeeiro (*Coffea* sp.) inoculadas com micorrizas, representando valores  $49\%$  superiores as plantas não micorrizadas.

Assim como as clorofilas, os carotenoides são pigmentos que tem como função captar luz e auxiliar no processo fotossintético (KRISHNA et al., 2005), podendo agir como agentes antioxidantes, servindo de proteção às plantas a estresses oxidativos (FALK & MUNNÉ-BOSCH, 2010). Ainda, conforme Taiz et al. (2017), atuam como uma válvula de segurança, a qual libera o excesso de energia absorvido pelas folhas antes que gerem danos ao aparato fotossintético. Com isso, se pode inferir que a presença dos fungos ectomicorrízicos aumenta os teores de carotenoides (Figura 7B), amenizando possíveis riscos de estresses nas plantas, o que pode ter contribuído no melhor desenvolvimento das plantas micorrizadas nas doses de cobre testadas.

### 3.5.6 Percentual de colonização ectomicorrízica

Os resultados demonstraram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os isolados ectomicorrízicos e as doses de cobre para o percentual de colonização ectomicorrízica (Figura 8). Observa-se que os isolados ectomicorrízicos colonizaram as raízes de erva-mate com diferentes graus de intensidade, variando com a dose de cobre aplicada no solo. Destacando o isolado UFSC-PT116, com mais de 17, 19 e 18% de colonização nas doses 240, 320 e 400 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Já o isolado UFSC-SU118 apresentou seu maior percentual de colonização (14%) na dose 240 mg kg<sup>-1</sup>, reduzindo nas doses mais elevadas, enquanto o isolado UFSC-PT132 apresentou colonização micorrízica nas doses 0 e 80 mg kg<sup>-1</sup> igual aos demais inóculos, enquanto na dose 160 mg kg<sup>-1</sup> não diferiu do isolado UFSC-SU118 em todas as doses de cobre estudadas (Figura 10). Em estudo com o isolado UFSC-PT116, Souza et al. (2012) obtiveram valores próximos de 20% de colonização na espécie *Eucalyptus grandis*, o mesmo autor salienta a necessidade de haver seleção de isolados fúngicos que tenham eficiência em estabelecer a ectomicorriza com determinadas espécies de plantas.

Figura 8 – Percentual de colonização micorrízica dentro de cada dose testada para *Ilex paraguariensis* sem e com inoculação de fungos ectomicorrízicos em solo contaminado com cobre.



Fonte: Autor (2019).

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na mesma dose pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) de probabilidade de erro.

Segundo Moreira & Siqueira (2006), fungos ideais para inoculação em grande escala precisam colonizar amplamente o sistema radicular e promover resposta benéfica na planta. Graziotti et al. (2003) preconizam a seleção de isolados fúngicos que tenham eficiência na simbiose que possibilitem uma interação entre o fungo e a planta. O isolado UFSC-PT116



apresentou as maiores taxas de colonização radicular, revelando uma maior afinidade em se associar com a erva-mate, promovendo maior resistência das plantas quando submetidas ao solo contaminado por cobre.

### 3.6 CONCLUSÕES

A inoculação de mudas de *Ilex paraguariensis* com ectomicorrizas UFSC-PT116, UFSC-PT132 e UFSC-SU118 ameniza o efeito de fitotoxicidade provocado pelo excesso de cobre no solo.

O isolado ectomicorrízico UFSC-PT116 promove, entre os três testados, o maior crescimento e tolerância de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre.

A inoculação de ectomicorrizas em *Ilex paraguariensis* promove menor acúmulo de cobre nas plantas em solos contaminados por este metal pesado.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 21-26, 1998.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: SBCS, 2000. p. 299-352.

ADREES, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F.; FARID, M. ET AL. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review: *Environmental Science and Pollution Research International*. 2015; 22:8148-62.

ALI, H.; KHAN, E.; ANWAR, M. Chemosphere Phytoremediation of heavy metals — Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.

AMBROSINI, V.G., ROSA, D.J., PRADO, J.P.C., BORGHEZAN, M., MELO, G.W.B., SOARES, C.R.F.S., COMIN, J.J., SIMÃO, D.G., BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiol. Biochem.** 96, 270–280, 2015.

ANDREAZZA, R. et al. Bacterial stimulation of copper phytoaccumulation by bioaugmentation with rhizosphere bacteria. **Chemosphere**, v. 81, p. 1149-1154, 2010.

ANVISA, Decreto n° 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n° 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n° 691, de 13 de março de 1962. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Data de acesso: 22/05/19.

- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–21, 2004.
- BARKER, S. J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, v.116, n.4, p.1021-1207, 1998.
- BERTOLAZI, A. A. et al. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. **Natureza Online**, Santa Teresa, v. 8, p. 24-31, 2010.
- BOCHICCHIO, R., SOFO, A., TERZANO, R., GATTULLO, C.E., AMATO, M., SCOPA, A. Root architecture and morphometric analysis of *Arabidopsis thaliana* grown in Cd/Cu/Zn gradient agar dishes: a new screening technique for studying plant response to metals. **Plant Physiol. Biochem.** 91, 20–27, 2015.
- BOWN, A. W.; HALL, D. E.; MACGREGOR, K. B. Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4 aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p 1430-1434, 2002.
- 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.
- BRUNDRETT, M. C. **Mycorrhizal Associations**: the web resource. 2008. Disponível em: <mycorrhizas.info>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B. Working with mycorrhizal in forestry and agriculture. Canberra: ACIAR, 1996. 400p.
- CAIRES S. M. et al. Desenvolvimento de mudas de cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1181-1188, 2011.
- CAMBROLLÉ, J., MANCILLA-LEYTÓN, J.M., MUÑOZ-VALLÉS, S., LUQUE, T., FIGUEROA, M.E. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere** 86, 867–874, 2012.
- CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; OCETE, R.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**. 2013;93(2):294-301.
- CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F.; ARAUJO, D. L.; FRANÇA, C. P. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-mansão. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 2, p. 167-176, 2010.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 15 jan. 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.
- DARTORA, N. Avaliação dos polissacarídeos e metabolitos secundários das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de processamento. 2010. 109

f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

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

DE MARCO, R.; SILVA, R.F.; ROS, C.O.; VANZAM, M.; BOENO, D. *Senna multijuga* and peat in phytostabilization of copper in contaminated soil. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiente**. v.21 n.6, Campina Grande, 2017.

DELLAI, A.; SILVA, R. F.; ANDREAZZA, R. Ectomicorriza no crescimento de *Eucalyptus saligna* em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 624-631, abr- jun., 2018.

DELLAI, A.; SILVA, R. F.; PERRANDO, E.R.; JACQUES, R. J. S.; GROLLI, A. L.; MARCO, R. D. Óleo de eucalipto e *Pisolithus microcarpus* no crescimento de bracatinga em solo contaminado por cobre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 2014; 18(9): 927-933. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n09p927-933>.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **The Forestry Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960.

FALK, L.; MUNNÉ-BOSH, S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 61, n. 6, p. 1549-1566, 2010.

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

FERREIRA, P. A. A. S. et al. Estratégias de amenização da fitotoxidez de metais pesados em solos de vinhedos. **Embrapa Uva e Vinho**, v 1, p. 111–138, 2016.

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 (VQR) dos solos para nove elementos químicos naturalmente presentes nas diferentes províncias geomorfológicas/geológicas do estado do Rio Grande do Sul.

FORGATY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanins and their interactions with metal. **Enzyme and Microbial Technology**, Kyungbug, v. 19, n. 4, p. 311-317, 1996.

GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 11, p. 25-60, 1993.

GAUTAM, S.; ANJANI, K.; SRIVASTAVA, N. In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). **Physiology and Molecular Biology of Plants**. 2016;22(1):121-9.

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.

GRASSI FILHO, H. **Cobre na planta**. In: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS. Departamento de Recursos Naturais. Ciência do Solo, 2005. Disponível em: <<http://www.ciencialivre.pro.br/media/5d14138ca192e610ffff81e2ffffd523.pdf>>. Acesso em: 8 de janeiro 2019.

- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso de metais pesados. **Tópicos em Ciência do Solo**, v.5, p.55-105, 2003.
- GUIMARÃES, P.R., AMBROSINI, V.G., MIOTTO, A., CERETTA, C.A., SIMÃO, D.G., BRUNETTO, G. Black Oat (*Avena strigosa* Schreb.) Growth and root anatomical changes in sandy soil with different copper and phosphorus concentrations. **Water Air Soil Pollut.** 227, 192–201, 2016.
- HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. (eds). **Methods in Comparative Plant Ecology**. London: Chapman & Hall, 1993. P.148-152.
- JACQUES, R.A. *et al.* The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.14, n.1, p.6-12, 2007.
- JORGE, L. A. C.; SILVA, D. J. C. B. **Safira: Manual de utilização**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010.
- KABATA-PENDIAS A. Trace elements in soils and plants. 4. ed. Boca Raton: CRC Press; 2011.
- KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. 4.ed. New York: Boca Raton, 2010. 548p.
- KASCHUK, G. *et al.* Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation os symbioses. **Soil Biology and Biochemistry**. V. 42, p. 125-127, 2010.
- KRISHNA, H. *et al.* Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinífera* L.) plantlets due to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during *ex vitro* acclimatization. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 4, p.554-567, 2005.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany** v. 47, p. 259–266, 1996.
- LEQUEUX, H. *et al.* Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 673-682, 2010.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Method. Enzymol.** 148, 350-382. 1987.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMAN, KANAPP, M. How to correctly determine the diferente chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio Rfd of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**, v. 43, p. 379-393, 2005.
- LORENZI, Harri. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 2000. v. 1.
- MARQUES, D. M.; SILVA, A. B.; MANTOVANI, J. R.; PEREIRA, D. S.; SOUZA, T. C. Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. Viçosa: **Revista Árvore**, v. 42, n. 2, 2018.

- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathologist**, Saint Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.
- MATEOS-NARANJO, E., ANDRADES-MORENO, L., CAMBROLLÉ, J., PEREZ-MARTIN, A. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: ecotoxicological implications. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 90, 136–142, 2013.
- MANN; RITCHIE, P. G. S. P. Influence of pH on on the the Forms Forms of Cadmium in Four West Australian Australian Soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 31, p. 255–270, 1993.
- 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, jun., 2003.
- 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.; SIQUEIRA, J. O. S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- NAIR PMG, KIM S, CHUNG IM. Copper oxide nanoparticle toxicity in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: physiological and molecular level responses of in vitro grown plants. **Acta Physiologiae Plantarum**. 2014;36(11):2947-58.
- NEGRINI, A. Amenizante orgânico e micorrizas arbusculares em mudas de eucalipto cultivadas em solo contaminado com cobre. Dissertação de **mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente. UFSM. 2017, 71p.
- OLIVEIRA, J. G.; ALVES, P. L. C. A.; MAGALHÃES, A. C. The effect of chilling on the photosynthetic activith in coffe (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 95-104, 2002.
- PULFORD, I. D.; WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees a review. **Environment International**, v. 29, p. 529-540, 2003.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2007. 906 p.
- ROSSETO, P. et al. Densidade de esporos de fungos micorrizicos arbusculares do banco de germoplasma de *Glomales* DA UNIPAR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 15, n. 1, p. 43–47, 2012.
- ROUSSEAU, C.; BELIN, E.; BOVE, E.; ROUSSEAU, D.; FABRE, F.; BERRUYER, R.; GUILLAUMES, J.; MANCEAU, C.; JACQUES, M. A.; BOUREAU, T. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2013.
- SAIDELLES, A. P. F; KIECHNER, R. M ; SANTOS, N. R. Z; FLORES, E. M. M; BARTZ, F.B. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate no sul do Brasil. Araraquara. **Alim. Nutri**. V.21, n.2, p.259-265, 2010.

- SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. **Journal of Plant Research**. 2014; 127:119-29.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**. 2012;9:671. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- SILVA, I. C.; ROCHA, C.; ROCHA, M. C.; SOUSA, C. M. Growth of *Brachiaria decumbens* in Latosol contaminated with copper. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, vol.42, n.2, 2018.
- SILVA, R. F. et al. Peat influence on Zn tolerance, bioconcentration and bioaccumulation in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 5, p. 320–326, 2017.
- SILVA, R. F.; ROS, C. O.; DELLAI, A.; GROLLI, A. L.; SCHEID, D. L.; VIEL, P. 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**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 647-655, 2016.
- SILVA, R. F.; ROS, C. O.; SCHEID, D. A.; GROLLI, A. L.; DE MARCO, R.; MISSIO, E. L. Copper translocation and tolerance in seedlings of tree species grown in contaminated soil. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiente**. v.19, n.11, Campina Grande Nov. 2015.
- SILVA, M. C. S. et al. Efeito da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e de *Piriformorpha indica* sobre parâmetros fotossintéticos de abacaxizeiro. In: FERTBIO – FERTILIDADE E BIOLOGIA DO SOLO: INTEGRAÇÃO E TECNOLOGIA PARA TODOS, 2014, Araxá, MG. Anais. Araxá: FERTBIO. 411p. 2014.
- SILVA, R. F.; SAIDELLES, F. L.F; SILVA, A. S.; BOLZAN, J.S. Influência da contaminação do solo por cobre no crescimento e qualidade de mudas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. Zucc.) e aroeira-vermelha (*Schinus therebinthifolius* Raddi). **Ciência Florestal**, v.21, p.111-118, 2011.
- SILVA, R. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; LUPATINI, M.; TRINDADE, L. L.; SILVA, A. S. Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) taub.) inoculadas com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. **Ciência Florestal**, v.20, p.147-156, 2010.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. Mycorrhizal symbiosis. 3.ed., San Diego: Academic Press, 2008. 787p.
- SOARES, C. R. F. S. et al. Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 3, p. 213-225. mar, 2000.
- SOUSA, N. R. et al. Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. **Journal of Environmental Management**, London, v. 95, p. 269-274, 2012.
- SOUZA, E. L.; ANTONIOLLI, Z. I.; MACHADO, R. G.; ECKHARDT, D. P.; DAHMER, S. F. B.; SCHIRMER, G. K. Efeito da inoculação com isolados de fungos ectomicorrízicos sobre

o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 251-261, abr.-jun., 2012.

SOUZA, V. C. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, p. 612-618, 2006.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K.; SILVA, R. F. Óleo essencial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden no estímulo à micorrização de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 69-78, jan-mar., 2012.

SVS/MS, Portaria N° 685 de agosto de 1998. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br>. Data de acesso: 22/05/19.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2017, 888p.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

THACH, L. B.; SHAPCOTT, A.; SCHMIDT, S.; CRITCHLEY, C. The OJIP fast fluorescence rise characterizes Graptophyllum species and their stress responses. **Photosynthesis Research**, v. 94, n. 2-3, p.423-436, 2007.

TRISTÃO, F. S. M.; ANDRADE, S. A. L.; SILVEIRA, A. P. D. S. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos comerciais. **Bragantia**, v.64, n.4, p.649-658, 2006.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3050 B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils**. Washington, 1996. 12p.

WEIRICH, S. W.; SILVA, R. F.; PERRANDO, E. R.; ROS, C. O.; DELLAI, A.; SCHEID, D. L.; TROMBETA, H. W. Influência de ectomicorizas no crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis*, *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 765-765, abr.- jun., 2018.

WENDLING I, DUTRA L. F. Produção de mudas de eucalipto por sementes. In: Wendling I, Dutra LF. Produção de mudas de eucalipto. Colombo: Embrapa Florestas; 2010.

WILKINS, D. A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root grown. **The New Phytologist**, v. 80, p. 623-633, 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. 408, p. 100-108, 2011.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, Vitória, v. 36, p. 409-430, 2009.

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, p. 1090-1109, 2013.

## 4 CAPÍTULO II - COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE COBRE EM *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

### 4.1 RESUMO

A elevada concentração de cobre no solo é tóxica ao desenvolvimento dos vegetais. A sua biodisponibilidade no solo pode ser reduzida com o uso de compostos orgânicos devido ao aumento da adsorção e reações de complexação. Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do composto de água residuária de suinocultura (CARS) no crescimento e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* em solo contaminado com cobre. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2 x 6), sem e com contaminação (teor natural do solo e 400 mg kg<sup>-1</sup> e seis proporções (v:v) de amenizante (CARS) adicionadas ao solo: 0 (zero), 10, 20, 30, 40 e 50%), com 7 repetições. Avaliou-se a altura da parte aérea, diâmetro do colo, número de folhas, massa seca da parte aérea e sistema radicular, massa seca total, índice de qualidade de Dickson, área foliar, volume radicular, área superficial específica de raízes, teores e acúmulo de cobre na parte aérea e radicular e índice de translocação. O CARS adicionado ao solo promove aumento do cobre pseudo-total e da fração de cobre adsorvida à matéria orgânica. A proporção média de 30% de CARS no solo proporciona efeito amenizante da toxidez do cobre no solo, favorecendo o crescimento e reduzindo o acúmulo de cobre nas plantas de *Ilex paraguariensis*.

**Palavras-chave:** Erva-mate. Composto orgânico. Metal pesado.

### 4.2 ABSTRACT

The high concentration of copper in the soil is toxic to the development of plants. It's bioavailability in soil can be reduced with the use of organic compounds due to increased adsorption and complexation reactions. The objective of this work was to evaluate the effect of swine wastewater on the growth and accumulation of copper in *Ilex paraguariensis* plants in soil contaminated with copper. The experimental design was completely randomized in factorial arrangement (2 x 6), without and with contamination (natural soil content and 400 mg kg<sup>-1</sup> and six additive proportions (v: v) added to soil: 0 (zero), 10, 20, 30, 40 and 50%) with 7 replicates. Leaf dry mass, root dry mass and root system, total dry mass, Dickson quality index, leaf area, root volume, root specific surface area, leaf area, copper accumulation in shoot and root and translocation index. The CARS added to the soil increases the pseudo-total copper and the fraction copper adsorbed to the organic matter. The CARS average proportion of 30% of CARS in the soil provides a softening effect of the copper toxicity in the soil, favoring growth and reducing accumulation in *Ilex paraguariensis* plants.

**Key-words:** Mate-herb. Organic compost. Heavy metal.



### 4.3 INTRODUÇÃO

O cobre é um dos elementos essenciais ao desenvolvimento e crescimento dos vegetais, apesar de também ser classificado como um metal pesado (YRUELA, 2013). A contínua utilização desse elemento pelo homem resulta no aumento da contaminação do meio ambiente, tornando-se uma problemática que exige intensa pesquisa (ANDREAZZA et al., 2013). O uso desenfreado de agroquímicos na agricultura, extração de minérios e distribuição de lamas de esgoto são as atividades que originam as principais fontes de cobre nos solos (ANDRADE et al., 2010). Desse modo, quando esse elemento químico estiver em concentrações elevadas no solo, causará diversas alterações morfológicas e fisiológicas nos vegetais (FERREIRA et al., 2016). De acordo com a Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), portaria N° 85/2014, o valor de referência de qualidade (VQR) em áreas agrícolas para cobre total em solos originados de rochas vulcânicas do planalto do estado do Rio Grande do Sul é de 203 mg kg<sup>-1</sup> (FEPAM, 2014).

