

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

Leonardo Antonio Thiesen

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE  
SOLO SUBMETIDAS AO EXCESSO DE MANGANÊS E COBRE E SUA  
INTERAÇÃO COM Videira**

Santa Maria, RS  
2022

Leonardo Antonio Thiesen

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO  
SUBMETIDAS AO EXCESSO DE MANGANÊS E COBRE E SUA INTERAÇÃO  
COM VIDEIRA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS  
2022

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

Thiesen, Leonardo Antonio

Respostas fisiológicas de gramíneas de cobertura de solo submetidas ao excesso de manganês e cobre e sua interação com videira / Leonardo Antonio Thiesen.- 2022.  
167 p.; 30 cm

Orientador: Fernando Teixeira Nicoloso  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2022

1. Contaminação 2. Estresse 3. Fisiologia 4. Metais pesados 5. Toxidez I. Nicoloso, Fernando Teixeira 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.

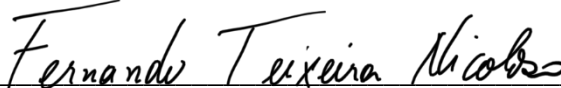
Declaro, LEONARDO ANTONIO THIESEN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda,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

**Leonardo Antonio Thiesen**

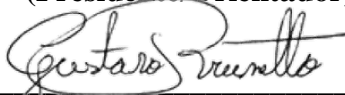
**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO  
SUBMETIDAS AO EXCESSO DE MANGANÊS E COBRE E SUA INTERAÇÃO  
COM Videira**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Agronomia**.

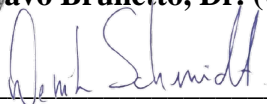
**Aprovado em 22 de março de 2022:**



**Fernando Teixeira Nicoloso, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**



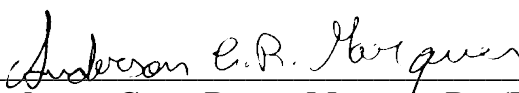
**Gustavo Brunetto, Dr. (UFSM)**



**Denise Schmidt, Dra. (UFSM)**



**Lessandro De Conti, Dr. (IFFar)**



**Anderson Cesar Ramos Marques, Dr. (URI)**

Santa Maria, RS

2022



## **DEDICATÓRIA**

Dedico a minha família, especialmente aos meus pais Clóvis e Lorette Thiesen e ao meu irmão Luis Otávio Thiesen, minha namorada Daiana Fernanda Hilgemann, colegas e amigos, que sempre incentivaram, apoiaram e acreditaram em meus ideais.

## AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

À Deus, pela vida e pelas oportunidades que tem posto em meu caminho e pela onipresença durante todos esses anos vividos.

Aos meus pais Clóvis Antonio Thiesen e Lorette Thiesen, assim como meu irmão Luis Otávio Thiesen, pelo incentivo, pelo apoio às minhas decisões e pela confiança depositada para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha namorada Daiana Fernanda Hilgemann por todo apoio, paciência, companheirismo e ajuda prestada em todos os experimentos durante esse período.

Aos demais familiares, pelo apoio, incentivo e acolhimento prestado em Santa Maria.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) pela oportunidade de doutorado e pelo acesso a Pós-graduação pública, gratuita e de qualidade. Em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante esse período.

Aos professores Drs. Fernando Teixeira Nicoloso e Gustavo Brunetto pela confiança, apoio, suporte e orientações a mim dispensadas durante todo esse período. Aos professores Dra. Luciane Tabaldi e Dr. João Marcelo pela colaboração.

Aos amigos e colegas de laboratório e de trabalho Raissa Schwalbert, Thalia Birck, Edicarla Trentin, Douglas Scheid, Gillian Fernandes, Gabriele Milanesi, Liliane Machado, Camila Tarouco, Keici Canabarro, Daiane Balconi, Allan Kokkonen, Amanda Krug, Darines Britke, Marcos Aguilar, Filipe Nunes, João Jung, Francisco Boelter, Leonardo Couto e demais integrantes pela amizade, companheirismo, conhecimento e pelo auxílio na condução deste trabalho.

Aos amigos e colegas de apartamento Douglas Scheid, Jardel Scheid e Guilherme Araújo pelo companheirismo e parceria.