A espécie *Ilex paraguariensis* St. Hil. é uma planta da família Aquifoliaceae, conhecida popularmente como erva-mate (LORENZI, 2008), produzida e comercializada principalmente no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina (BRACESCO, 2011). A erva-mate apresenta grande importância econômica no Brasil, especialmente na Região Sul (FAOSTAT, 2013). A utilização da erva-mate para o consumo humano pode ser associada com fins alimentícios, terapêuticos e cosméticos (SAIDELLES et al., 2010). Entretanto, apesar da sua importância e grande utilização com fins alimentares, principalmente na forma de chimarrão, ainda é escasso o conhecimento sobre o desenvolvimento da erva-mate em locais contaminados por cobre, erva-mate tornando-se importante o estudo do acúmulo deste metal na planta.

A utilização de compostos orgânicos reduz a biodisponibilidade dos metais no solo através de reações de adsorção e de complexação (PARK et al., 2011). Em decorrência da presença de substâncias ricas em grupos funcionais com cargas negativas em sua constituição, tais como ácidos carboxílicos, hidroxilas fenólicas e alcoólicas (MORREIRA et al., 2012), a matéria orgânica pode promover significativa redução da disponibilidade de metais no solo, favorecendo o estabelecimento e desenvolvimento de plantas em locais com altos níveis de contaminação (GABOS et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2012), pois a matéria orgânica é considerada o principal ligante para metais pesados (JORGE et al., 2010).

Embora na literatura sejam escassos trabalhos relacionados à estabilização de metais com compostos orgânicos, estudos realizados por De Marco et al. (2017) demonstram que a

utilização material orgânico turfa em solo contaminado com cobre favorece o crescimento de mudas de pau-cigarra (*Senna multijuga* (L. C. Rich.) H. S. Irwin & Barneby), além de promover maior acúmulo do metal nas raízes.

O composto de água residuária de suinocultura (CARS) se mostra como uma alternativa de agente amenizante pelas suas características orgânicas, sendo fonte de matéria orgânica e de nutrientes. O trabalho de Negrini (2017) tem demonstrado o efeito benéfico do uso do CARS como amenizante da toxidez do cobre no solo em plantas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. A produção deste composto consiste na mistura de águas residuárias de suinocultura com material celulósico (serragem ou maravalha) em leiras de compostagem, que condiciona a absorção e evaporação da fração líquida, com posterior decomposição da fração sólida e eliminação de microrganismos patogênicos, sendo utilizado como adubo orgânico após a sua estabilização (PRÁ et al., 2005). Deve ser observado que o dejetos líquido de suínos por si só aumenta a concentração de Cu no solo, porém, o composto tem um efeito potencial de amenização diferenciado.

Considerando o potencial de utilização do CARS como amenizante, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do composto de água residuária de suinocultura (CARS) no crescimento e acúmulo de cobre em plantas de *Ilex paraguariensis* em solo contaminado com cobre.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Local

O experimento foi conduzido em ambiente protegido, na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *Campus* de Frederico Westphalen, entre os meses de agosto e dezembro de 2018. O clima é classificado como Cfa de acordo com Köppen & Geiger.

### 4.4.2 Delineamento

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 6, com duas doses de cobre [sem (teor natural do solo) e com adição de 400 mg kg<sup>-1</sup>] e seis proporções de CARS [0 (zero), 10, 20, 30, 40 e 50%] adicionadas ao solo (v v<sup>-1</sup>), sendo estas proporções do volume final, com sete repetições. A adição de 400 mg de Cu kg<sup>-1</sup> corresponde

a duas vezes o limite máximo estabelecido para o elemento em solos derivados do basalto que é de 203 mg kg<sup>-1</sup>, conforme a portaria N° 85/2014 (FEPAM, 2014).

#### 4.4.3 Solo e Composto de água residuária de suinocultura

O solo utilizado no experimento foi caracterizado como um Latossolo Vermelho, derivado de rochas basálticas, com valores na camada de 5 – 20 cm de 5,3 de pH em água (1:1); 19,0 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica e 620,0 g kg<sup>-1</sup> de argila. Os teores de nutrientes disponíveis estão especificados na tabela 1, determinados conforme metodologia de Silva et al. (2009).

O composto orgânico utilizado foi o composto de água residuária de suinocultura (CARS), compostado com maravalha em um sistema de compostagem com aerador coloidal durante seis meses, advindo de uma unidade de criação de suínos no município de Rodeio Bonito, região do Alto Uruguai – RS. A caracterização indicou 7,0 de pH; 317,8 g kg<sup>-1</sup> de carbono orgânico; 9,7 mS cm<sup>-1</sup> de condutividade elétrica e 16,5 de relação carbono/nitrogênio. Os teores disponíveis e totais de nutrientes estão especificados na tabela 1, quantificados pelas metodologias descritas por Silva et al. (2009) e por Miyazawa et al. (2009), respectivamente.

Tabela 1 – Teores de nutrientes disponíveis e totais no solo e no composto de água residuária de suinocultura (CARS) utilizado no cultivo de mudas de *Ilex paraguariensis*.

	Ca	Mg	N	P	K	Cu
	-----Teores disponíveis (mg kg <sup>-1</sup> )-----					
Solo	1.020	384	nd*	7	126	13
CARS	4.961	3.646	604	3.830	8.232	42
	-----Teores totais (mg kg <sup>-1</sup> )-----					
Solo	Nd	nd	nd	nd	nd	168,5**
CARS	15.624	5.236	19.350	8.133	8.763	352

\*nd: não determinado. \*\*Teor pseudo-total no solo, determinado conforme a metodologia 3050b, descrita em USEPA (1996). Fonte: Autor (2019).

#### 4.4.4 Sementes e Unidade Experimental

As sementes da espécie de erva-mate utilizadas no experimento foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), unidade de Chapecó, SC. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos e lavadas em água destilada por 5 minutos, semeadas em sementeira contendo substrato, marca Carolina Soil®, que foi esterilizado em autoclave a temperatura de 121°C, em

3 ciclos de 30 minutos, sendo irrigadas diariamente com água destilada, de forma a manter o substrato levemente úmido. Quando as mudas apresentaram um par de folhas definitivas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade volumétrica de 1.000 cm<sup>3</sup>. Cada vaso plástico com uma muda foi considerado uma unidade experimental (UE).

#### 4.4.5 Instalação e condução do experimento

A dose 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre foi aplicada 30 dias antes do transplante das mudas na forma de solução de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), sendo diluídas em 50 ml de água destilada para possibilitar homogeneização em sacos plásticos. No momento do transplante das mudas foram coletadas amostras de solo para a determinação dos teores de cobre pseudo-totais, conforme metodologia 3050b, descrita em USEPA (1996) e dos teores de cobre ligado a matéria orgânica, conforme descrito por Mann e Ritchie (1993).

O experimento foi conduzido durante 120 dias após o transplante das mudas e neste período foi adicionado água, com uso de um becker graduado, mantendo-se a umidade do solo a 80% da capacidade de campo. Para atender às exigências do delineamento, a cada dez dias foi realizado rodízio das UEs.

#### 4.4.6 Avaliação morfológica

Ao final do experimento foi quantificada a altura da parte aérea (H), com régua graduada, medida do colo das mudas até o ápice caulinar; o diâmetro do colo (DC), medida com paquímetro digital marca Black Jack Tools®; o número de folhas (NF); a massa seca da parte aérea (MSPA) e sistema radicular (MSR), ambos separados na região do colo da muda e secos em estufa a 60±1°C, até atingir massa constante, posteriormente pesadas em balança analítica e determinada a massa seca total (MST) pela soma das MSPA e MSR. Foi calculado o índice de qualidade de Dickson (IQD), de acordo com a Equação 1 (DICKSON, 1960).

$$IQD = \frac{MST}{\frac{H}{DC} + \frac{MSPA}{MSR}} \quad (1)$$

Antes de secá-las, as raízes foram separadas do solo por meio de lavagem em água corrente usando peneiras com malha de 0,5 mm de diâmetro. Posteriormente, ocorreu a digitalização das raízes com o uso de escâner (HP D110) e a determinação da área superficial

específica (ASE), o comprimento radicular (CR) e o volume radicular (VR) pelo processamento das imagens no programa Safira 2.0 (JORGE & SILVA, 2010). A área foliar (AF) foi medida e analisada pelo software ImageJ® (versão 2.0; US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA), utilizado para medir todas as imagens off-line.

#### 4.4.7 Metal no solo e planta

Ao final do experimento foram coletadas amostras de solo de cada tratamento e utilizando-se 0,5g de solo foram determinados os teores pseudo-totais, conforme a metodologia 3050b, descrita em USEPA (1996), e os teores de cobre ligado à matéria orgânica pela metodologia adaptada de Mann & Ritchie (1993), com posterior determinação em espectrofotometria de absorção atômica, conforme descrito por Miyazawa et al. (2009). Foram determinados

As massas secas da parte aérea e raízes foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha de 10 mesh para a determinação das concentrações de cobre no tecido vegetal, por meio de extração nítrico-perclórica (3:1) e quantificação por espectrofotometria de absorção atômica, conforme Miyazawa et al. (2009).

Com base nos dados de massa seca e da concentração de cobre foi calculada a quantidade acumulada de cobre ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) na parte aérea (CuAPA), no sistema radicular (CuAR) e no total das mudas (CuAT). Com as quantidades acumuladas na proporção zero de amenizante ( $d_0$ ) e nas proporções de 10 à 50 % de amenizante ( $d_n$ ), foi calculado o índice de translocação ( $I_{tra}$ ), com base na Equação 2, que corresponde à porcentagem total absorvida de cobre pelas raízes que foi transportado para a parte aérea (ABICHEQUER & BOHNEN, 1998).

$$I_{tra} = \frac{\text{CuAPAd}_n}{\text{CuATd}_n} * 100 \quad (2)$$

#### 4.4.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise da variância com base no modelo matemático:  $Y_{ij} = m + a_i + d_j + (ad)_{ij} + e_{ij}$ , onde:  $Y_{ij}$  é uma observação referente ao tratamento "nível i do fator A com o nível j do fator D"; m é a média geral do experimento;  $a_i$  é o efeito do nível i do fator A;  $d_j$  é o efeito do nível j do fator D;  $(ad)_{ij}$  é o efeito da interação do nível i do fator A com o nível j do fator D;  $e_{ij}$  é o efeito aleatório do erro experimental.

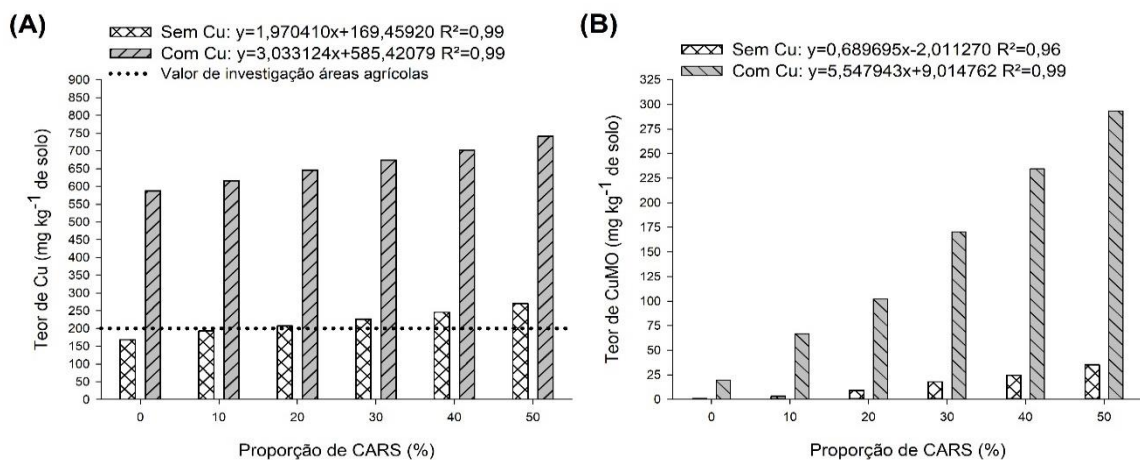
Os resultados foram submetidos a análise de variância e, quando evidenciaram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) foram submetidos à análise de regressão do fator de variação quantitativo (proporções de CARS) dentro de cada nível do fator qualitativo (sem e com cobre). Para os parâmetros que não apresentaram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ), analisou-se os efeitos simples de cada fator de variação, sendo o fator qualitativo pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e o quantitativo pela análise de regressão polinomial pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1 Teor de cobre no solo

O aumento da proporção de CARS adicionado ao solo elevou os teores pseudo-totais de cobre, indicando que a presença do metal no amenizante contribuiu para elevar os teores no solo (Figura 1A). A contribuição do CARS no aumento do teor de cobre pseudo-total no solo foi de forma linear, com valores de 19,7 e 30,3  $\text{mg kg}^{-1}$  para cada unidade de proporção do amenizante adicionado no solo, em condições naturais e com contaminação do elemento, respectivamente.

Figura 1 - Teores iniciais de cobre pseudo-total no solo (A) e adsorvido à matéria orgânica (B) em função das proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS) aplicadas em solo sem e com adição de 400  $\text{mg kg}^{-1}$  de cobre. O tracejado indica o valor de investigação para áreas agrícolas: 203  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu (FEPAM, 2014).



Fonte: Autor (2019).

Observa-se que o teor de cobre no solo sem a contaminação do elemento (condições naturais) ficou acima do limite máximo de investigação (203  $\text{mg kg}^{-1}$ ) para solos originados

de rochas vulcânicas da região do Planalto do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (FEPAM, 2014), a partir da proporção estimada de 17 % de CARS. Com a contaminação do solo com a adição de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ , foi encontrado variação no teor pseudo-total de cobre de 585,4 a  $737,1 \text{ mg kg}^{-1}$  para as proporções de zero e 50% do amenizante adicionado no solo, respectivamente, indicando valores entre 2,88 e 3,63 vezes superior ao limite máximo estabelecido pela portaria da FEPAM (2014).

A adição de CARS ao solo proporcionou aumento linear nos teores de cobre ligado à matéria orgânica, na ordem de 6,9 e  $55,48 \text{ mg kg}^{-1}$  para cada unidade de proporção do amenizante adicionado no solo, em condições naturais e com contaminação do elemento, respectivamente (Figura 1B). Pela afinidade que os metais possuem pelos sítios de sorção da matéria orgânica, a adição de compostos orgânicos pode reduzir a disponibilidade de metais pesados no solo (TIECHER et al., 2013) e por aumentar a complexação ou quelação à matéria orgânica (KABATA-PENDIAS, 2011).

Conforme Santos & Rodella (2007), os complexos formados entre metais e a fração orgânica do solo podem ser solúveis ou não, dependendo da natureza dos ligantes orgânicos. Os ácidos fúlvicos presentes na matéria orgânica formam complexos em geral solúveis, enquanto os complexos formados com ácidos húmicos são insolúveis (CANELLAS et al., 2001). Com isso, a adição de matéria orgânica através do CARS no solo possibilita efeito amenizante da toxidez do cobre às plantas.

#### **4.5.2 Parâmetros morfológicos das plantas**

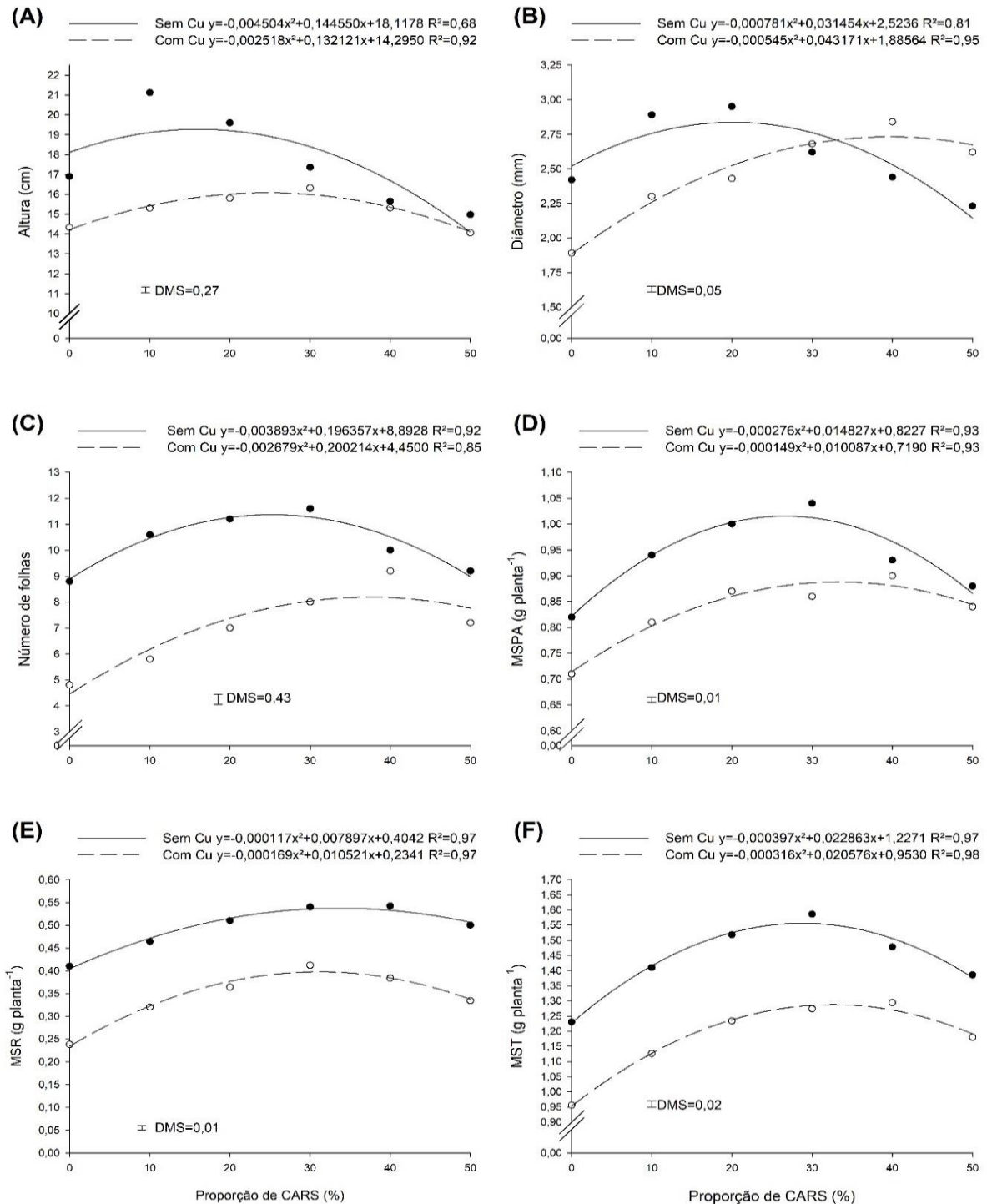
As plantas de erva-mate evidenciaram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos cobre e as proporções de CARS aplicadas no solo para os parâmetros de altura de plantas, diâmetro de colo, número de folhas, massa seca da parte aérea, radicular e total, área foliar, volume radicular, área superficial específica de raiz e índice de qualidade de Dickson.

As proporções de CARS aplicadas no solo induziram resposta quadrática na altura das plantas, diâmetro de colo e massa seca da parte aérea e radicular, indicando um ponto máxima resposta nos tratamentos sem e com contaminação de cobre (Figura 2).

A redução de crescimento das plantas a partir do ponto de máxima pode estar relacionada aos efeitos negativos da condutividade elétrica do CARS ( $9,7 \text{ mS cm}^{-1}$ ), que é atributo intrínseco que pode afetar o crescimento das mudas e é dependente da espécie vegetal, como relatado por Kratz et al. (2013). Em um estudo com mudas de *Toona*, Da Ros et al. (2017) encontraram redução no seu crescimento com uso de CARS associado a maior

condutividade elétrica ( $5,2 \text{ mS cm}^{-1}$ ) em comparação ao substrato comercial ( $0,7 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Estes resultados ressaltam da importância de delimitar uma proporção adequada de CARS para atuar positivamente como amenizante em solos contaminados com cobre.

Figura 2 – Altura (A), diâmetro de colo - DC (B), número de folhas (C), massa seca da parte aérea – MSPA (D), massa seca radicular - MSR (E) e massa seca total - MST (F) de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo sem e com adição de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre e diferentes proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS).



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).



A resposta a aplicação de CARS na altura de plantas foi até a proporção estimada de 16% do composto no tratamento sem cobre e de 26% no solo contaminado, atingindo alturas de 19,2 e 16,0 cm, respectivamente (Figura 2A). Utilizando material orgânico turfa em solo contaminado com cobre, De Marco et al. (2017) obtiveram maior altura em mudas de pau-cigarra (*Senna multijuga*), quando comparado ao solo sem o composto orgânico CARS. Os resultados de altura de plantas evidenciam que a adição do CARS pode ter reduzido o efeito tóxico do cobre nas plantas de erva-mate, pois o elemento quando presente em elevado teor disponível no solo interfere na cadeia de transporte de elétrons do fotossistema I das plantas, reduzindo a produção de fotoassimilados e o crescimento apical de forma significativa (TAIZ et al., 2017).

O diâmetro de colo aumentou até as proporções estimadas de 20,1 e 39,6% do composto nos tratamentos sem e com 400 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, com valores de 2,84 e 2,74 cm, respectivamente (Figura 2B). Estes dados indicam que é necessária uma proporção maior de amenizante no solo para reduzir os efeitos deletérios do cobre em solos contaminados. Em condições de baixa adição de amenizante, o diâmetro do colo foi menor em solo contaminando, corroborando com Silva et al. (2014), em estudo com mudas do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* (Mart.)), em que encontraram redução no diâmetro do colo em função de teores elevados de cobre no solo. De acordo com Almeida et al. (2007), o cobre pode causar distúrbios no crescimento e desenvolvimento das plantas, afetando negativamente o crescimento da parte aérea. Para transplante das mudas no campo, recomenda-se um diâmetro de colo mínimo de 2,0 mm (WENDLING & DUTRA, 2017), que foi obtido no tratamento sem adição de cobre ou com o uso de amenizando em solo contaminado com o elemento.

O número de folhas das plantas de erva-mate apresentou aumento quadrático, sendo que a proporção 37,3% de CARS promoveu crescimento de 84% no solo contaminado com cobre (Figura 2C). Estes resultados mostram que a erva-mate foi beneficiada com a presença do composto CARS, evidenciando redução do efeito tóxico do cobre no solo. A redução do crescimento da parte aérea pode ser consequência da deficiência nutricional causada pelas lesões nas raízes pelos elevados teores de cobre no solo (KOPITTKE & MENZIES, 2006).

A massa seca da parte aérea das plantas aumentou de forma quadrática, sendo que o tratamento sem adição de cobre evidenciou ponto de máxima na proporção 26,8% de CARS, enquanto com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre o ponto de máxima foi na proporção 33,8% do composto (Figura 2D). A utilização de turfa proporcionou maior massa seca da parte aérea no *Eucalyptus grandis* a partir de 60 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no solo, evidenciando que a adição da

turfa pode ter reduzido o efeito tóxico do metal (DE MARCO et al., 2017). A substituição do íon  $Mg^{2+}$  na molécula de clorofila por  $Cu^{2+}$ , resulta na quebra da fotossíntese (KÜPPER et al., 1996), provocando além da redução da massa seca, comumente sintomas de clorose na parte aérea das plantas (YRUELA, 2013). Na ausência do composto orgânico, foi observado neste trabalho que as plantas de erva-mate apresentaram sintomas de clorose, além dos menores valores de massa seca aérea em relação ao tratamento com uso do CARS como amenizante.

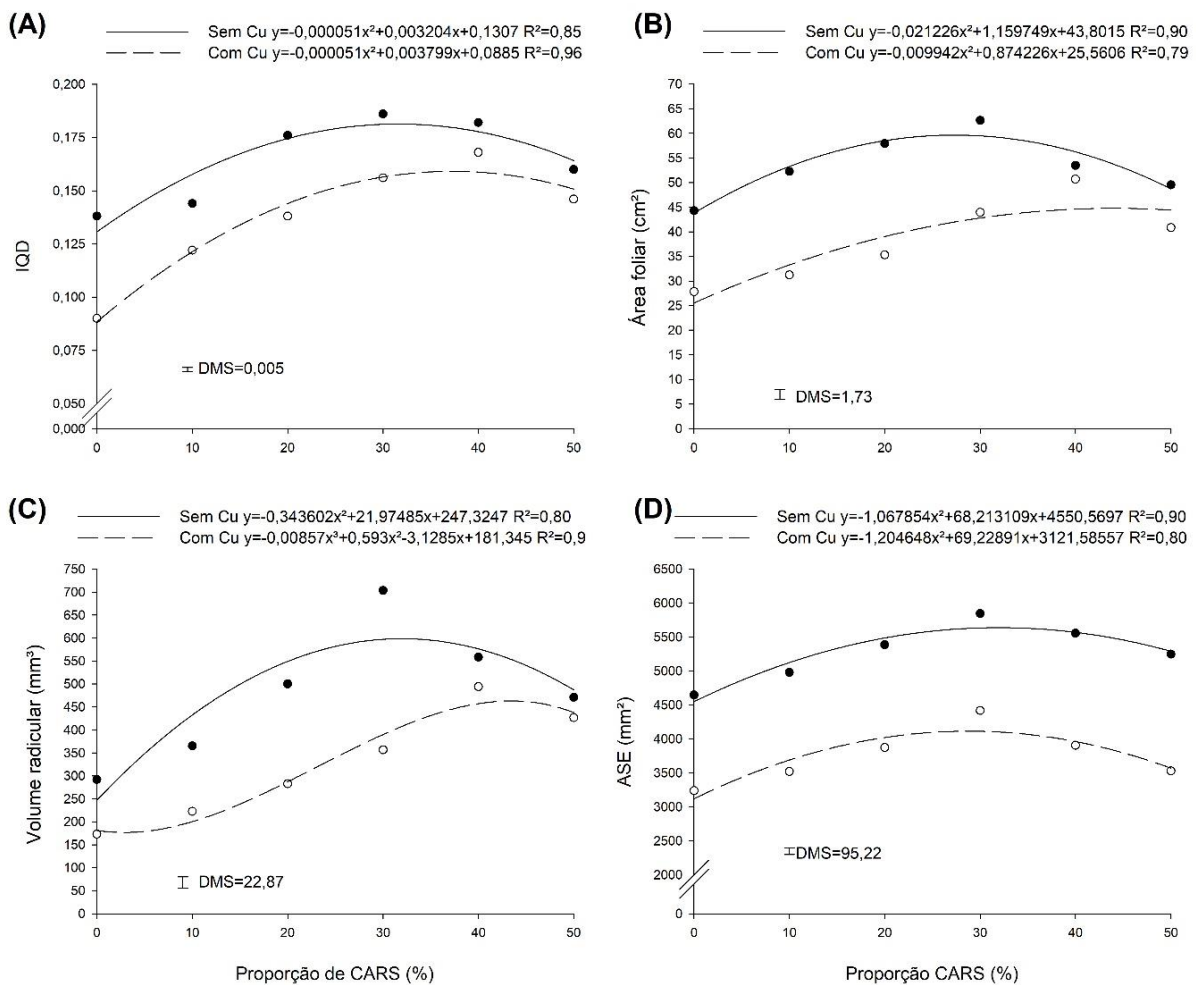
A massa seca radicular aumentou de forma quadrática com ponto de máxima na proporção de 33,7 e 31,1% de CARS nos tratamentos sem e com cobre, respectivamente (Figura 2E). Em um estudo com mudas de *E. grandis* e *E. saligna* em solo contaminado com  $400\text{ mg kg}^{-1}$  de cobre, Negrini (2017) encontrou maior massa seca radicular com a proporção de 49,5 e 47,0 % de CARS para as duas espécies florestais, respectivamente. Conforme descrito por Dellai et al. (2014), doses de cobre de até  $240\text{ mg kg}^{-1}$  reduzem a massa seca radicular das mudas de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). Isso ocorre porque alto teor de cobre no solo inibe o crescimento radicular das plantas, sendo um dos sintomas mais evidentes de sua toxicidade (KUKKOLA et al., 2000). Com isso, o uso de compostos orgânicos promove maior acúmulo de massa seca e crescimento da raiz porque aumenta a adsorção do cobre no solo.

A massa seca total das plantas de erva-mate apresentou efeito quadrático com as proporções do composto, com ponto de máxima em 28,7 e 32,5% nos tratamentos sem e com cobre, respectivamente (Figura 2F). As mudas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link) e carne-de-vaca (*Pterogyne nitens* Tul) mostraram redução linear na massa seca da parte aérea e radicular com doses de cobre até  $300\text{ mg kg}^{-1}$  (SILVA et al., 2016). O excesso de cobre no solo provoca distúrbios na estrutura das proteínas e inibição do alongamento celular, induzida pelo aumento na permeabilidade da membrana plasmática e lignificação da parede celular, culminando em danos ao sistema radicular e à parte aérea, resultando na redução do desenvolvimento das plantas (YRUELA, 2013). Diante disso, o uso de compostos orgânicos causa redução do teor de cobre disponível na solução do solo e assim, promove maior desenvolvimento e acúmulo de matéria seca das plantas.

O índice de qualidade de dickson (IQD) apresentou resposta quadrática com o uso do amenizante CARS na proporção de 31,4% nas plantas submetidas ao solo sem contaminação e 37,2% nas plantas com contaminação de cobre (Figura 3A). De acordo com Silva et al. (2014) as plântulas de *Senna multijuga* não apresentaram alteração no IQD até atingirem a dose de  $450\text{ mg kg}^{-1}$  de cobre no solo. No cálculo do IQD são considerados variáveis morfológicas, dentre elas a massa seca aérea e massa seca radicular, que demonstram vigor da

planta (ROSSI et al.; 2008), onde IQD acima de 0,20 indica maior padrão de qualidade de mudas (DICKSON, 1960). Neste trabalho evidencia-se que, mesmo com o aumento no IQD, as plantas não apresentaram índice adequado para este parâmetro.

Figura 3 – Índice de qualidade de dickson (A), área foliar (B), volume radicular (C), área superficial específica das raízes (D) de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo sem e com adição de 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre e diferentes proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS).



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).

O CARS promoveu resposta quadrática na área foliar das plantas de erva-mate, com incremento de 36,1% na proporção 27,3% de composto no tratamento sem cobre e incremento de 75,1% na proporção 44,7% do amenizante no tratamento com contaminação de 400 mg kg<sup>-1</sup> cobre (Figura 3B). O trabalho realizado com pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) revelou que quando submetido a 100 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, há redução da área foliar de 69% em comparação com a testemunha sem o contaminante (CHAVES et al., 2010). A área foliar é responsável

pela produção de fotoassimilados necessários para a demanda metabólica e formação de novas estruturas vegetais (SILVA et al., 2018). Constata-se o efeito depreciativo do cobre no aparelho assimilatório da erva-mate, sendo menos intenso nas plantas com o amenizante orgânico CARS.

O volume radicular das plantas de erva-mate apresentou efeito quadrático com o aumento das proporções de CARS no solo sem contaminação, com volume radicular de 596,20 mm<sup>3</sup> na proporção 31,9 % de amenizante, enquanto no solo com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, ocorreu aumento cúbico com o CARS evidenciando maior resultado na proporção 43,3% do amenizante (Figura 3C). O maior desenvolvimento do sistema radicular em solo contaminado é desejável (CAIRES et al., 2011), pois possibilita maior absorção de água e nutrientes. Contudo, o excesso de cobre no sistema radicular pode promover a redução do crescimento nas raízes que apresentam ramificações anormais, espessamento, tonalidade de cor escura e redução do alongamento (AMBROSINI et al., 2015). Assim, o uso do CARS proporciona maior volume radicular das plantas de erva-mate.

A área superficial específica das raízes apresentou aumento quadrático com ponto de máxima (5.639,9 mm<sup>2</sup>) na proporção de 31,9% de amenizante no tratamento sem adição de cobre e ponto máximo (4.116 mm<sup>2</sup>) na proporção de 28,7% do composto no solo com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre com (Figura 3D). Mudanças de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link) e carne-de-vaca (*Pterogyne nitens* Tul) obtiveram redução linear para a área superficial específica, enquanto que, houve aumento quadrático para a timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* Vell.) até a dose de 81 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no solo (SILVA et al., 2016). A toxicidade de cobre no sistema radicular manifesta-se pela redução da formação de raízes e, com isso, afeta a capacidade de absorção de água e nutrientes essencial ao desenvolvimento da planta (TAIZ, 2017). A utilização do amenizante proporciona maior área superficial específica e consequente exploração de maior volume de solo buscando água e nutrientes.

#### 4.5.3 Concentração e acúmulo de cobre nas plantas

A concentração e a quantidade de cobre na parte aérea e no sistema radicular das plantas, e o índice de translocação de cobre na erva-mate apresentaram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos adição de cobre e proporções de CARS no solo (Figura 4).

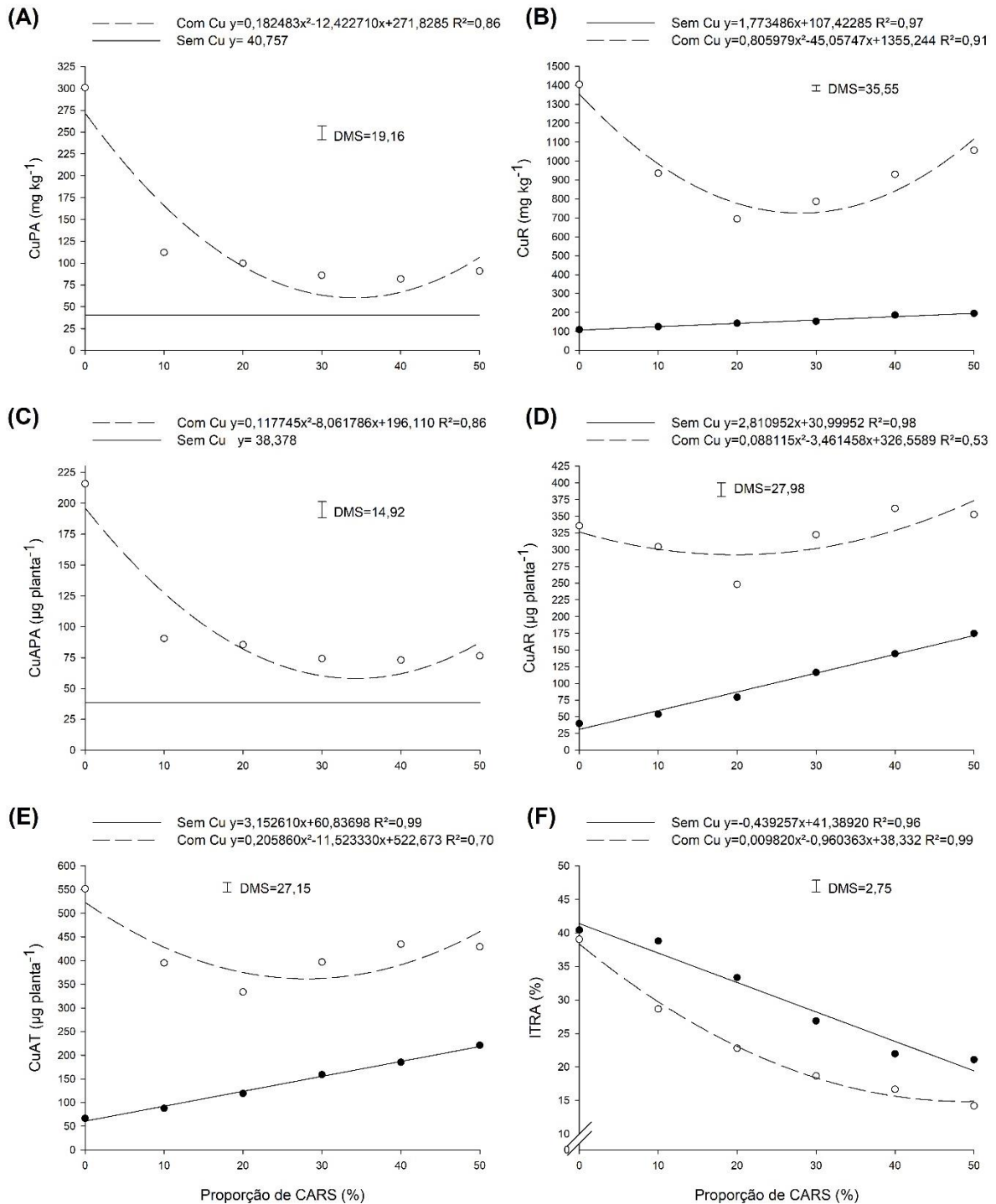
As concentrações de cobre na parte aérea das plantas de erva-mate foram superiores no tratamento sem a adição de CARS ao solo (Figura 4A). A redução na concentração de cobre

com o incremento nas proporções de CARS foi de 78% até a proporção 34% de composto no solo com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. No tratamento sem adição de cobre, não foi possível ajuste de equação de regressão. Resultados semelhantes foram obtidos por De Marco et al. (2017), com mudas *Eucalyptus grandis*, onde os maiores teores de cobre na parte aérea das plantas foram no tratamento sem turfa como amenizante em solo contaminado com cobre. Conforme destacado por Sanchez-Pardo et al. (2014) e Gautam et al. (2016), o excesso de cobre nas plantas pode causar inibição de seu desenvolvimento por levar a distúrbios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Assim, a presença do amenizante CARS no solo reduz significativamente o teor de cobre na parte aérea das plantas de *Ilex paraguariensis*.