Enfim, a todos que fazem parte da minha vida, que torceram por mim e deram sua contribuição nesta jornada, meu MUITO OBRIGADO!

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

*(Mário Sérgio Cortella)*

## RESUMO

### RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO SUBMETIDAS AO EXCESSO DE MANGANÊS E COBRE E SUA INTERAÇÃO COM VIDEIRA

AUTOR: Leonardo Antonio Thiesen  
ORIENTADOR: Fernando Teixeira Nicoloso

O manganês (Mn) e cobre (Cu) são micronutrientes que vem apresentando aumento relevante de suas concentrações no solo em áreas de vinhedos, onde tem-se aplicação constante de fungicidas contendo esses elementos. O estudo objetivou avaliar respostas fisiológicas e bioquímicas de gramíneas de cobertura de solo sob condições de excesso de Mn e sob combinação com excesso de Cu, bem como seu potencial de atenuar a toxidez desses metais em plantas de videiras. Para isso, foram conduzidos três experimentos em casa de vegetação. O experimento 1 foi conduzido em solução nutritiva com excesso de Mn (2 [controle], 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) em diferentes espécies de gramíneas de cobertura de solo (*Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*). O experimento 2 foi conduzido em solução nutritiva com as mesmas espécies e com interação de excesso de Cu e Mn. Para isso, foram testadas combinações contendo concentrações baixas e altas de Mn (300 e 900  $\mu\text{M}$ ), e Cu (0,5 e 40  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. O experimento 3 foi conduzido em solo com excesso de metais pesados e em três sistemas de cultivo de videiras (videira em monocultivo, videira em consórcio com *Paspalum notatum* e videira em consórcio com *Paspalum plicatulum*). Nos experimentos foram avaliados: produção de biomassa e taxas de crescimento, distribuição subcelular de Mn, fluorescência de clorofila *a*, trocas gasosas da folha com o ambiente, pigmentos fotossintéticos, atividade de enzimas antioxidantes, biometria do sistema radicular, densidade estomática e concentrações de nutrientes nos tecidos das plantas. As gramíneas apresentaram potencial de tolerância ao Mn, com elevadas concentrações nos tecidos, principalmente em parede celular e vacúolos. Contudo, *Lolium multiflorum* apresentou sintomas de toxicidade ao excesso de Mn, caracterizados pela presença de manchas necróticas marrons em folhas velhas, bem como algumas variáveis fisiológicas foram afetadas. O excesso de Cu é potencialmente mais tóxico que o Mn, afetando diversas respostas fisiológicas nas gramíneas, bem como promove a inibição do crescimento radicular e clorose foliar. No cultivo em consórcio no solo contaminado com metais pesados, a espécie de gramínea *Paspalum notatum* se mostrou mais sensível ao excesso dos elementos, a partir do aparecimento de clorose foliar. Entretanto, o consórcio de videiras com *Paspalum notatum* favoreceu as respostas de fotossíntese das videiras e reduziu a concentração dos metais nos tecidos. Portanto, a espécie de *Paspalum notatum* pode ser vista com uma planta indicadora de solos contaminados e recomenda-se a manutenção de gramíneas nativas nas entrelinhas dos vinhedos, em função do potencial de fitoestabilização e conservação das espécies nativas do bioma Pampa, no sul do Brasil.

**Palavras-chave:** Contaminação. Estresse. Fisiologia. Metais pesados. Toxidez.

## ABSTRACT

### PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF GROUND COVER GRASSES SUBMITTED TO EXCESS MANGANESE AND COPPER AND THEIR INTERACTION WITH GRAPEVINE