Os teores de cobre no sistema radicular evidenciaram resposta distintas, com incremento linear de 82,5% no tratamento sem adição de cobre e redução quadrática de 46,4% na proporção de 27,9% de CARS com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no solo (Figura 4B). Trabalhando com mudas de *Senna multijuga* em solo contaminado com cobre, De Marco et al. (2017) revela que os maiores teores de cobre no sistema radicular foram verificados no tratamento sem a utilização de turfa. No sistema radicular, a toxidez do cobre se expressa, principalmente, na ausência de formação de novas raízes, e como consequência há redução da capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta (TAIZ, 2017). O amenizante CARS em menores proporções promoveu a redução dos teores de cobre nas raízes de erva-mate.

O cobre acumulado na parte aérea evidenciou redução quadrática de 58,1% no teor de cobre na proporção 34,2% de CARS no tratamento com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre (Figura 4C). Contudo, outras espécies arbóreas nativas submetidas a solo contaminado com a mesma dose do contaminante apresentaram quantidades deste metal na parte aérea na ordem de 350 a 1930 µg planta<sup>-1</sup> para jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) e 500 a 1.270 µg planta<sup>-1</sup> para canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) (MARQUES et al., 2018). O acúmulo de cobre na parte aérea tem como consequência a substituição dos íons Mg<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup> na molécula de clorofila por Cu<sup>2+</sup> (YRUELA, 2013), diminuindo a biossíntese e o conteúdo de clorofila, em decorrência a danos nas membranas dos tilacóides (ADREES et al., 2015). A utilização do amenizante CARS no solo reduziu significativamente o acúmulo de cobre na parte aérea da erva-mate em solo contaminado com esse metal.

Figura 4 – Teor de cobre na parte aérea - CuPA (A) e radicular - CuR (B), cobre acumulado na parte aérea - CuAPA (C) e radicular - CuAR (D), cobre acumulado total - CuAT (E) e índice de translocação - ITRA (F) de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo sem e com adição de 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre e diferentes proporções de composto de água residuária de suinocultura (CARS).



\*DMS: diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Autor (2019).

Os resultados para o cobre acumulado no sistema radicular evidenciaram aumento linear de 453,5% no tratamento sem adição de cobre e redução quadrática de 10,4% na

proporção estimada de 19,6% CARS com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no solo (Figura 4D). González et al. (2014) verificaram maior produção de matéria seca e também maior absorção de cobre pelas plantas de primula noturna (*Oenothera picensi* Phil) quando utilizaram como fonte de matéria orgânica um composto orgânico para amenizar o efeito tóxico do cobre. O excesso de cobre no sistema radicular pode provocar a redução do crescimento nas raízes que apresentam ramificações anormais, espessamento, tonalidade de cor escura e redução do alongamento (AMBROSINI et al., 2015). O uso do amenizante CARS promoveu redução dos teores acumulados de cobre na raiz das plantas em solo contaminado.

A quantidade de cobre acumulado total apresentou aumento linear de 157,6 µg planta<sup>-1</sup> na maior dose de CARS no tratamento sem adição de cobre, sendo significativamente menor que o tratamento com adição de Cu na dose 400 mg kg<sup>-1</sup>, que evidenciou redução quadrática de 161,2 µg planta<sup>-1</sup> na dose estimada de 28% CARS de cobre no solo (Figura 4E). Resultados com mudas de outras espécies arbóreas nativas submetidas a solo contaminado com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre manifestaram aumento no acúmulo deste metal no jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e óleo bálamo (*Myroxylon peruiferum* LF) (MARQUES et al., 2018). Tais resultados encontrados neste trabalho evidenciam que a utilização de até 28% de CARS como amenizante da contaminação com cobre no solo reduz o acúmulo desse elemento químico, contudo, proporciona maiores valores no acúmulo total em relação ao solo sem contaminação de cobre, por possibilitar maior produção de massa seca.

O índice de translocação de cobre nas plantas de erva-mate foi reduzido linearmente em 21,9% na maior proporção do CARS no tratamento sem adição de cobre e redução quadrática de 23,5% na proporção estimada de 49% CARS quando aplicado 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre (Figura 4F). Esses resultados divergem dos obtidos por Silva et al. (2017), em trabalho com turfa como amenizante da toxidez do cobre em *Eucalyptus grandis*, que verificaram maiores valores do índice de translocação nos tratamentos em que havia o uso de amenizante. Quando o índice de translocação for baixo ou próximo a zero, maior será a possibilidade de sobrevivência e crescimento da planta em ambiente contaminado (BRANZINI et al., 2012). O uso do amenizante CARS favorece a redução do índice de translocação de cobre em mudas de *Ilex paraguariensis*.

#### 4.6 CONCLUSÕES

O composto de água residuária de suinocultura (CARS) adicionado ao solo promove aumento do cobre pseudo-total e da fração de cobre adsorvida à matéria orgânica.

A proporção média de 30% de composto de água residuária de suinocultura (CARS) no solo proporciona efeito amenizante da toxidez do cobre no solo, favorecendo o crescimento e reduzindo o acúmulo de cobre nas plantas de *Ilex paraguariensis*.

#### 4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 21-26, 1998.

ADREES, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F.; FARID, M. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review: **Environmetal Science and Pollution Research International**. 2015; 22:8148-62.

ALMEIDA, A. A. F.; VALLE, R. R.; MIELKE, M. S.; GOMES, F. P. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 2007; 19(2): 83-98. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202007000200001>.

AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; PRADO, J. P. C.; BORGHEZAN, M.; MELO, G. W. B.; SOARES, C. R. F. S.; COMIN, J. J.; SIMÃO, D. G.; BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of Young vines (*Vitis lababrusca* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**. v.96, p.270-280, 2015.

ANDRADE, S. A. L.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; SILVEIRA, A. P. D.; SCHIAVINATO, M. A.; MASSAFERA, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 198–207, 2010.

ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; ANTONIOLLI, Z. I.; QUADR, M. S.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127–136, 2013.

BRACESCO A, SANCHEZ AG, CONTRERAS V, MENINI T, GUGLIUCCI A. **Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview**. Journal of Ethnopharmacology. 2011; 136: 378-384.

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.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; RUMJANEK, V. M.; MORAES, A. A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, p. 1529-1538, 2001.



- CAIRES S. M.; FONTES, M. P. F.; FERNANDES, R. B. A.; NEVES, J. C. L.; FONTES, R. L. F. Desenvolvimento de mudas de cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1181-1188, 2011.
- CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F.; ARAUJO, D. L.; FRANÇA, C. P. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 167-176, 2010.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 15 jan. 2019.
- DA ROS, C. O.; SILVESTRIN, T. B.; SOMAVILLA, L.; PERRANDO, E. R.; SILVA, R. F. Perdas de nutrientes por lixiviação na produção de mudas de cedro australiano. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 24, n. e2016008127, 2017.
- DE MARCO, R.; SILVA, R. F.; ROS, C. O.; VANZAM, M.; BOENO, D. *Senna multijuga* e turfa em fitoestabilização do cobre em solo contaminado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 421–426, 2017.
- DE MARCO, R.; SILVA, R. F.; SCHEID, D. L.; ROS, C. O.; SILVA, V. R. Amenizante Orgânico e *Eucalyptus grandis* para Fitoestabilização de Solo Contaminado com Cobre. **Floresta e Ambiente** 2017, v. 8087, 2017.
- DELLAI, A.; SILVA, R. F.; PERRANDO, E. R.; JACQUES, R. J. S.; GROLLI, A. L.; MARCO, R. D. Óleo de eucalipto e *Pisolithus microcarpus* no crescimento de bracinga em solo contaminado por cobre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 2014; 18(9): 927-933. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n09p927-933>.
- DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **The Forestry Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960.
- FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 10 fev. 2019.
- FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2011.
- FERREIRA, P. A. A.; SILVA, E. P.; ARMAS, R. D.; LAZZARETTI, B. P.; MELO, G. W. B.; ZALAMENA, L.; SOARES, C. R. F. S. Estratégias de amenização da fitotoxidez de metais pesados em solos de vinhedos. n. Figura 1, p. 111–138, 2016.
- 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 (VQR) dos solos para nove elementos químicos naturalmente presentes nas diferentes províncias geomorfológicas/geológicas do estado do Rio Grande do Sul.
- GABOS, M B; CASAGRANDE, G; ABREU, CA; PAZ-FERREIRO, J. Uso da matéria orgânica como mitigadora de solo multicontaminado e do girassol como fitoextratora. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p.1298-1306, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662011001200012>

- GAUTAM, S.; ANJANI, K.; SRIVASTAVA, N. In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). **Physiology and Molecular Biology of Plants**. 2016;22(1):121-9.
- GONZÁLEZ, I.; NEAMAN, A.; CORTÉS, A.; RUBIO, P. Chemosphere Effect of compost and biodegradable chelate addition on phytoextraction of copper by *Oenothera picensis* grown in Cu-contaminated acid soils. **Chemosphere**, v. 95, p. 111–115, 2014.
- JORGE, R. A. B.; ABREU, C. A.; ANDRADE, C. A.; CAMARGO, A. O. Torta de filtro e turfa na mitigação de solo contaminado com resíduo de sucata rico em boro. **Bragantia**, v.69, p.467-476, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052010000200026>
- JORGE, L. A. C.; SILVA, D. J. C. B. **Safira: Manual de utilização**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010.
- KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4. ed. London, Boca Raton: CRC Press, 2011. 534p.
- KOPITTKE, P. M.; MENZIES, N. W. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, v. 279, n. 01/02, p. 287-296, 2006.
- KÖPPEN, W.; GEIGER, R. *Klimate der Erde*. Gotha: **Verlag Justus Perthes**. 1928.
- KRATZ, D.; WENDLING, I.; NOGUEIRA, A. C.; SOUZA, P. V. D. Utilização de resíduos urbanos e agroflorestais para produção de mudas de *Eucalyptus benthamii* e *Mimosa scabrella*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 530-537, 2013.
- KUKKOLA, E.; RAUTIO, P.; HUTTUNEN, S. Indicadores de estresse em mudas de pinheiro escoceses expostas a cobre e níquel. **Environ Exp. Robô**. 43: 197-210, 2000.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany** v. 47, p. 259–266, 1996.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. 2ed. Instituto Plantar um de Estudos da Flora LTDA; 2008; 90-91.
- MANN, S. S.; RITCHIE, G. S. P. Influence of pH on on the the Forms Forms of Cadmium in Four West Australian Australian Soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 31, p. 255–270, 1993.
- MARQUES, D. M.; SILVA, A. B.; MANTOVANI, J. R.; PEREIRA, D. S.; SOUZA, T. Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. **Revista Árvore**, v.42, n.2, 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.
- MOREIRA, D. A.; SOUZA, J. R.; REIS, E.; GARIGLIO, H. E.; REIS, R. Estudo da adsorção simultânea de cobre, níquel e zinco por vermicomposto utilizando planejamento fatorial. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 9, n. 2, p. 216-227, 2012.

- NEGRINI, A. Amenizante orgânico e micorrizas arbusculares em mudas de eucalipto cultivadas em solo contaminado com cobre. Dissertação de **mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente. UFSM. 2017, 71p.
- PARK, J. H.; LAMB, D.; PANEERSELVAM, P.; CHOPPALA, G.; BOLAN, N.; CHUNG, J. W. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal (loid) contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2–3, p. 549–574, 2011.
- PRÁ, M. A. D.; KONZEN, E. A.; MORES, P. A. O. E. Compostagem de dejetos líquidos de suínos. **Embrapa Milho e Sorgo**. 1a edição ed., p.25, 2005. Sete Lagoas, MG.
- ROSSI, V. L.; AMARANTE, C. V. T.; FLEIG, F. D. Crescimento e qualidade de mudas de *Pinus taeda* l. submetidas à poda química de raízes. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 435- 442, 2008.
- SAIDELLES, A. P. F; KIECHNER, R. M; SANTOS, N. R. Z; FLORES, E. M. M; BARTZ, F. B. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate no sul do Brasil. Araraquara. **Alim. Nutri**. V.21, n.2, p.259-265, 2010.
- SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. **Journal of Plant Research**. 2014; 127:119-29.
- SANTOS, G. C. G.; RODELLA, A. A. Efeito da adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico de B, Zn, Cu, Mn e Pb no cultivo de *Brassica juncea*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 793-804, 2007.
- SCHNEIDER CA, RASBAND WS, ELICEIRI KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**.2012;9:671. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- SILVA, I. C.; ROCHA, C.; ROCHA, M. C.; SOUSA, C. M. Growth of *Brachiaria decumbens* in Latosol contaminated with copper. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, vol.42, n.2, 2018.
- SILVA, R. F.; DE MARCO, R.; NEGRINI, A.; BASSO, C. J.; SILVA, V. R.; SWAROWSKY, A.; SCHEID, D. L.; MATSUOKA, M.; DA ROS, C. O.; WELTER, P. D. Peat influence on Zn tolerance, bioconcentration and bioaccumulation in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 5, p. 320–326, 2017.
- SILVA, R. F.; ROS, C. O.; DELLAI, A.; GROLLI, A. L.; SCHEID, D. L.; VIEL, P. 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**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 647-655, 2016.
- SILVA, R. F; MISSIO, E. L; STEFFEN, R. B; WEIRICH, S. W; KUSS, C. C; SCHEID, D. L. Efeito do crescimento e do crescimento de qualidade de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Cassia multijuga* Rich. **Ciência Florestal**, v.24, p.717-725, 2014. <https://doi.org/10.5902/1980509815730>.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2017, 888p.

TIECHER, T. L.; CERETTA, A. A.; COMIN, J. J.; GIROTTO, E.; MIOTTO, A.; MORAES, M. P.; BENEDET, L.; FERREIRA, P. A. A.; LORENZI, C. R.; COUTO, R. R.; BRUNETTO, G. Forms and accumulation of copper and zinc in a sandy typic hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 3, p. 812–824, 2013.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3050 B: Acid digestion of sediments, sludges and soils**. Washington, 1996. 12p.

VASCONCELLOS, M. C.; PAGLIUSO, D.; SOTOMAIOR, V. S. Fitorremediação : Uma proposta de descontaminação do solo. **Estudos de Biologia Ambiente e Diversidade**, v. 34, n. 83, p. 261–267, 2012.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2017, 2 ed. 192p.

YRUELA, I. **Transition metals in plant photosynthesis**. *Metallomics*, v.5, p.1090-1109, 2013.

## 5 CAPÍTULO III - FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS E COMPOSTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE COBRE EM *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

### 5.1 RESUMO

O cobre é essencial ao crescimento dos vegetais, pois faz parte da constituição de enzimas e proteínas, porém, pode se tornar tóxico quando presente no solo em elevadas concentrações, surgindo a necessidade do uso de alternativas que promovam a redução dos seus efeitos negativos sobre as plantas. Objetivou-se no trabalho determinar a influência do uso de fungos ectomicorrízicos associados ao composto de água residuária de suinocultura (CARS) no crescimento e acúmulo de cobre em *Ilex paraguariensis* cultivada em solo contaminado com cobre. O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2 x 3), sendo sem e com adição de 30% de composto de água residuária de suinocultura (CARS) (v:v) e 3 (três) fontes de inóculos ectomicorrízicos (sem inóculo, com inoculação de UFSC-PT116 - *Pisolithus microcarpus* e com UFSC-SU118 - *Suillus cothurnatus*), totalizando 6 (seis) tratamentos com oito repetições, em solo previamente contaminado com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre. Avaliou-se a altura da parte aérea, diâmetro do colo, massa seca da parte aérea e radicular, índice de qualidade de Dickson, área foliar, área superficial específica de raízes, teores e acúmulo de cobre na parte aérea e radicular, índices de: translocação de cobre e de crescimento relativo e associação micorrízica. O uso de fungos ectomicorrízicos e de CARS amenizam o efeito negativo do cobre no crescimento das mudas de *Ilex paraguariensis*. O teor e acúmulo de cobre no tecido vegetal das plantas de *Ilex paraguariensis* são reduzidas quando há associação com o fungo UFSC-PT116 independentemente da adição de CARS no solo.

**Palavras-chave:** Erva-mate. Ectomicorrizas. Composto orgânico. Metal pesado.

### 5.2 ABSTRACT

Copper is essential to the growth of plants, it as part f the constitution of enzymes and proteins, however, it can become toxic when presente in the soil high concentrations, resulting in the need to use alternatives that promote the reduction of its negative effects on plants. The objective of this work was to determine the influence of the use of ectomycorrhizal fungi associated to the swine wastewater composto n the growth and accumulation of cooper in *Ilex paraguariensis* grown on soil contaminated with copper. The design was completely randomized in factorial arrangement (2 x 3), being without and with 30 % addition os swine wastewater (CARS) (v: v) and 3 (three) sources of ectomycorrhizal inoculum (without inoculum, with inoculation of UFSC-PT116 – *Pisolithus microcarpus* and UFSC-SU118 – *Suillus cothurnatus*) totaling 6 (six) treatments with eight replicates, in soil previously contaminated with 400 mg kg<sup>-1</sup> of copper. It was evaluated the height of the aerial part, diameter of the colon, dry mass of the aerial part and radicular, Dickson quality index, leaf área, specific surface área of roots, contentes and accumulation of cooper in the aerial part and radicular, índices of: cooper translocation and relative growth and mycorrhizal association. The use of ectomycorrhizal fungi and CARS mitigate the negative effect of copper on the growth of *Ilex paraguariensis* seedlings. Copper content and accumulation inplant tissue of

*Ilex paraguariensis* plants are reduced when associated with the fungus UFSC-PT116 regardless of the addition of CARS in the soil.

**Key-words:** Mate herb. Ectomycorrhizae. Organic Compost. Heavy metal.

### 5.3 INTRODUÇÃO

O cobre é classificado como um metal pesado (YRUELA, 2009) essencial ao crescimento dos vegetais, pois faz parte da constituição de enzimas e proteínas, entretanto, pode se tornar tóxico as plantas quando em elevadas concentrações no solo (RODRIGUES et al., 2016). Altos níveis de metais pesados no solo se deve a intensa e contínua utilização desses elementos pela atividade antrópica (ANDREAZZA et al., 2013), sendo as principais fontes de contaminação as atividades de extração de minérios, distribuição de lamas de esgoto e uso de agroquímicos na agricultura (ANDRADE et al., 2010). Desse modo, quando o cobre está em concentrações acima de 200 mg kg<sup>-1</sup> pode provocar efeitos tóxicos, induzindo riscos à saúde pública e ao meio ambiente (CONAMA, 2009).

Nas plantas, o cobre atua como ativador de enzimas que participam nas reações de oxirredução e nos processos fisiológicos, como fotossíntese, respiração e translocação de açúcares (MARSCHNER, 2012). Contudo, plantas cultivadas em solos com altos teores de cobre podem acumular esse metal em seus tecidos e desenvolver sintomas de toxicidade (KABATA-PENDIAS, 2011), redução da fotossíntese, clorose, necrose, nanismo, inibição do crescimento das raízes e folhas e distúrbios na estrutura das proteínas (YRUELA, 2009). Algumas espécies de plantas apresentam mecanismos adaptativos que as tornam tolerantes a toxicidade ocasionada por altas concentrações de metais (LEQUEUX et al., 2010). Esta tolerância está relacionada diretamente à resposta fisiológica e bioquímica de cada espécie vegetal (SOUZA et al., 2011).

A espécie *Ilex paraguariensis* St. Hil. é uma planta da família Aquifoliaceae, conhecida como erva-mate (LORENZI, 2000). É uma árvore perenifólia encontrada também no Paraguai, sul da Bolívia, Argentina e Uruguai (BRACESCO, 2011). A produção do chá mate e da erva-mate para chimarrão representa quase a totalidade da erva-mate colhida, havendo também outras aplicações, como coadjuvantes na indústria alimentícia e de cosméticos, por meio da clorofila, óleos essenciais, extrato de cafeína, teobromina, extrato de flavonoides e saponinas (MACCARI JUNIOR, 2005). Estudos mostraram mais de 250 compostos extraídos da erva-mate verde e tostada (KAWAKAMI E KOVAYASHI, 1991). Contudo, é escasso o conhecimento sobre o crescimento da erva-mate em áreas contaminadas

com cobre, sendo necessário o desenvolvimento de trabalhos que relatem a acumulação do metal na parte aérea desta espécie.

Fungos micorrízicos formam associações simbióticas mutualísticas com plantas vasculares aumentando a área explorada pelas raízes por meio de suas hifas no solo (BRUNDRETT, 2008) sendo benéficos ao crescimento da planta hospedeira, especialmente em situações em que fatores climáticos e edáficos são limitantes (SMITH & READ, 2008). Isso ocorre pela presença de mecanismos que possibilitam alterar a biodisponibilidade desses elementos no ambiente micorrizosférico, controlando a absorção das raízes (FERREIRA et al., 2016). Essas associações tem a habilidade em reter os metais no micélio fúngico, evitando a translocação para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (COLPAERT & VAN ASSCHE, 1993; AGGANGAN et al., 1998).

Quando a contaminação do solo está em níveis elevados, é recomendado a utilização de técnicas que possam reduzir ou estabilizar o efeito do contaminante (PARK et al., 2011), com o objetivo de reduzir sua disponibilidade a um nível tolerável às plantas (COUTINHO & BARBOSA, 2007; GABOS et al., 2011). Entre os amenizantes da toxidez por metais estudados se tem a utilização de compostos orgânicos (PARK et al., 2011). Compostos orgânicos são ricos em matéria orgânica, que pode promover a redução significativa da disponibilidade de íons metálicos no ambiente, em decorrência da presença de substâncias contendo inúmeros grupos funcionais com cargas negativas, tais como ácidos carboxílicos e hidroxilas fenólicas e alcoólicas, que são justamente os sítios que podem adsorver os metais em solução (MORREIRA et al., 2012). Nesse sentido, a utilização de CARS no solo pode propiciar redução do efeito tóxico do metal, promovendo o crescimento de plantas em solo que possui contaminação com cobre.

Na literatura são escassos os trabalhos relacionados à estabilização de metais com a utilização de micorrizas aliados ao uso de compostos orgânicos. Estudos realizados por De marco et al. (2017) demonstraram aumento ns parâmetros morfológicos, no cobre acumulado e na tolerância das mudas de *Senna multijuga* com a aplicação de 200 ml l<sup>-1</sup> de turfa em solo contaminado com cobre, Dellai et al. (2014) evidenciaram o efeito benéfico no crescimento vegetal com o uso de *Pisolithus microcarpus* no crescimento de mudas de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e Negrini et al. (2017) demonstra que adição de composto de água residuária de suinocultura com os inóculos de fungos micorrízicos arbusculares *Gigaspora margarita* e *Aucalospora colombiana* aumentam os parâmetros morfológicos e qualidades de mudas de *Eucalyptus grandis* cultivadas em solo contaminado com cobre.

Com isso, a utilização de fungos ectomicorrízicos e a adição de composto de água residuária de suinocultura (CARS), através de suas especificidades podem proporcionar às plantas maior crescimento e desenvolvimento em áreas contaminadas com metais pesados. Porém, ainda não se sabe sobre o efeito da utilização conjunta de ectomicorriza e CARS no crescimento e acúmulo de cobre em erva-mate cultivada em solo contaminado com esse elemento químico. Nesse sentido, neste trabalho objetivou-se determinar a influência do uso de fungo ectomicorrízico associado ao composto de água residuária de suinocultura no crescimento e acúmulo de cobre em *Ilex paraguariensis* cultivada em solo contaminado com cobre.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Local

O experimento foi conduzido em ambiente protegido, na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *Campus* de Frederico Westphalen, entre os meses de janeiro e abril de 2019. O clima é classificado como Cfa de acordo com Köppen & Geiger.

### 5.4.2 Delineamento

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 3, sendo sem e com adição de 30% de composto de água residuária de suinocultura (CARS) (v:v) e 3 (três) fontes de inóculos ectomicorrízicos (sem inóculo e com UFSC-PT116 - *Pisolithus microcarpus* e com UFSC-SU118 - *Suillus cothurnatus*), totalizando 6 (seis) tratamentos com oito repetições. Todos os tratamentos foram previamente contaminados com 400 mg de cobre  $\text{kg}^{-1}$  de solo.

### 5.4.3 Solo e Composto de água residuária de suinocultura

O solo utilizado no experimento foi caracterizado como um Latossolo Vermelho, derivado de rochas basálticas, com valores na camada de 5 – 20 cm, de  $\text{pH}_{\text{água (1:1)}} = 5,3$ ; 19,0  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria orgânica e 620,0  $\text{g kg}^{-1}$  de argila. Os teores de nutrientes disponíveis estão



especificados na tabela 1, determinados conforme metodologia de Silva et al. (2009).

Tabela 1 – Teores de nutrientes disponíveis e totais no solo e no composto de água residuária de suinocultura (CARS) utilizado no cultivo de mudas de *Ilex paraguariensis*.

	Ca	Mg	N	P	K	Cu
	-----Teores disponíveis (mg kg <sup>-1</sup> )-----					
Solo	1.020	384	nd*	7	126	13
CARS	4.961	3.646	604	3.830	8.232	42
	-----Teores totais (mg kg <sup>-1</sup> )-----					
Solo	Nd	nd	Nd	Nd	nd	168,5**
CARS	15.624	5.236	19.350	8.133	8.763	352

\*nd: não determinado. \*\*Teor pseudo-total no solo, determinado conforme a metodologia 3050b, descrita em USEPA (1996). Fonte: Autor (2019).

O composto de água residuária de suinocultura (CARS) foi compostado com maravalha em um sistema de compostagem com aerador coloidal durante seis meses, advindo de uma unidade de criação de suínos no município de Rodeio Bonito, região do Alto Uruguai – RS. A caracterização indicou pH  $\text{pH}_{\text{água (1:1)}} = 7,0$ ; 317,8 g kg<sup>-1</sup> de carbono orgânico; 9,7 mS cm<sup>-1</sup> de condutividade elétrica e 16,5 de relação carbono/nitrogênio. Os teores disponíveis e totais de nutrientes estão especificados na tabela 1, quantificados pelas metodologias descritas por Silva et al. (2009) e por Miyazawa et al. (2009), respectivamente.

#### 5.5.4 Fungos micorrízicos

Os fungos ectomicorrízicos (UFSC-UFSC-PT116 - *Pisolithus microcarpus* e UFSC-SU118 - *Suillus cothurnatus*) inoculados nas mudas foram obtidos na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os fungos ectomicorrízicos foram multiplicados 30 dias antes da implantação do experimento em meio MNM sólido (Melin-Norkrans Modificado) (MARX, 1969), em placas Petri, incubados em estufa BOD a25°C

#### 5.5.5 Sementes e Unidade Experimental

As sementes da erva-mate utilizadas no experimento foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), unidade de Chapecó, SC. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 5%, por 20 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, semeadas em sementeira com substrato marca Carolina Soil esterilizado em autoclave com temperatura de 121°C em 3 ciclos de 30 minutos, sendo irrigadas com água destilada diariamente. Quando as mudas apresentaram um par de

folhas definitivas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade volumétrica de 1.000 cm<sup>3</sup>. Cada vaso contendo uma muda foi considerado uma unidade experimental (UE).

### 5.5.6 Instalação e condução do experimento

A dose de 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre foi aplicada 30 dias antes do transplante das mudas na forma de solução de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), sendo diluídas em 50 mL de água destilada para possibilitar homogeneização. O inoculante dos fungos ectomicorrízicos foi constituído de micélio fúngico de 10 placas de Petri, totalizando 32 colônias, correspondendo a meia colônia fúngica por UE, o qual foi triturado em liquidificador com 640 ml de água destilada por 10 segundos. Para inoculação foi aplicado 20 ml dessa solução, por meio de uma seringa graduada, diretamente no solo de cada UE em contato com as raízes no momento da transplantadas mudas. A testemunha sem inoculação também recebeu 20 ml de solução contendo somente o meio de cultura MNM.

O experimento foi conduzido durante 120 dias após o transplante das mudas e neste período foi adicionado água, com uso de um becker graduado, mantendo-se a umidade do solo a 80% da capacidade de campo, calculada conforme Bernardo et al. (2008). Para atender às exigências do delineamento, a cada dez dias foi realizado rodízio das UEs.

### 5.5.7 Avaliação morfológica

Ao final do experimento quantificou-se a altura da parte aérea (H), com régua graduada, do colo das mudas até o ápice caulinar; o diâmetro do colo (DC), com paquímetro digital marca Black Jack Tools<sup>®</sup>; a massa seca do sistema radicular (MSR) e da parte aérea (MSPA), sendo ambos separados na região do colo da muda e secos em estufa a 60±1 ° C até massa constante, pesadas em balança analítica e calculada a massa seca total (MST) pela soma das MSR e MSPA. Com base nestes parâmetros foi calculado a relação altura/diâmetro e o índice de qualidade de Dickson (IQD) de acordo com a Equação 1 (DICKSON, 1960).

$$IQD = \frac{MST}{\frac{H}{DC} + \frac{MSPA}{MSR}} \quad (1)$$

Antes de serem submetidas a secagem, as raízes foram separadas do solo por meio de lavagem em água corrente usando peneiras com malha de 0,5 mm de diâmetro. Após a lavagem ocorreu a digitalização das raízes com o uso de escâner (HP D110) e a determinação da área superficial específica (ASE), o comprimento radicular (CR) e o volume de raiz (VR) por meio do processamento das imagens no programa para análises de fibras e raízes, Safira 2.0 (JORGE & SILVA, 2010). A área foliar (AF) foi medida e analisada pelo software ImageJ<sup>®</sup> (versão 2.0; US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) (SCHNEIDER et al., 2012), utilizado para medir todas as imagens off-line.

### 5.5.8 Metal na planta

A massa seca da parte aérea e raízes foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha de 10 mesh para a determinação das concentrações de cobre no tecido vegetal, por meio de extração nítrico-perclórica (3:1) e quantificação por espectrofotometria de absorção atômica, conforme Miyazawa et al. (2009).

Com base nos dados de massa seca e da concentração pseudo-total de cobre no solo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) foi calculada a quantidade acumulada de cobre ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) na parte aérea (CuAPA), no sistema radicular (CuAR) e no total das mudas (CuAT). Foi calculado o índice de translocação (Itra), com base na Equação 2, que corresponde à porcentagem total absorvida de cobre que foi transportado para a parte aérea (ABICHEQUER & BOHNEN, 1998).

$$Itra = \frac{\text{CuAPAdn}}{\text{CuATdo}} * 100 \quad (2)$$

### 5.5.9 Associação micorrízica

A avaliação da colonização micorrízica foi realizada por meio de dois procedimentos: a) detecção de alterações morfológicas, provocadas por fungos ectomicorrízico como a presença de manto fúngico cobrindo as raízes; b) técnica de clarificação e coloração das raízes com Azul de Trypan 0,05%, para visualização em microscópio e em lupa das ectomicorrizas (BRUNDRETT, 2008). A colonização ectomicorrízica foi estimada fazendo-se a média de 5 repetições por planta pelo método da placa quadriculada (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980), totalizando 35 repetições por tratamento.

### 5.5.10 Índice de eficiência relativa da massa seca total

O índice de eficiência relativa da massa seca total foi calculado por meio da equação: [(MST de planta no tratamento y – MST no tratamento controle) / MST de planta no tratamento y]\*100.

### 5.5.11 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) de probabilidade de erro pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1 Parâmetros morfológicos das plantas

A altura de planta foi 27% maior que o controle com a inoculação do isolado UFSC-PT116 associado ao uso de CARS (Tabela 2). Mudanças de eucalipto saligna (*Eucalyptus saligna* Sm) inoculadas com o fungo UFSC-PT116 apresentaram maior altura em relação às não inoculadas na dose  $450 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre (DELLAI et al., 2018). Em seu trabalho, De Marco et al. (2017) obtiveram maior altura em mudas de pau-cigarra (*Senna multijuga* (L. C. Rich.) H. S. Irwin & Barneby), utilizando 200 mL de turfa  $\text{L}^{-1}$  quando comparado ao solo sem o composto orgânico. Verifica-se que o uso de ectomicorrizas associadas ao CARS promove aumento no crescimento em altura das mudas de *Ilex paraguariensis*.

Os resultados de altura de plantas evidenciam que a adição do CARS associado à inoculação das ectomicorrizas reduz o efeito tóxico do cobre nas plantas de erva-mate. O elemento cobre quando presente em elevado teor disponível no solo interfere na cadeia de transporte de elétrons do fotossistema I das plantas, reduzindo a produção de fotoassimilados e o crescimento apical de forma significativa (TAIZ et al., 2017).

O diâmetro de colo das plantas de erva-mate foi 16% maior com o isolado UFSC-PT116 em relação ao controle em solo contaminado sem CARS, contudo com a adição de CARS não houve diferença significativa entre isolados ectomicorrízicos e o controle (Tabela 2). Resultados semelhantes foram descritos por Steffen et al. (2011), em que mudas de

eucalipto grandis (*Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden)) produzidas em solo contaminado com cobre, quando inoculadas com o isolado UFSC-Pt116, apresentaram maior diâmetro de colo das plantas.

Tabela 2 – Altura, diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR), massa seca total (MST), área foliar (AF), área superficial específica de raízes (ASE) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de *Ilex paraguariensis*, sem e com inoculação dos fungos UFSC-PT116 e UFSC-SU118, sem e com adição de composto de água residuária da suinocultura em solo contaminado com cobre.

Inoculação	CARS		CARS	
	Sem	Com	Sem	Com
	----- <i>Altura (cm)</i> -----		----- <i>DC (mm)</i> -----	
Controle	19,80 bB*	22,92 bA	3,46 bA	3,52 aA
PT116	25,80 aB	29,16 aA	4,02 aA	3,52 aB
SU118	22,60 abA	23,01 bA	3,52 bA	3,58 aA
CV (%)	9,77		8,37	
	----- <i>MSPA (g planta<sup>-1</sup>)</i> -----		----- <i>MSR (g planta<sup>-1</sup>)</i> -----	
Controle	1,80 bA	2,29 aA	0,52 bA	0,63 aA
PT116	2,67 aA	1,68 bB	1,14 aA	0,74 aB
SU118	2,30 abA	1,70 abB	0,62 bA	0,56 aA
CV (%)	18,37		30,36	
	----- <i>MST (g planta<sup>-1</sup>)</i> -----		----- <i>Área Foliar (cm<sup>2</sup>)</i> -----	
Controle	2,33 bB	2,93 aA	185,5 bB	244,1 aA
PT116	3,82 aA	2,42 abB	332,2 aA	260,2 aB
SU118	2,92 bA	2,26 bB	241,0 bA	209,1 aA
CV (%)	14,63		16,03	
	----- <i>ASE (mm<sup>2</sup>)</i> -----		----- <i>IQD</i> -----	
Controle	5145 aB	6783 aA	0,36 bA	0,40 aA
PT116	4559 aA	4745 bA	0,54 aA	0,27 bB
SU118	5908 aA	5545 abA	0,41 bA	0,31 abA
CV (%)	17,17		19,07	

Fonte: Autor (2019).

\*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) de probabilidade de erro.

As plantas inoculadas apresentaram maior massa seca da parte aérea em solo sem CARS, não havendo efeito das inoculações em solo com adição de CARS (Tabela 2). Resultados revelaram maior massa seca da parte aérea em mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) inoculadas com UFSC-PT116 na dose 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre adicionado ao solo (SILVA et al., 2010). Os fungos ectomicorrízicos permitem que maior

quantidade de água e nutrientes sejam retirados do solo, havendo aporte para o fungo como para a planta (SMITH & READ, 2008), assim como possuem a capacidade de reter o cobre em seu micélio, evitando que sejam absorvidos pela planta (BERTOLAZZI et al., 2010). Os resultados indicam que a inoculação do isolado UFSC-PT116 promove resposta positiva no crescimento das mudas de erva-mate em solo contaminado por alta dose de cobre, porém é limitado pela adição de CARS no solo.

A massa seca radicular das plantas em solo sem o uso do CARS com o isolado UFSC-PT116 foi 119,2% superior que o tratamento controle e 54% superior ao isolado UFSC-PT116 em solo combinado com CARS, porém sem diferença significativa entre os tratamentos no solo com adição de CARS (Tabela 2). Esse resultado corrobora com os de Souza et al. (2012) que também obtiveram maior massa seca radicular no *E. grandis* quando inoculada com o isolado PT116. Ainda que haja redução no sistema radicular provocado pela formação da ectomicorriza, modificando a arquitetura das raízes (BRUNDRETT, 2008), que se tornam mais curtas e muito ramificadas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007), o resultado final dessa associação é o aumento da área de absorção radicular da planta por causa da presença das hifas do fungo (SMITH & READ, 2008). Assim, há redução da massa seca radicular nas plantas micorrizadas com CARS, porém sem fungo e CARS há um ganho com o isolado UFSC-PT116 em relação ao tratamento controle.

A adição do CARS no solo aumentou significativamente a massa seca total das plantas no controle sem inoculação, porém a inoculação com o isolado UFSC-PT116 possibilitou 63,9% maior MST que o controle sem CARS, enquanto com a presença de CARS, o controle e o isolado UFSC-PT116 foram maiores que o isolado UFSC-SU118, porém não diferiram entre si (Tabela 2). Resultados de pesquisa indicaram que solos de vitivinicultura contaminados com cobre ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre), e rejeitos de mineração de cobre ( $575 \text{ mg kg}^{-1}$  de cobre) reduziram significativamente o crescimento das plantas (ANDREAZZA et al., 2010). Isso ocorre, pois, o excesso de cobre no solo provoca distúrbios na estrutura das proteínas e inibição do alongamento celular, induzida pelo aumento na permeabilidade da membrana plasmática e lignificação da parede celular, culminando em danos ao sistema radicular e parte aérea, reduzindo o desenvolvimento da planta (YRUELA, 2013).

No entanto, as ectomicorrizas possuem habilidade de acumular metais em seus tecidos fúngicos (BELLION et al., 2006), reduzindo seu efeito tóxico à planta (AGGANGAN et al., 1998), aliado à maior absorção de nutrientes pela planta em razão do menor diâmetro das hifas, que propiciam a exploração de pequenos poros inacessíveis às raízes (SILVA et al., 2007), promovendo ganhos na massa seca total das plantas (Tabela 2). A inoculação do

isolado UFSC-PT116 proporciona efeito positivo no crescimento das plantas, o uso do composto orgânico CARS promove maior desenvolvimento e acúmulo de matéria seca das plantas sem a inoculação de ectomicorrizas.