AUTHOR: Leonardo Antonio Thiesen

ADVISOR: Fernando Teixeira Nicoloso

Manganese (Mn) and copper (Cu) are micronutrients that have been showing a relevant increase in their concentration in the soil in vineyard areas, where there is constant application of fungicides containing these elements. The study objective to evaluate physiological and biochemical responses of ground cover grasses under conditions of excess Mn and under combination with excess Cu, as well as their potential to attenuate the toxicity of these metals in vine plants. For this, three experiments were carried out in a greenhouse. Experiment 1 was carried out in a nutrient solution with excess Mn (2 [control], 300, 600 and 900  $\mu\text{M}$ ) in different species of ground cover grasses (*Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Avena strigosa* and *Lolium multiflorum*). Experiment 2 was carried out in nutrient solution with the same species and with interaction of excess Cu and Mn. For this, combinations containing low and high concentrations of Mn (300 and 900  $\mu\text{M}$ ), and Cu (0.5 and 40  $\mu\text{M}$ ), respectively, were tested. Experiment 3 was carried out in soil with excess of heavy metals and in three vine cultivation systems (vine in monoculture, vine in consortium with *Paspalum notatum* and vine in consortium with *Paspalum plicatulum*). The following experiments were evaluated: biomass production and growth rates, subcellular distribution of Mn, chlorophyll *a* fluorescence, leaf gas exchange with the environment, photosynthetic pigments, antioxidant enzyme activity, root system biometry, stomatal density and nutrient concentrations in plant tissues. Grasses showed Mn tolerance potential, with high concentrations in tissues, mainly in cell walls and vacuoles. However, *Lolium multiflorum* showed symptoms of toxicity to excess Mn, characterized by the presence of brown necrotic spots on old leaves, as well as some physiological variables were affected. Excess Cu is potentially more toxic than Mn, affecting several physiological responses in grasses, as well as inhibiting root growth and leaf chlorosis. In intercropping in soil contaminated with heavy metals, the grass species *Paspalum notatum* was more sensitive to excess elements, from the appearance of leaf chlorosis. However, the intercropping of vines with *Paspalum notatum* favored the photosynthesis responses of the vines and reduced the concentration of metals in the tissues. Therefore, the species of *Paspalum notatum* can be seen as an indicator plant of contaminated soils and the maintenance of native grasses between the vineyards is recommended, due to the phytostabilization and conservation potential of the native species of the Pampa biome, in southern Brazil.

**Keywords:** Contamination. Stress. Physiology. Heavy metals. Toxicity

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

- FIGURA 1 - Variação do pH da solução nutritiva em função das diferentes concentrações de Mn em gramíneas de cobertura de solo *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatulum* (D), durante o período de condução do experimento..... 42
- FIGURA 2 - Sintomas de toxicidade de Mn em folhas velhas de *Lolium multiflorum*.....43
- FIGURA 3 - Gramíneas de cobertura de solo *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatulum* (D) cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) ..... 44
- FIGURA 4 - Massa seca de raízes, parte aérea e total ( $\text{g planta}^{-1}$ ) de gramíneas de cobertura de solo significativos para o fator espécie (A, C) e concentrações de Mn (B, D). ..46
- FIGURA 5 - Taxa de crescimento absoluto –  $\text{g dia}^{-1}$  (A) e relativo –  $\text{g g}^{-1} \text{dia}^{-1}$  (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) ..... 47
- FIGURA 6 - Concentrações de Mn em raízes e parte aérea (A) e índice de translocação de Mn para parte aérea (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ )..... 48
- FIGURA 7 - Concentrações de Mn em diferentes compartimentos subcelulares (A) e proporção de Mn armazenado em cada fração celular (B) de raízes e folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*) cultivadas em solução nutritiva com 2 e 900  $\mu\text{M}$ ..... 51
- FIGURA 8 - Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), condutância estomática -  $G_s$  (B), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco –  $A/C_i$  (C), taxa de transpiração -  $E$  (D), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (E, F) e eficiência do uso da água –  $EUA$  (G) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) ..... 53
- FIGURA 9 - Concentrações de peróxido de hidrogênio -  $\text{H}_2\text{O}_2$  (A) e malondialdeído - TBRAS (B) e atividade enzimática da Superóxido Dismutase - SOD (C) e Guaiacol Peroxidase - POD (D) em raízes e folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ )..... 55
- FIGURA 10 - Concentração de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D), de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) ..... 56

FIGURA 11 - Densidade estomática da epiderme abaxial (A), adaxial (B) e total (C) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) ..... 57

FIGURA 12 - Comprimento total (A), área superficial total (B), volume radicular (C), comprimento específico radicular (D) e diâmetro médio (E, F) de raízes de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) ..... 58

## ARTIGO 2

FIGURA 1 - Variação do pH da solução nutritiva em função das diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) em gramíneas *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatum* (D), durante o período de condução do experimento ..... 84

FIGURA 2 – Concentrações de Cu nas raízes e parte aérea (A) e índice de translocação de Cu para parte aérea (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) .....86