A área foliar não diferiu significativamente entre os tratamentos com a adição de CARS no solo, porém sem a presença do composto orgânico o isolado UFSC-PT116 apresentou 79 e 37,8% maior que o controle sem inoculação e ao isolado UFSC-SU118, respectivamente (Tabela 2). Em estudo com o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) verificou-se redução linear da área foliar com aumento das doses de cobre e, quando submetido a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>, foi 69% menor em relação a testemunha (CHAVES et al., 2010). A área foliar é responsável pela produção de fotoassimilados necessários para a demanda metabólica e formação de novas estruturas vegetais (SILVA et al., 2018).

A inoculação com os isolados ectomicorrizicos possibilitaram maior área superficial das raízes no solo contaminado sem adição de CARS, porém a adição de CARS reduziu significativamente o efeito da micorrização (Tabela 2). Em trabalho com mudas da espécie canafístula inoculadas com o fungo UFSC-PT116, verificou-se redução na área superficial específica conforme adição de cobre no solo, com 12.533 mm<sup>2</sup> na dose 450 mg kg<sup>-1</sup> (SILVA et al., 2010). Existem estimativas de que a superfície da área explorada por ectomicorrizas é mil vezes superior àquela de raízes sem a presença dos fungos ectomicorrizicos (HARLEY, 1969). Assim, mesmo reduzindo a área superficial específica, é esperado maior capacidade de absorção de nutrientes e água pelas plantas micorrizadas, cultivadas em solo com excesso de cobre (SILVA, et al., 2010).

O índice de qualidade de dickson das plantas e erva-mate revelou que o uso do isolado UFSC-PT116 sem a adição de CARS proporcionou 50 e 31,7% de incremento comparado com o controle sem inoculação e o isolado UFSC-SU118, respectivamente, enquanto, com a adição de CARS o tratamento controle apresentou maiores resultados, sendo 48% maior que o isolado UFSC-PT116 (Tabela 2). Não foi observada diferença significativa no índice de qualidade de mudas *E. saligna* inoculadas com o fungo UFSC-PT116 em solo contaminado com 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre em relação ao tratamento em que não houve adição de cobre no solo (DELLAI et al., 2018).

Para calcular o IQD são consideradas variáveis morfológicas, dentre elas a massa seca aérea e massa seca radicular, que demonstram vigor da planta (ROSSI et al.; 2008), onde o índice acima de 0,20 indica maior padrão de qualidade de mudas (DICKSON, 1960). Neste trabalho, evidencia-se que todos os tratamentos testados possibilitaram IQD adequado, entretanto, a adição do CARS no solo contaminado reduz o efeito da presença das

ectomicorrizas. Contudo, destaca-se que na ausência de CARS a qualidade das plantas de erva-mate é maior quando inoculado com o isolado UFSC-PT116.

### 5.5.2 Concentração e acúmulo de cobre nas plantas

A concentração e a quantidade de cobre na parte aérea e no sistema radicular das plantas de *Ilex paraguariensis* foram significativamente reduzidas com a inoculação das ectomicorrizas, em relação às plantas nos tratamentos controle, sendo beneficiadas pela adição do CARS no solo (Tabela 3).

Os teores de cobre na parte aérea foram reduzidos significativamente com as inoculações e com adição de CARS, sendo que o isolado UFSC-PT116 induziu redução de 58,3 e 59,2 % em relação ao controle sem inoculação, nos tratamentos sem e com adição CARS no solo, respectivamente (Tabela 3). Resultados obtidos por De Marco et al. (2017), com mudas *E. grandis* cultivadas em solo com cobre como contaminante, indicam que os maiores teores de cobre na parte aérea das plantas foram no tratamento sem turfa como amenizante. O cobre, quando em excesso, reduz a taxa fotossintética por interferir na cadeia de transporte de elétrons do fotossistema I, diminuindo a produção de fotoassimilados, ocasionando redução no crescimento da planta (KABATA-PENDIAS, 2011).

Além disso, a ANVISA (1998) estabelece o limite máximo de tolerância de contaminante de 10 mg de cobre  $\text{kg}^{-1}$  de massa seca na parte aérea da planta. Desse modo, os resultados encontrados indicam que na presença do isolado UFSC-PT116 e CARS há redução no teor de cobre na parte aérea das plantas de erva-mate em solos contaminados com 400 mg  $\text{kg}^{-1}$  de cobre, atingindo valor abaixo dos limites máximos de tolerância estabelecidos na legislação brasileira.

As concentrações de cobre no sistema radicular foram significativamente menores com a inoculação do isolado UFSC-PT116, independente da adição de CARS no solo (Tabela 3). Silva et al. (2010) destacaram que com o isolado UFSC-PT116 as mudas de *P. dubium* apresentaram teor de cobre de 307 mg  $\text{kg}^{-1}$  submetidas a 450 mg  $\text{kg}^{-1}$  de cobre no solo. Fogarty & Tobin (1996) e Gadd (1993) evidenciaram estreita relação entre a produção de pigmentos extracelulares por fungos e a bioadsorção de metais. Alguns fungos ectomicorrízicos podem promover a acumulação de metais em seu micélio (BERTOLAZZI et al., 2010), corpos de frutificação (TURNAU, 1991), em outros tecidos fúngicos, e compartimentos internos (GADD, 1993; BLAUDEZ et al., 2000; GRAZZIOTTI et al., 2001;



BELLION et al., 2006). Desta forma, é possível que a presença dos isolados ectomicorrízicos possam ter retido o cobre em seu micélio, ou a produção de moléculas orgânicas capazes de adsorver elementos metálicos, evitando a absorção pelas raízes da erva-mate.

Tabela 3 – Cobre na parte aérea (CuPA) e no sistema radicular (CuR), cobre acumulado na parte aérea (CuAPA) e radicular (CuAR), cobre acumulado total (CuAT) e índice de translocação (ITRA) de mudas de *Ilex paraguariensis*, sem e com inoculação dos fungos UFSC – PT116 e UFSC – SU118, sem e com adição de composto de água residuária de suinocultura em solo contaminado com cobre.

Inoculação	CARS		CARS	
	Sem	Com	Sem	Com
	----- <b>CuPA (mg kg<sup>-1</sup>)</b> -----		----- <b>CuR (mg kg<sup>-1</sup>)</b> -----	
Controle	27,75 aA*	17,63 aB	775,91 aA	620,51 aB
PT116	11,55 cA	7,19 cB	402,39 cA	308,86 cB
SU118	16,55 bA	11,06 bB	497,43 bA	398,62 bB
CV (%)	12,75		9,0	
	----- <b>CuAPA (µg planta<sup>-1</sup>)</b> -----		----- <b>CuAR (µg planta<sup>-1</sup>)</b> -----	
Controle	68,77 aA	37,10 aB	505,80 aA	366,09 aB
PT116	29,34 bA	13,28 bB	263,69 bA	206,68 bA
SU118	38,13 bA	19,73 abB	319,32 bA	251,52 abA
CV (%)	34,35		24,05	
	----- <b>CuAT (µg planta<sup>-1</sup>)</b> -----		----- <b>ITRA (%)</b> -----	
Controle	574,58 aA	403,20 aB	12,13 aA	9,05 aA
PT116	293,04 bA	219,96 bA	10,64 aA	6,04 bB
SU118	357,45 bA	271,26 bA	11,23 aA	7,56 aA
CV (%)	22,59		32,36	

Fonte: Autor (2019).

\*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) de probabilidade de erro.

O cobre acumulado na parte aérea evidenciou diferença significativa, apresentando redução nos valores quando utilizado o CARS no solo e com associação ao isolado UFSC-PT116, esta redução foi na ordem de 64,2 % comparado ao tratamento controle (Tabela 3). As espécies arbóreas nativas *H. courbaril* e *P. dubium* submetidas a solo contaminado com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre apresentaram quantidades de 1.930 e 1.270 µg planta<sup>-1</sup>, respectivamente, deste metal na parte aérea, ocorrendo redução no teor de clorofila a (MARQUES et al., 2018). O cobre quando presente em pequenas quantidades atua como catalisador de reações químicas, metabolismo de carboidratos e síntese de clorofila (TAIZ et al., 2017). Entretanto, quando em excesso, seu acúmulo na parte aérea acaba diminuindo a biossíntese e o conteúdo

de clorofila, em decorrência a danos nas membranas dos tilacóides (ADREES et al., 2015). Verifica-se que a utilização do amenizante CARS e a presença dos fungos ectomicorrízicos no solo reduziu significativamente o acúmulo de cobre na parte aérea da erva-mate submetida a solo contaminado com esse metal.

Os resultados evidenciaram redução no cobre acumulado no sistema radicular com a utilização do CARS sem inoculação e com a inoculação do isolado UFSC-PT116 independente da adição de CARS (Tabela 3). O acúmulo do cobre nas raízes é uma das principais estratégias para evitar sua translocação para os tecidos fotossintéticos (CAMBROLLÉ et al., 2013), porém, o excesso de cobre no sistema radicular pode provocar a redução do crescimento nas raízes que apresentam ramificações anormais e redução do alongamento (AMBROSINI et al., 2015), evidenciando a importância de mecanismos que impeçam a absorção do cobre pelas plantas, como é o caso da capacidade das ectomicorrizas em quelar íons de metais no interior de suas células ou exsudatos (TURNAU, 1991) e reações de adsorção e complexação do CARS (PARK et al., 2011). Desse modo, evidencia-se que os isolados UFSC-PT116 e UFSC-SU118, podem reduzir os teores acumulados de cobre pelas raízes da erva-mate.

A adição do CARS reduz o cobre acumulado total nas plantas em relação ao tratamento controle, porém a inoculação com os isolados ectomicorrízicos UFSC-PT116 e UFSC-SU118 também reduz independente da adição de CARS (Tabela 3). Em seu trabalho com *Eucalyptus grandis*, submetido a solo com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, Negrini (2017) verificou que a utilização do fungo micorrízico arbuscular *Acaulospora colombiana* promoveu redução de 58,1% no cobre acumulado total das mudas em relação ao tratamento sem inoculação. O mesmo autor relata que o uso do composto de água residuária de suinocultura reduziu 9,8% o acúmulo total de cobre nas plantas comparado ao tratamento controle, porém não havendo interação significativa entre os fatores inoculação e CARS.

O fungo ectomicorrízico UFSC Pt116 além de reter metais no seu micélio, pode também estar atuando na produção de pigmentos extracelulares capazes de adsorver o cobre evitando a absorção pelo sistema radicular das mudas (SILVA et al., 2010). Tais resultados evidenciam que a utilização das ectomicorrizas e/ou CARS como amenizante da contaminação com cobre no solo reduz o acúmulo desse elemento químico, proporcionando menores valores no acúmulo total em relação às plantas controle.

O índice de translocação de cobre nas plantas de erva-mate evidenciou diferença significativa entre as inoculações e a adição de CARS no solo, induziu redução de 43,2 % nas plantas com o isolado UFSC-PT116 associadocom o CARS quando comparado ao mesmo

isolado sem a presença do composto orgânico no solo (Tabela 3). Tais resultados corroboram com os obtidos por Negrini (2017), em trabalho com CARS como amenizante da toxidez do cobre em *E. grandis*, que verificaram menores valores do índice de translocação nos tratamentos com o uso de amenizante. Conforme destacado por Branzini et al. (2012), quando o índice de translocação for baixo ou próximo a zero, maior será a possibilidade de sobrevivência e crescimento da planta em ambiente contaminado. Os resultados indicam a capacidade dos fungos ectomicorrízicos, em conjunto com o amenizante CARS em promover a retenção de cobre no sistema radicular, favorecendo a redução do índice de translocação de cobre em mudas de *Ilex paraguariensis*.

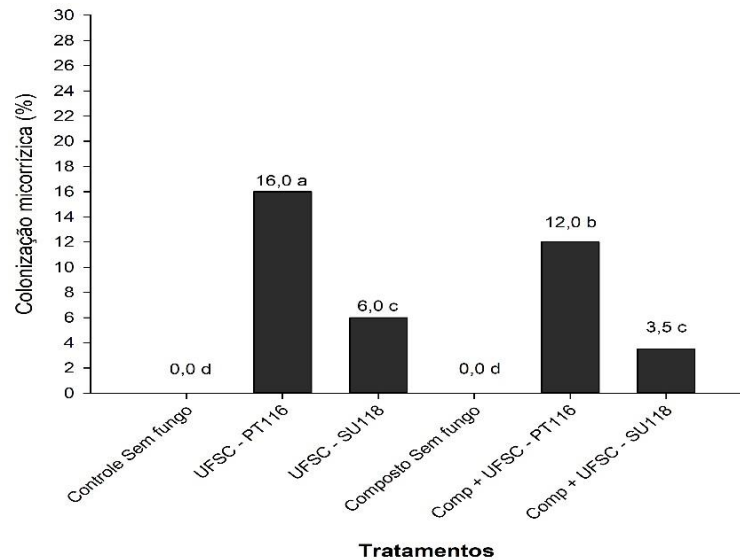
### 5.5.3 Colonização micorrízica

Os resultados demonstraram interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os isolados ectomicorrízicos e a adição de CARS no solo para o percentual de colonização micorrízica (Figura 1). Observa-se que os isolados ectomicorrízicos colonizaram as raízes de erva-mate com diferentes graus de intensidade, variando conforme o tratamento utilizado. Destaca-se o isolado UFSC-PT116, com 16 % de colonização quando submetido ao solo contaminado com 400 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, porém, ao adicionar o composto CARS juntamente ao fungo o percentual de colonização reduziu para 12 % (Figura 1).

Foi observado por Dellai et al. (2018) que o isolado UFSC-PT116 formou associação ectomicorrízica com o *E. saligna*, porém, a dose 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre reduziu para 8,60 % a porcentagem de colonização radicular. Com mudas de *P. dubium*, a colonização micorrízica com o fungo UFSC-PT116 foi de 6,6 e 4,2% em solo com 300 e 450 mg kg<sup>-1</sup> de cobre no solo, respectivamente (SILVA et al., 2010).

Os metais pesados podem expressar efeito prejudicial sob os fungos ectomicorrízicos, reduzindo a colonização micorrízica (GRAZZIOTTI, 1999). Quando em excesso no solo, os metais pesados podem influenciar negativamente os fungos ectomicorrízicos (DIXON & BUSCHENA, 1988), podendo causar a inibição da colonização em plantas (BELL et al., 1988; GRAZZIOTTI, 1999). Conforme Silva et al. (2010) e Dellai et al. (2018) observa-se que os fungos ectomicorrízicos podem responder de forma diferenciada de acordo com a espécie e o nível de contaminação do solo. Apesar de que o fungo UFSC-PT116 tenha reduzido a absorção de cobre pela planta, a associação pode ter sido influenciada pela toxidez deste metal (SILVA et al., 2010).

Figura 1 – Porcentagem de colonização micorrízica de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com 400 mg kg<sup>-1</sup> cobre. Tratamento controle, com inoculação de UFSC-PT116, com inoculação de UFSC-SU118, com adição de composto de água residuária de suinocultura, composto + UFSC-PT116 e composto + UFSC-SU118.



Fonte: Autor (2019).

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) de probabilidade de erro.

Constata-se que o teor de fósforo no composto CARS eleva os teores naturais do solo, podendo agir como fator limitante para o estabelecimento da colonização micorrízica.

Em trabalhos com micorrizas e espécies arbóreas é necessário avaliar a influência do fósforo no solo, pois a associação fungo-hospedeiro variam com os diferentes teores de fósforo e espécies envolvidas (SAMARÃO et al., 2011), bem como, essa interação pode ter aumento ou diminuição de acordo com a disponibilidade de P no solo (YANG et al., 2014).

Na associação fungo-planta, o fungo depende da planta hospedeira para alimentação e reprodução e, em troca fornece fosfato e nutrientes minerais essenciais do solo para a planta hospedeira (SCHIAVO et al., 2018). O micélio extra-radical das micorrizas absorvem o P do solo, promovem o transporte até as células do cortex na forma de polifosfatos, e após a solubilização os mesmos são translocados para a planta hospedeira (MELLONI et al., 2000).

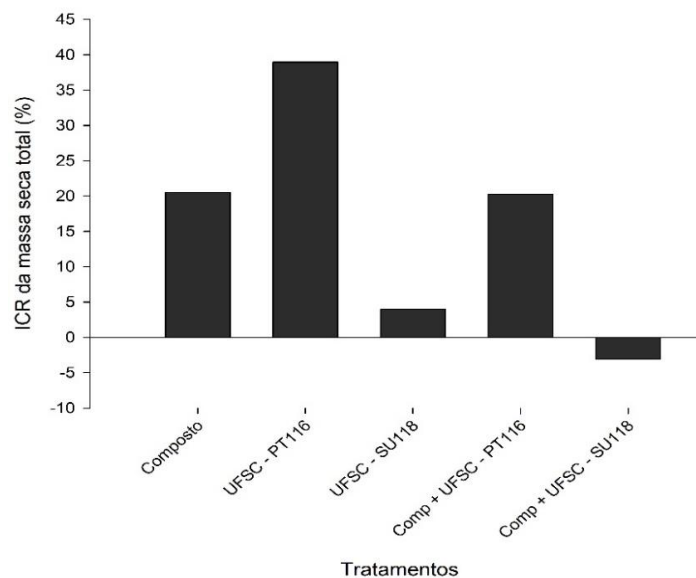
Os altos teores de P na planta, de maneira geral, inibem a colonização das raízes pelos fungos micorrízicos, enquanto baixos teores favorecem a colonização radicular (SCHIAVO et al., 2018). Essa resposta é atribuída ao fato de que altas concentrações de P promovem menor permeabilidade da membrana e exsudação radicular, diminuindo a nutrição do fungo e aumento da sacarose transportada via floema até as raízes inibindo o crescimento fúngico (KIRIACHEK et al., 2009). Alguns trabalhos mostram que elevados teores de P no solo não tem interferência na colonização micorrízica, como Silva et al. (2017) em mudas de cedro-

australiano (*Toona ciliata* M. Roem var. *australis*) e Almeida (2007) com mudas de cana-de-açúcar (*Sacharum spp.*), porém, esta resposta ao fósforo varia de acordo com a espécie vegetal e o fungo.

#### 5.5.4 Índice de crescimento relativo da massa seca total

O índice de crescimento relativo da massa seca total revelou aumento no crescimento das mudas de erva-mate com a adição de CARS no solo e com a inoculação de ectomicorrizas, promovendo aumento de 20,5 % com adição do composto CARS, 38,9 % com a inoculação do isolado UFSC-PT116 e 3,9 % com a inoculação do isolado UFSC-SU118 (Figura 2). Quando associado o CARS ao isolado UFSC-PT116, o aumento foi de 20,8 %, já a utilização conjunta do CARS com o isolado UFSC-SU118 promoveu decréscimo de 3,1 % na altura das plantas, comparadas ao tratamento controle (Figura 2).