FIGURA 3 - Concentrações de Mn nas raízes e parte aérea (A) e índice de translocação de Mn para parte aérea (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) ..... 87

FIGURA 4 - Massa seca de raízes e de parte aérea (A), massa seca total (B) e números de perfilhos (C) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) ..... 90

FIGURA 5 - Taxa de crescimento absoluto (A) e relativo (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ )..... 91

FIGURA 6 - Gramíneas de cobertura de solo *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatum* (D) cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn.  $L^{Mn}L^{Cu}$ : controle;  $L^{Mn}H^{Cu}$ : Excesso de Cu;  $H^{Mn}L^{Cu}$ : Excesso de Mn;  $H^{Mn}H^{Cu}$ : Excesso de Cu e Mn..... 92

FIGURA 7 - Taxa fotossintética líquida - *A* (A), condutância estomática - *Gs* (B), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  - *Ci* (C), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco - *A/Ci* (D), taxa de transpiração - *E* (E) e eficiência do uso da água - *EUA* (F) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) aos sete dias após o início dos tratamentos.....93

- FIGURA 8 - Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), condutância estomática -  $G_s$  (B), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (C), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (D), taxa de transpiração -  $E$  (E) e eficiência do uso da água -  $EUA$  (F) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $\text{L}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{L}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$  e  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ ) aos 17 dias após o início dos tratamentos.....95
- FIGURA 9 - Concentração de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D), de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $\text{L}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{L}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$  e  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ )..... 96
- FIGURA 10 - Concentração de peróxido de hidrogênio -  $\text{H}_2\text{O}_2$  (A) e de malondialdeído - TBRAS (B) e atividade enzimática da Superóxido Dismutase - SOD (C) e Guaiacol Peroxidase - POD (D) em raízes e folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $\text{L}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{L}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$  e  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ ) ..... 97
- FIGURA 11 - Densidade estomática da epiderme abaxial (A), adaxial (B) e total (C) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $\text{L}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{L}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$  e  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ )..... 98
- FIGURA 12 - Comprimento total (A), área superficial total (B), volume radicular (C) e diâmetro médio de raízes (D) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $\text{L}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{L}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ ,  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{L}^{\text{Cu}}$  e  $\text{H}^{\text{Mn}}\text{H}^{\text{Cu}}$ )..... 99

### ARTIGO 3

- FIGURA 1 - Número de folhas (A), altura de plantas (B) e massa seca de raízes e folhas de videiras (C) cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metais e +Metais..... 125
- FIGURA 2 - Fluorescência inicial da clorofila *a* -  $F_o$  (A), Fluorescência máxima -  $F_m$  (B) e rendimento quântico potencial do fotossistema II (C) de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metais e +Metais.....129
- FIGURA 3 - Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (B), condutância estomática -  $G_s$  (C), taxa de transpiração -  $E$  (D), eficiência do uso da água -  $EUA$  (E) e concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (F) de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metais e +Metais..... 130



- FIGURA 4 - Comprimento total (A), área superficial total (B), volume radicular (C) e diâmetro médio (D) de raízes de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metais e +Metais ..... 131
- FIGURA 5 - Massa seca de raízes e parte aérea (A) e massa seca total (B) de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metais e +Metais..... 132
- FIGURA 6 - Fluorescência inicial da clorofila *a* -  $F_o$  (A), Fluorescência máxima -  $F_m$  (B), rendimento quântico potencial do fotossistema II -  $F_v/F_m$  (C) e taxa de transporte relativa de elétrons máxima -  $ETR_{max}$  (D) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metais e +Metais ..... 134
- FIGURA 7 - Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), concentração intercelular de  $CO_2$  -  $C_i$  (B), condutância estomática -  $G_s$  (C), taxa de transpiração -  $E$  (D), eficiência do uso da água -  $EUA$  (E) e eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (F) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metais e +Metais ..... 136
- FIGURA 8 - Comprimento total de raízes (A), área superficial total de raízes (B), volume radicular (C) e diâmetro médio radicular (D) de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metais e +Metais .....137

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

TABELA 1 - Concentrações de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Zn na parte aérea e raízes de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu$ M).....49

### ARTIGO 2

TABELA 1 - Concentrações de P, K, Ca, Mg, Fe e Zn nas raízes e parte aérea de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ).....89