Figura 2 – Índice de crescimento relativo (ICR) da massa seca total de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com 400 mg kg<sup>-1</sup> cobre. Tratamento com adição de composto de água residuária de suinocultura, com inoculação de UFSC-PT116, com inoculação de UFSC-SU118, composto + UFSC-PT116 e composto + UFSC-SU118.



Fonte: Autor (2019).

Desta forma, de acordo com a espécie de isolado ectomicorrízico utilizado e quando associado ao uso do CARS, ocorreu redução na quantidade de cobre que ficou retido nos tecidos da planta, O fungo micorrízico pode reter os metais em seu micélio, retardando a translocação destes para a parte aérea da planta, contribuindo assim, para o aumento da sua

tolerância (BERTOLAZZI, et al., 2010). Assim, nas mudas de erva-mate que receberam a inoculação com o isolado UFSC-PT116 permitiu-se o crescimento das plantas no solo contaminado com cobre, indicando que esta simbiose entre erva-mate e ectomicorrizas pode ser um mecanismo que proporciona aumento na tolerância à toxicidade do metal em relação às plantas não micorrizadas e sem a adição de CARS no solo.

## 5.6 CONCLUSÕES

O uso de fungos ectomicorrízicos e de CARS amenizam o efeito negativo do cobre no crescimento das mudas de *Ilex paraguariensis*.

O teor e acúmulo de cobre no tecido vegetal das plantas de *Ilex paraguariensis* são reduzidas quando há associação com o fungo UFSC-PT116 independentemente da adição de CARS no solo.

## 5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 21-26, 1998.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: SBCS, 2000. p. 299-352.

ADREES, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F.; FARID, M. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review: **Environmetal Science and Pollution Research International**. 2015; 22:8148-62.

AGGANGAN, N. S.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal *Pisolithus* and formation of ectomicorrizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Geoderma**, Amsterdam, v. 84, n. 1-3, p. 15-27, 1998.

ALMEIDA, A. A. F.; VALLE, R. R.; MIELKE, M. S.; GOMES, F. P. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 2007; 19(2): 83-98. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202007000200001>.

ALMEIDA, R.S. (2007) - **Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato de cana-de-açúcar (*Sacharum spp.*) durante a simbiose com micorrizas arbusculares**. 187 p. Tese de Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil.

AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; PRADO, J. P. C.; BORGHEZAN, M.; MELO, G. W. B.; SOARES, C. R. F. S.; COMIN, J. J.; SIMÃO, D. G.; BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of Young vines (*Vitis lababrusca* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**. v.96, p.270-280, 2015.

- ANDRADE, S. A. L.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; SILVEIRA, A. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 2, p. 198–207, 2010.
- ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; ANTONIOLLI, Z. I.; QUADRO, M. S.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127–136, 2013.
- ANDREAZZA, R.; OKEKE, B. C.; LAMBAIS, M.R.; BOLTOLON, L.; DE MELO, G. W.; CAMARGO, F. A. Bacterial stimulation of copper phytoaccumulation by bioaugmentation with rhizosphere bacteria. **Chemosphere**, Oxford, v. 81, p. 1149-1155, 2010.
- ANVISA, Decreto n° 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n° 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n° 691, de 13 de março de 1962. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Data de acesso: 22/05/19.
- BELL, R.; EVANS, C. S.; ROBERTS, E. R. Decreased incidence of mycorrhizal root types associated with soil heavy metal enrichment. **Plant and Soil**, Crawley, v. 106, n. 1, p. 143-145, 1988.
- BELLION, M.; COUBOT, M.; JACOB, C.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 254, p. 173-181, 2006.
- BERNARDO, S.; SOARES, A. A.; MANTOVANI, E. C. **Manual de irrigação**. 8.ed. Viçosa: UFV, 2008, 625p.
- BERTOLAZZI, A. A.; CANTON, G. C.; AZEVEDO, I. G.; CRUZ, Z. M. A.; SOARES, D. N. E. S.; CONCEIÇÃO, J. M.; SANTOS, W. O.; RAMOS, A. C. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. **Natureza on line**, Santa Teresa, v. 8, n. 1, p. 24-31, 2010.
- BLAUDEZ, D.; BOTTON, B.; CHALOT, M. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Microbiology-UK**, v.146, p.1109-1117, 2000.
- BRACESCO A, SANCHEZ AG, CONTRERAS V, MENINI T, GUGLIUCCI A. **Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview**. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 136: 378-384.
- 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.
- BRUNDRETT, M. C. **Mycorrhizal Associations**: the web resource. 2008. Disponível em: <mycorrhizas.info>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; OCETE, R.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**. 93(2):294-301, 2013.
- CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F.; ARAUJO, D. L.; FRANÇA, C. P. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-mansão. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 2, p. 167-176, 2010.

- COLPAERT, J. V.; VAN ASSCHE, J. A. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. **New Phytologist**, Cambridge, v. 123, n. 2, p. 325-333, 1993.
- COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, p. 103-117, 2007.
- DE MARCO, R.; SILVA, R. F.; ROS, C. O.; VANZAM, M.; BOENO, D. *Senna multijuga* e turfa em fitoestabilização do cobre em solo contaminado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 421-426, 2017.
- DE MARCO, R.; SILVA, R. F.; SCHEID, D. L.; ROS, C. O.; SILVA, V. R. Amenizante Orgânico e *Eucalyptus grandis* para Fitoestabilização de Solo Contaminado com Cobre. **Floresta e Ambiente** 2017, v. 8087, 2017.
- DELLAI, A.; SILVA, R. F.; ANDREAZZA, R. Ectomicorriza no crescimento de *Eucalyptus saligna* em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 624-631, 2018.
- DELLAI, A.; SILVA, R. F.; PERRANDO, E. R.; JACQUES, R. J. S.; GROLLI, A. L.; MARCO, R. D. Óleo de eucalipto e *Pisolithus microcarpus* no crescimento de bracinga em solo contaminado por cobre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 2014; 18(9): 927-933.
- DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **The Forestry Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960.
- DIXON, R. K.; BUSCHENA, C. A. Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. **Plant and Soil**, Crawley, v. 105, n. 2, p. 265-271, 1988.
- FERREIRA, D. F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2011.
- FERREIRA, P. A. A.; SILVA, E. P.; ARMAS, R. D.; LAZZARETTI, B. P.; MELO, G. W. B.; ZALAMENA, L.; SOARES, C. R. F. S. **Estratégias de amenização da fitotoxidez de metais pesados em solos de vinhedos**. n. Figura 1, p. 111-138, 2016.
- FORGATY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanins and their interactions with metal. **Enzyme and Microbial Technology**, Kyungbug, v. 19, n. 4, p. 311-317, 1996.
- GABOS, M. B. et al. Uso da matéria orgânica como mitigadora de solo multicontaminado e do girassol como fitoextratora. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 1298-1306, 2011.
- GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 11, p. 25-60, 1993.
- 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.
- GRAZZIOTTI, P. H. **Comportamento de fungos ectomicorrízicos, *Acacia mangium* e espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* em solo contaminado por metais pesados**. Lavras: UFL, 1999. 177 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, 1999.
- GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeito do Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 831-838, 2001.



- HARLEY, J. L. **The biology of mycorrhiza**. London: Leonard Hill, 1969. 230 p.
- HARTLEY, J., CAIRNEY, J. W.G.; SANDERS, F. E.; MEHARG, A. A. Toxic interactions of metal ions (Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Sb<sup>3-</sup>) in vitro biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 137, n. 3, p. 551-562, 1997.
- HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. (eds). **Methods in Comparative Plant Ecology**. London: Chapman & Hall, 1993. P.148-152.
- JORGE, L. A. C.; SILVA, D. J. C. B. **Safira: Manual de utilização**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010.
- KABATA-PENDIAS A. **Trace elements in soils and plants**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press; 2011.
- KAWAKAMI, M.; KOBAYASHI, A. J. Agric. Food. **Chemical.**, v.39, 1275-1279. 1991.
- KIRIACHEK, S. G.; AZEVEDO, L. C. B.; PERES, L. E. P.; LAMBAIS, M. R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, vol. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.
- KOPITTKE, P. M.; MENZIES, N. W. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, v. 279, n. 01/02, p. 287-296, 2006.
- LEQUEUX, H. et al. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 673-682, 2010.
- LORENZI, Harri. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 2000. v. 1.
- MACCARI JUNIOR, Agenor. **Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão**. 2005. 215 f. Dissertação (Doutor em Engenharia Agrícola) – Pós-Graduação em Tecnologia Pós-Colheita, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- MANN; RITCHIE, P. G. S. P. Influence of pH on on the the Forms Forms of Cadmium in Four West Australian Australian Soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 31, p. 255–270, 1993.
- MARQUES, D. M.; SILVA, A. B.; MANTOVANI, J. R.; PEREIRA, D. S.; SOUZA, T. Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. **Revista Árvore**, v.42, n.2, 2018.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3. ed. London: Elsevier, 2012.
- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathologist**, Saint Paul, v. 59, p. 153-163, 1969.
- MELLONI, R.; NOGUEIRA, M. A.; FREIRE, V. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Fósforo adicionado e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição mineral de limoeiro-cravo [*Citrus limonia* (L.) OSBECK]. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, vol. 24, n. 3, p. 767-775, 2000.

- 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, D. A.; SOUZA, J. R.; REIS, E.; GARIGLIO, H. E.; REIS, R. Estudo da adsorção simultânea de cobre, níquel e zinco por vermicomposto utilizando planejamento fatorial. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 9, n. 2, p. 216-227, 2012.
- NEGRINI, A. Amenizante orgânico e micorrizas arbusculares em mudas de eucalipto cultivadas em solo contaminado com cobre. Dissertação de **mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e Ambiente. UFSM. 2017, 71p.
- PARK, J. H.; LAMB, D.; PANEERSELVAM, P.; CHOPPALA, G.; BOLAN, N.; CHUNG, J. W. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal (loid) contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2–3, p. 549–574, 2011.
- PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 496-501, 1997.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2007. 906 p.
- 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**, v. 8, n. 1, p. 262–276, 2016.
- ROSSI, V. L.; AMARANTE, C. V. T.; FLEIG, F. D. Crescimento e qualidade de mudas de *Pinus taeda* l. submetidas à poda química de raízes. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 435- 442, 2008.
- SAMARÃO, S. S. et al. Desempenho de mudas de gravioleira inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo não-esterilizado, com diferentes doses de fósforo. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 81-88, 2011.
- SCHIAVO, J. A.; AZEVEDO, L. S.; LIMA, M.F.; OLIVEIRA, N. S.; LOPES, V. R. Crescimento inicial de cana-de-açúcar inoculada com fungos micorrízicos arbusculares e fósforo. **Rev. de Ciências Agrárias**. vol.41 no.2 Lisboa jun. 2018.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**. 2012;9:671.
- SILVA, E. P.; FERREIRA, P. A. A.; FURTINI-NETO, A. E.; SOARES, C. R. F. S. Micorrizas arbusculares e fosfato no desenvolvimento de mudas de cedro-australiano. **Ciência Florestal**. vol.27 no.4. Santa Maria, Oct./Dec. 2017.
- SILVA, I. C.; ROCHA, C.; ROCHA, M. C.; SOUSA, C. M. Growth of *Brachiaria decumbens* in Latosol contaminated with copper. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, vol.42, n.2, 2018.
- SILVA, M. A.; COSTA, M. D.; ROCHA, R. B.; BORGES, A. C. Formação de ectomicorrizas por monócários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 31, n. 5, p. 917-929, 2007.

- SILVA, R. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; LUPATINI, M.; TRINDADE, L. L.; SILVA, A. S. Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.) Inoculada com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 147-156, jan. -mar., 2010.
- SILVA, R. F.; ROS, C. O. D.; SCHEID, D. L.; GROLLI, A. L.; MARCO, R. D.; MISSIO, E. L. Copper translocation and tolerance in seedlings of tree species grown in contaminated soil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 19(11):1093-9, 2015.
- SILVA, R. F.; ROS, C. O.; DELLAI, A.; GROLLI, A. L.; SCHEID, D. L.; VIEL, P. 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**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 647-655, 2016.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3.ed., San Diego: Academic Press, 2008. 787p.
- SOUZA, E. L.; ANTONIOLLI, Z. I.; MACHADO, R. G.; ECKHARDT, D. P.; DAHMER, S. F. B.; SCHIRMER, G. K. Efeito da inoculação com isolados de fungos ectomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 251-261, abr.-jun., 2012.
- SOUZA, E. P.; SILVA, I. F.; FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, p. 167-173, 2011.
- STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K.; JACQUES, R. J. S.; SILVA, R. F. Ação do óleo essencial de eucalipto na micorrização e no estabelecimento de *Eucalyptus grandis* em solo contaminado por cobre. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, p. 245-255, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2017, 888p.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).
- TURNAU, K. The influence of cadmium dust on fungi in a Pino-Quercetum forest. **Ekologia Polska**, v.39, n.1, p.39-57, 1991.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3050 B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils**. Washington, 1996. 12p.
- WENDLING I, DUTRA LF. Produção de mudas de eucalipto por sementes. In: Wendling I, Dutra LF. Produção de mudas de eucalipto. Colombo: Embrapa Florestas; 2010.
- WILKINS, D. A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root grown. **The New Phytologist**, v. 80, p. 623-633, 1978.
- YANG, G. et al. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and soil phosphorus availability influences plant community productivity and ecosystem stability. **Journal of Ecology**, London, v. 102, n. 4, p. 1072-1082, 2014.
- YRUELA, I. Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009.
- YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, p. 1090-1109, 2013.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

Os fungos ectomicorrízicos se destacam por interagir com as espécies vegetais formando uma associação simbiótica mutualística (PEROTTO & BONFANTE, 1997), contudo, apresentam especificidade quanto ao hospedeiro (SOUSA et al., 2012). A inoculação com os isolados ectomicorrízicos UFSC-PT116 e UFSC-SU118 reduz o efeito de toxicidade provocado pelo excesso de cobre no solo em *Ilex paraguariensis*, onde o isolado UFSC-PT116 promove maior crescimento e tolerância de mudas de erva-mate cultivadas em solo contaminado com cobre. A inoculação de ectomicorrizas em *Ilex paraguariensis* promove menor acúmulo de cobre nas plantas. Esta associação simbiótica proporciona aumento da área de contato da planta com o solo, permitindo maior absorção de nutrientes e água do solo (SMITH & READ, 2008), além da capacidade de retenção de metais pesados pelo micélio das ECM e a possibilidade de funcionar como uma barreira física para que estes contaminantes não sejam absorvidos pela planta hospedeira (BERTOLAZZI et al., 2010).

O composto de água residuária de suinocultura adicionado ao solo promove aumento do cobre pseudo-total e da fração de cobre adsorvida à matéria orgânica, devido ao CARS ter o cobre em sua constituição e à grande proporção de matéria orgânica presente no composto. A utilização do CARS proporciona efeito amenizante da toxidez do cobre no solo, induz positivamente o crescimento e reduz o acúmulo de cobre das plantas de *Ilex paraguariensis* submetidas à solo contaminado por cobre. A disponibilidade de íons metálicos no ambiente pode ser reduzida significativamente pela matéria orgânica, devido principalmente à presença de substâncias ricas em grupos funcionais com cargas negativas, tais como ácidos carboxílicos e hidroxilas fenólicas e alcoólicas, que são os locais que podem adsorver os metais em solução (MORREIRA et al., 2012).

Conforme os resultados dos trabalhos 1 e 2, realizou-se o trabalho 3, onde a partir disso foram determinadas as escolhas dos fungos e proporção de CARS a serem utilizadas, promovendo a inoculação com os fungos ectomicorrízicos UFSC-PT116 e UFSC-SU118 juntamente com a adição de 30% de CARS em mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre. Foi constatado que sem a presença dos fungos ectomicorrízicos e de CARS o cobre interfere negativamente e com intensidade maior no crescimento das mudas de *Ilex paraguariensis*. Contudo, o teor e acúmulo de cobre no tecido vegetal das plantas de *Ilex paraguariensis* são reduzidas quando há associação com o fungo UFSC-PT116 independentemente da adição de composto de água residuária de suinocultura no solo.

A afinidade que os metais possuem pelos sítios de sorção da matéria orgânica propicia que a adição de compostos orgânicos reduza a disponibilidade de metais pesados no solo (TIECHER et al., 2013) e por aumentar a complexação ou quelação à matéria orgânica (KABATA-PENDIAS, 2011). Assim como, diversas espécies de fungos podem, ainda, apresentar elevada tolerância a metais pesados (MEDVE & SAYRE, 1994) sendo atribuído à habilidade dessas associações em acumular altas concentrações de metais em seus corpos de frutificação (TURNAU, 1991), ou em outros tecidos fúngicos, na parede celular e em compartimentos internos (BLAUDEZ et al., 2000; GRAZZIOTTI et al., 2001; BELLION et al., 2006).

Orienta-se o desenvolvimento de estudos que possam investigar outras espécies de ectomicorrizas, pois podem evidenciar outros isolados fúngicos eficientes e potenciais para utilização como inóculo, além da utilização de proporções maiores de CARS como amenizante.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentou evidências em favor da hipótese, evidenciou-se que o cobre tem efeito negativo no crescimento das mudas de *Ilex paraguariensis* sem a presença de fungos ectomicorrízicos. A inoculação com UFSC-PT116, UFSC-PT132 e UFSC-SU118 ameniza o efeito de toxicidade provocado pelo excesso de cobre no solo em *Ilex paraguariensis*. O isolado UFSC-PT116 promove maior crescimento e tolerância de mudas de *Ilex paraguariensis* cultivadas em solo contaminado com cobre e a inoculação de ectomicorrizas em *Ilex paraguariensis* promove menor acúmulo de cobre nas plantas.

O composto de água residuária de suinocultura adicionado ao solo promove aumento do cobre pseudo-total no solo e da fração de cobre adsorvida à matéria orgânica, devido ao CARS ter o cobre em sua constituição e à grande proporção de matéria orgânica presente no composto. A proporção média 30% composto de água residuária de suinocultura proporciona efeito amenizante da toxidez do cobre no solo, favorece o crescimento e reduz o acúmulo de cobre das plantas de *Ilex paraguariensis*. O composto de água residuária de suinocultura possui condições de proporcionar o crescimento de plantas em solo com altas concentrações de cobre, promovendo efeito amenizante da toxidez do metal.

Os resultados indicam que o cobre interfere negativamente e com intensidade maior no crescimento das mudas de *Ilex paraguariensis* quando não há a presença de fungos ectomicorrízicos e de CARS no solo. O cobre no tecido vegetal das plantas de *Ilex paraguariensis* são reduzidas quando há associação com o fungo ectomicorrízico UFSC-PT116 independentemente da adição de CARS no solo.

Os estudos relacionados ao crescimento da erva-mate em áreas contaminadas com metais pesados, em especial o cobre, ainda são escassos, aliado ao conhecimento incipiente sobre a formação de ectomicorrizas e seus benefícios para esta espécie florestal nativa. Torna-se importante a elaboração de novos trabalhos, com a finalidade de encontrar mais espécies de ectomicorrizas com potencial de inóculo, bem como o uso do composto de água residuária de suinocultura como amenizante que proporcionem maior crescimento e tolerância de espécies nativas ao cobre.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGANGAN, N. S.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal *Pisolithus* and formation of ectomicorrizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Geoderma**, Amsterdam, v. 84, n. 1-3, p. 15-27, 1998.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. **Chemosphere**, 91(7):869-81, 2013.
- ANDREAZZA, R.; ANTONIOLLI, Z. I.; LEAL, L. T.; JUNIOR, C. M.; SILVA, R. F. Ectomicorrizas em grápia [*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbride] e canafístula [*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert] *in vitro*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 727-734, out.-dez, 2011.
- ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; ANTONIOLLI, Z. I.; QUADRO, M. S.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.
- ANDREAZZA, R.; OKEKE, B. C.; LAMBAIS, M. R.; BORTOLON, L.; MELO, G. W. B.; CAMARGO, F. A. O. Estimulação bacteriana da fitoacumulação de cobre por bioaumentação com bactérias da rizosfera. **Chemosphere**, v.81, p.1149-1154, 2010.
- BARKER, S. J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, v.116, n.4, p.1021-1207, 1998.
- BAUMERT, A.; SCHUMANN, B.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J.; STRACK, D. Triterpenoids from *Pisolithus tinctorius* isolates and ectomycorrhizas. **Phytochemistry**, v.45, n.3, p.499-504, 1997.
- BELLION, M.; COUBOT, M.; JACOB, C.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 254, p. 173-181, 2006.
- BERNARDI, E.; CALDEIRA, M. F.; NASCIMENTO, J. S. **Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, p. 489-493, 2005.
- BERTÉ, K. A. S. **Tecnologia da Erva-Mate**. Tese (Doutorado), 160f. Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, Paraná, 2011.
- BERTOLAZZI, A. A.; CANTON, G. C.; AZEVEDO, I. G.; CRUZ, Z. M. A.; SOARES, D. N. E. S.; CONCEIÇÃO, J. M.; SANTOS, W. O.; RAMOS, A. C. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. **Natureza on line**, Santa Teresa, v. 8, n. 1, p. 24-31, 2010.
- BLAUDEZ, D.; BOTTON, B.; CHALOT, M. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Microbiology-UK**, v.146, p.1109-1117, 2000.
- BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p.378-384, 2011.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and proprieties of soils**. 13 ed. Upper Saddle River, New Jersey, 2002, 960p.

BRUNDRETT, M. C. **Mycorrhizal Associations: the web resource**. 2008. Disponível em: Acesso em: 05 mai. 2019.

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B. **Working with mycorrhizal in forestry and agriculture**. Canberra: ACIAR, 1996. 400p.

BRUNDRETT, M.; MALAJCZUK, N.; MINGQIN, G.; DAPING, X.; SNELLING, S.; DELL ET, B. Nursery inoculation of Eucalyptus seedlings in Western Australia and Southern China using spores and mycelial inoculum of diverse ectomycorrhizal fungi from different climatic regions. **Forest Ecology and Management**, Victoria, v. 209, p. 193-205, 2005.

BRUNETTO, G., MIOTTO, A., CERETTA, C. A., SCHMITT, D. E., HEINZEN, J., MORAES, M. P., CANTON, L., TIECHER, T. L., COMIN, J. J., GIROTTO, E. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide amended vineyard sandy soils. **Arch. Agron. Soil Sci.** 60, 609e624, 2014.

CAIRES, S. M. **Comportamento de mudas de espécies florestais nativas na fitorremediação de solo contaminado com zinco e cobre**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2005.

CAMBROLLE, J., GARCÍA, J. L., FIGUEROA, M. E., CANTOS, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, 120, 171e178, 2015.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: CNPF/ EMBRAPA, p. 280-287, 1994.

CARVALHO, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: **Embrapa/Florestas**, v. 1. (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras). 2003.

CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F.; ARAUJO, D. L.; FRANÇA, C. P. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso. **Revista Ciência Agronômica**. vol.41 no.2 Fortaleza, 2010.

CHEN, P. Y., LEE, Y. I., CHEN, B. C., JUANG, K. W. Effects of calcium on rhizotoxicity and the accumulation and translocation of copper by grapevines. **Plant Physiol. Biochem.** 73, 375e382, 2013.

CHEN, Y. & AVIAD, T. **Effects of humic substances on plant growth**. In: MCCARTHY, P.; CLAPP, C.E.; MALCOLM, R.L. & BLOOM, P.R. Humic substances in soil and crop sciences. Madison, American Society of Agronomy e Soil Science Society of America. p.161-186, 1990.

COLPAERT, J. V.; VAN ASSCHE, J. A. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. **Functional Ecology**, v.1, n.4, p.415-421, 1987.

COLPAERT, J. V; VAN ASSCHE, J. A. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. **New Phytologist**, Cambridge, v. 123, n. 2, p. 325-333, 1993.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 15 mai. 2019.



COSTA, M. D. et al. Ectomicorrizas: a face oculta da floresta. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 38-46, 2003.

DANIEL, O. **Erva-mate, Sistema de produção e processamento industrial**; Dourados, MS: UFGD; UEMS, 2009.

EMBRAPA. **Cultivo da Erva-Mate**. Sistemas de Produção, Embrapa, 1ª ISSN 1678-8281. Abr/2014, 2ª edição.

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 (VQR) dos solos para nove elementos químicos naturalmente presentes nas diferentes províncias geomorfológicas/geológicas do estado do Rio Grande do Sul.

FOSSATI, L. C.; REISSMANN, C. B. Avaliação do estado nutricional e da produtividade de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate), em função do sítio. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. Anais. Colombo: **EMBRAPA-CNPQ**. p.439.1997.

GABOS, M. B.; CASAGRANDE, G.; ABREU, C. A.; PAZ-FERREIRO, J. Uso da matéria orgânica como mitigadora de solo multicontaminado e do girassol como fitoextratora. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p.1298-1306, 2011.

GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 11, p. 25-60, 1993.

GAUTAM, S.; ANJANI, K.; SRIVASTAVA, N. In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). **Physiology and Molecular Biology of Plants**. 2016;22(1):121-9.

GRAZZIOTTI, P. H. **Comportamento de fungos ectomicorrízicos, *Acacia mangium* e espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* em solo contaminado por metais pesados**. Lavras: UFL, 1999. 177 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, 1999.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeito do Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 831-838, 2001.

GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Espécies arbóreas e ectomicorrizas em relação ao excesso e metais pesados. In: CURI, R. F. et al. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 3, p. 55-105, 2003.

GREGIANINI, T. S.; WINGE, H. **Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae)**. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3. Encantado. Anais... Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 373-380. 2000.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 224, p. 338-344, 1996.

GUPTA, M. P. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: CYTED, p. 46-47, 1995.

HARTLEY, J. *et al.* Toxic interactions of metal ions (Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Sb<sup>3-</sup>) in vitro biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 137, n. 3, p. 551-562, 1997.

HLADUN, R. K.; PARKER, R. D.; TRUMBLE, T. J. Cadmium, copper, and lead accumulation and bioconcentration in the vegetative and reproductive organs of *Raphanus sativus*: implications for plant performance and pollination. **Journal of Chemical Ecology**: 41(4)386-395, 2015.

HUGEN, C.; MIQUELLUTI, D. J.; CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A.; FERREIRA, E. R. N. C.; POZZAN, M. Teores de Cu e Zn em perfis de solos de diferentes litologias em Santa Catarina Cu and Zn contents in soil profiles of different lithologies in Santa Catarina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 6, p. 622–628, 2013.

IBGE - Banco de dados. IBGE – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 mai 2019.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção Agrícola Municipal, Culturas Temporárias e Permanentes**, 2015, v. 42, 2015; Brasil. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2015\\_v42\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2015_v42_br.pdf). Acesso em 18 mai 2019.

JORGE, R. A. B.; ABREU, C. A.; ANDRADE, C. A.; CAMARGO, A. O. Torta de filtro e turfa na mitigação de solo contaminado com resíduo de sucata rico em boro. **Bragantia**, v.69, p.467-476, 2010.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1992. 315 p.

KING, L. D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. T.; FONTES, M. P. F. (Eds.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, 1996, p.823-836.

KOPITTKE, P. M., ASHER, C. J., BLAMEY, F. P. C., MENZIES, N. W. Toxic effects of Cu<sup>2+</sup> on growth, nutrition, root morphology, and distribution of Cu in roots of *Sabi grass*. **Sci. Total Environ**. 407, 4616e4621, 2009.

LEQUEUX, H., HERMANS, C., LUTTS, S., VERBRUGGEN, N. Response to copper excesso in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiol. Biochem**. 48, 673e682, 2010.

LI, J.; HU, H. W.; MA, Y. B.; ZHANG, L. M.; HE, J. Copper pollution decreases the resistance of soil microbial community to subsequent dry-rewetting disturbance. **Journal of Environmental Sciences**, 39:155- 164, 2016.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Vol. 01, 3° Ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 90-91, 2008.

MACCARI JUNIOR, A.; MAZUCHOWSKI, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba:

Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate; MCT; CNPq; Projeto PADCT Erva-Mate, 2000. 176 p.

MACKIE, K. A.; MÜLLER, T.; KANDELER, E. Remediation of Cu in vineyards-a mini review. **Environmental Pollution**, v.167, p.16-26, 2012.

MANOJ, K.; KUMAR, B.; PADHY, PK Caracterização de Metais na Água e Sedimentos do Rio Subarnarekha ao longo dos Sítios do Projeto na Bacia Inferior, na Índia. **Revista Universal de Pesquisa e Tecnologia Ambiental**, v. 2, n. 5, p. 402-410, 2012.

MARQUES, D. M.; SILVA, A. B.; MANTOVANI, J. R.; PEREIRA, D. S.; SOUZA, T. C. Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. Viçosa: **Revista Árvore**, v. 42, n. 2, 2018.

MARTINS, R.G. O problema econômico do mate. Rio de Janeiro, **Ministério da Agricultura**, 1949. 43p.

MATEOS-NARANJO, E.; ANDRADES-MORENO, L.; CAMBROLLÉ, J.; PEREZ-MARTIN, A. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 90:136-42, 2013.

MAZUR, L.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; DEMCZUJ JR, B.; RIBANI, R. H. Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxantines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of food composition and analysis**, 35, 55-60, 2014.

MEDRADO, M. J. Trabalhos no cultivo de plantas industriais – erva – mate: adubação, tratos culturais e podas. Curitiba: **SENAR-PR**, 2004.

MEDVE, R. J.; SAYRE, W. G. Heavy metals in red pines, basidiomycetes sporocarps and soils on bituminous stripmine spoils. **Journal of the Pennsylvania Academy of Science**, Pennsylvania, v. 68, p. 131-135, 1994.

MICHAUD, A. M., CHAPPELLAZ, C., HINSINGER, P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). **Plant Soil**, 310, 151e165, 2008.

MORAES, R.M.; SANTOS FILHO, P. R.; CARVALHO, M.; NOGUEIRA, M. L.; BARBOSA, S. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**.13(2):115-21, 2015.

MOREIRA, D. A.; SOUZA, J. R.; REIS, E.; GARIGLIO, H. A.; REIS, C. Estudo da adsorção simultânea de cobre, níquel e zinco por vermicomposto utilizando planejamento fatorial. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 9, n. 2, p. 216-227, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MUDHOO, A.; GARG, V. K.; WANG, S. Removal of heavy metals by biosorption. **Environmental Chemistry letters**, v. 10, n.2, p. 109-117, 2012.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**; 8(3):199-216, 2010.

NEGRINI, A. **Amenizante orgânico e micorrizas arbusculares em mudas de eucalipto cultivadas em solo contaminado com cobre**. 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Agricultura e Ambiente) – Departamento de Ciências Agrônômicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2017.

OLIVA, E.V. **Composição Química e Produtividade de Procedências e Progenies de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. Hil.) Cultivadas em Latossolo Vermelho Distrófico no Município de Ivaí-PR**. Dissertação de mestrado, curso de pós-graduação em ciência do solo, do Departamento de solos e engenharia agrícola, setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, UFPR. 2007.

OLIVEIRA, S. V.; WAQUIL, P. D. **Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul, Brasil**. *Ciência Rural*, v.45, p.750-756, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140276>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

OLIVEIRA, V. L. de. et al. Avanços na aplicação de ectomicorrizas. In: FIGUEIREDO, M. do V. B. et al. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008, 568 p.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural da erva-mate. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE. 10., 1983, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE FLORESTAS, 1985. p. 17-36. (Documentos, 15).

PARK, J. H.; LAMB, D.; PANEERSELVAM, P.; CHOPPALA, G.; BOLAN, N.; CHUNG, J. W. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal (loid) contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2–3, p. 549–574, 2011.

PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 496-501, 1997.

PEYRONEL, B. et al. Terminology of micorrhiza. **Mycologia**, Oregon, v. 61, n. 1, p. 410-411, 1969.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 4, 1978, p. 138-143.

POZO, M. J.; AZCON-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, n.4, p.393-398, 2007.

PRÁ, M. A. D.; KONZEN, E. A.; MORES, P. A. O. E. Compostagem de dejetos líquidos de suínos. **Embrapa Milho e Sorgo**. 1a edição ed., p.25, Sete Lagoas, MG, 2005.

RIBEIRO FILHO, M. R.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; SIMÃO, J. B. P. Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e inorgânicos. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, v.25, p.495-507, 2001.

ROSS, S. M. The meaning of metal toxicity in soil-plant systems In: ROSS, S.M., ed. **Toxic metals in soil-plant systems**. New York, Wiley, 1994. p.27-61.

RUHLING, A.; SODERSTROM, B. Changes in fruitbody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. **Water Air Pollution**, Saint Paul, v. 49, p. 375-387, 1990.

SAIDELLES, F. L.F.; REINERT, D. J.; SALET, R. L. Crescimento inicial de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em três classes de solos, na região central do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 2, p. 17-25, 2005.

SANTOS, G. C. G.; RODELLA, A. A. Efeito da adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico de B, Zn, Cu, Mn e Pb no cultivo de *Brassica juncea*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 793-804, 2007.

SANTOS, H. P. et al. **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e vinho, 2004. 10 p. (Comunicado Técnico, n. 49).

SANTOS, J. F.; GRANGEIRO, J. I. T.; OLIEIRA, M. E. C. Produção da cultura da mamoneira em função da fertilização com cama de galinha. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 7, n. 1, p. 169-180, 2010.

SANTOS, K. A. **Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em embalagens plásticas**. 2004. 108 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2004.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 269, p. 357-360, 2000.

SEAB-PR. **Departamento de Economia Rural – Produtos Florestais – Erva-mate**. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/erva\\_mate\\_2014\\_2015.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/erva_mate_2014_2015.pdf). Acesso em 02 de abr. de 2019.

SHUMAN, L. M. Organic waste amendments effect on zinc fractions of two soils. **J. Environ. Qual.**, 28:1442-1447, 1999.

SILVA, M. A.; COSTA, M. D.; ROCHA, R. B.; BORGES, A. C. Formação de ectomicorrizas por monócários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 31, n. 5, p. 917-929, 2007.

SILVA, R. F. da.; ANTONIOLLI, Z. I.; ANDREAZZA, R. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. ex. Maiden em solo arenoso. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 33-42, 2003.

SILVA, R. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; LUPATINI, M.; TRINDADE, L. L.; SILVA, A. S. Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (spreng.) taub.) inoculadas com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. **Ciência Florestal**, v.20, p.147-156, 2010.

SILVA, R. F.; ROS, C. O.; DELLAI, A.; GROLLI, A. L.; SCHEID, D. L.; VIEL, P. 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**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 647-655, 2016.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3.ed., San Diego: Academic Press,

2008. 787p.

SOUSA, N. R.; FRANCO, A. R.; OLIVEIRA, R. S.; CASTRO, P. Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. **Journal of Environmental Management**, London, v. 95, p. 269-274, 2012.

SOUZA, E. L.; ANTONIOLLI, Z. I.; MACHADO, R. G.; ECKHARDT, D. P.; DAHMER, S. F. B.; SCHIRMER, G. K. Efeito da inoculação com isolados de fungos ectomicorrízicos sobre o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, p. 251-261, 2012.

STANKOVIC, S.; KALABA, P.; STANKOVIC, A. R. Biota as toxic metal indicators. **Environmental Chemistry Letters**, 12:63-84, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal**. 6ed. Porto Alegre: Artmed; 2017, 888p.

TARGHETTA, B. L.; OLIVEIRA, V. L.; ROSSI, M. J. Tolerância de fungos ectomicorrízicos e plantas associadas a níveis tóxicos de metais. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.5, p.825-833, 2013.

THOUNAOJAM, T.C.; PANDA, P.; MAZUMDAR, P.; KUMAR, D.; SHARMA, G. D.; SAHOO, L.; SANJIB, P. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**.53:33-9, 2012.

TIECHER, T. L.; CERETTA, A. A.; COMIN, J. J.; GIROTTO, E.; MIOTTO, A.; MORAES, M. P.; BENEDET, L.; FERREIRA, P. A. A.; LORENZI, C. R.; COUTO, R. R.; BRUNETTO, G. Forms and accumulation of copper and zinc in a sandy typic hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 3, p. 812–824, 2013.

TOSELLI, M., BALDI, E., MARCOLINI, G., MALAGUTI, D., QUARTIERI, M., SORRENTI, G., MARANGONI, B. Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. **Aust. J. Grape Wine Res.** 15, 85e92, 2009.

TURNAU, K. The influence of cadmium dust on fungi in a Pino-Quercetum forest. **Ekologia Polska**, v.39, n.1, p.39-57, 1991.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da Folha de Ilex paraguariensis St. Hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1995. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VALDUGA, E.; FREITAS, E. J. S.; REISSMANN, C.; NAKASHIMA, T. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. **B. ceppa**, v. 15, n. 1, p.25-36, 1997.

VALDUGA, E.; JAVORNIK, G.; SORDI, M.; REZENDE, D. de F.; Nota Prévia – Avaliação das Características de Qualidade da Erva-Mate (Chimarrão) Acondicionada em Diferentes Embalagens; **Braz. J. Food Technol.**, v.8, n.2, p. 99-105, abr./jun. 2005.

WELTER, P. D. **Fungos micorrízicos arbusculares e composto de água residuária da suinocultura no desenvolvimento de morangueiro de dia neutro**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Agricultura e Ambiente) – Departamento de Ciências

Agronômicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2018.

WILLIAMS, M. E. Plant Nutrition 3: Micronutrients and metals. **The Plant Cell**. 27(5):1-20, 2015.

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, p. 1090-1109, 2013.

ZHANG, L., PAN, Y., LV, W., XIONG, Z. T. Physiological responses of biomass allocation, root architecture, and invertase activity to copper stress in Young seedlings from two populations of *Kummerowia stipulacea* (maxim.) Makino. **Ecotox. Environ. Safe**. 104, 278e284, 2014.