### ARTIGO 3

TABELA 1 - Características químicas dos solos coletados na camada de 0-10 cm com dois níveis de metais pesados (-Metais e +Metais).....119

TABELA 2 - Concentrações de nutrientes em raízes, caule e folhas de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), cultivadas em solos com -Metais e +Metais.....126

TABELA 3 - Concentrações de nutrientes em raízes e parte aérea de gramíneas nativas (*P. notatum* e *P. plicatulum*), consorciadas com videiras em resposta a solos com -Metais e +Metais.....133

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Taxa fotossintética líquida	IRGA	Infrared Gas Analyser
<i>A/Ci</i>	Eficiência de carboxilação instantânea pela rubisco	IT	Índice de translocação
AB	Abaxial	K	Potássio
AD	Adaxial	kg	Quilograma
Al	Alumínio	KI	Iodeto de potássio
APX	Ascorbato Peroxidase	Km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
B	Boro	L	Litro
Ca	Cálcio	L <sup>Cu</sup>	Baixo cobre
CAT	Catalase	L <sup>Mn</sup>	Baixo manganês
Cd	Cádmio	log	Logaritmo
<i>Ci</i>	Concentração intercelular de CO <sub>2</sub>	m	Metros
Cl	Cloro	m:v	Massa por volume
cm	Centímetro	m <sup>2</sup>	Metro quadrado
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado	MDA	Malondialdeído
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico	MF	Massa fresca
cmol <sub>c</sub>	Centimol de carga	mg	Miligrama
Co	Cobalto	Mg	Magnésio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	min	Minuto
Cu	Cobre	mL	Mililitro
-Metais	Baixo teor de metais	mm	Milímetro
+Metais	Alto teor de metais	mmol L <sup>-1</sup>	Milimol por litro
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre	Mn	Manganês
cv.	Cultivar	Mo	Molibdênio
dm <sup>3</sup>	Decímetro cúbico	mol	Mol
DMSO	Dimetilsulfóxido	mol L <sup>-1</sup>	Mol por litro
DTT	Ditiotreitol	MSC	Massa seca de caule
<i>E</i>	Taxa de transpiração	MSF	Massa seca de folha
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético	MSPA	Massa seca de parte aérea
ERO	Espécie reativa de oxigênio	MSR	Massa seca de raiz
ETR <sub>m</sub>	Taxa de transporte de elétrons	MST	Massa seca total
<i>EUA</i>	Eficiência do uso da água	MST <sub>f</sub>	Massa seca total final
F	Folha	MST <sub>i</sub>	Massa seca total inicial
Fe	Ferro	N	Nitrogênio
Fm	Fluorescência máxima	NaOH	Hidróxido de sódio
Fo	Fluorescência inicial	NaSO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
Fv/Fm	Rendimento quântico do PSII	NBT	ρ-nitro blue tetrazolium
g	Gramas ou unidade de rotação	ND	Número de dias
<i>G<sub>s</sub></i>	Condutância estomática	Ni	Níquel
H <sub>2</sub> O	Água	nm	Nanômetro
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio	nM	Nanomolar
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico	°	Grau
HClO <sub>4</sub>	Ácido perclórico	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
H <sup>Cu</sup>	Alto cobre	°C	Graus Celsius
H <sup>Mn</sup>	Alto manganês	P	Fósforo
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico	p	Probabilidade
		P.A.	Puro para análise
		p.c.	Produto comercial

PA	Parte aérea
pH	Potencial de hidrogênio
POD	Guaiacol peroxidase
PSII	Fotossistema II
R	Raiz
rpm	Rotação por minuto
RS	Rio Grande do Sul
S	Enxofre
s	Segundo
SO4	Porta enxerto de videira
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCA <sub>b</sub>	Taxa de crescimento absoluto
TCR	Taxa de crescimento relativo
TFK	Tampão fosfato-citrato
Tris-HCl	Tris hydrochloride
U	Unidade
Zn	Zinco
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
%	Porcentagem
'	Minutos
”	Segundos
±	Mais ou menos

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO GERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1 HIPÓTESES .....	23
1.2 OBJETIVO GERAL .....	24
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
2.1 GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO .....	25
2.2 ACÚMULO DE MANGANÊS E COBRE NO SOLO E SEU EFEITO SOBRE A FISIOLOGIA DAS PLANTAS .....	26
2.3 ABSORÇÃO DE COBRE E MANGANÊS E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À METAIS PESADOS .....	29
<b>3 ARTIGO 1 – RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO SUBMETIDAS AO EXCESSO DE MANGANÊS</b> .....	<b>32</b>
3.1 RESUMO .....	33
3.2 ABSTRACT .....	33
3.3 INTRODUÇÃO .....	34
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.4.1 Descrição do experimento .....	35
3.4.2 Produção de biomassa e taxa de crescimento .....	36
3.4.3 Concentração de nutrientes e índice de translocação .....	37
3.4.4 Trocas gasosas da folha com o ambiente .....	37
3.4.5 Distribuição subcelular do Mn no tecido .....	38
3.4.6 Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos .....	39
3.4.7 Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	39
3.4.8 Peroxidação lipídica (TBARS) .....	39
3.4.9 Atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) .....	40
3.4.10 Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD) .....	40
3.4.11 Biometria do sistema radicular .....	41
3.4.12 Densidade estomática das folhas .....	41
3.4.13 Análise estatística .....	41
3.5 RESULTADOS .....	41
3.5.1 pH da solução nutritiva .....	41
3.5.2 Sintomatologia de toxicidade de Mn .....	43
3.5.3 Análise de variância .....	45
3.5.4 Produção de biomassa e taxas de crescimento .....	46
3.5.5 Concentração de nutrientes nas raízes e parte aérea .....	47
3.5.6 Distribuição subcelular de Mn .....	50
3.5.7 Trocas gasosas .....	52
3.5.8 Análises bioquímicas .....	54
3.5.9 Pigmentos fotossintéticos .....	56
3.5.10 Densidade estomática .....	57
3.5.11 Biometria do sistema radicular .....	58
3.6 DISCUSSÃO .....	59
3.7 CONCLUSÃO .....	67
3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
<b>4 ARTIGO 2 – INTERAÇÃO DO EXCESSO DE COBRE E MANGANÊS EM GRAMÍNEAS EXÓTICAS E NATIVAS</b> .....	<b>74</b>

4.1 RESUMO .....	75
4.2 ABSTRACT .....	75
4.3 INTRODUÇÃO .....	76
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	78
4.4.1 Descrição do experimento .....	78
4.4.2 Produção de biomassa e taxas de crescimento .....	79
4.4.3 Concentração de nutrientes e índice de translocação .....	79
4.4.4 Trocas gasosas da folha com o ambiente .....	80
4.4.5 Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos.....	80
4.4.6 Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	81
4.4.7 Peroxidação lipídica (TBARS).....	81
4.4.8 Atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) .....	81
4.4.9 Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD) .....	82
4.4.10 Biometria do sistema radicular.....	82
4.4.11 Densidade estomática das folhas.....	82
4.4.12 Análise estatística .....	83
4.5 RESULTADOS.....	83
4.5.1 pH da solução nutritiva .....	83
4.5.2 Resumo da análise de variância .....	84
4.5.3 Concentração de nutrientes nas raízes e parte aérea.....	85
4.5.4 Produção de biomassa e taxas de crescimento .....	90
4.5.5 Trocas gasosas da folha com o ambiente .....	93
4.5.6 Pigmentos fotossintéticos .....	95
4.5.7 Análises bioquímicas.....	96
4.5.8 Densidade estomática.....	98
4.5.9 Biometria do sistema radicular.....	99
4.6 DISCUSSÃO .....	100
4.7 CONCLUSÃO .....	108
4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
<b>5 ARTIGO 3 – FOTOSSÍNTESE, ESTADO NUTRICIONAL E CRESCIMENTO DE VIDEIRAS E GRAMÍNEAS NATIVAS DO BIOMA PAMPA CULTIVADAS EM CONSÓRCIO EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE, MANGANÊS E ZINCO</b>	<b>115</b>
5.1 RESUMO .....	116
5.2 ABSTRACT .....	116
5.3 INTRODUÇÃO .....	117
5.4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	118
5.4.1 Solo .....	118
5.4.2 Descrição do experimento .....	119
5.4.3 Tratos culturais realizados durante o período experimental.....	120
5.4.4 Produção de biomassa .....	121
5.4.5 Concentrações de nutrientes .....	121
5.4.6 Fluorescência da clorofila a.....	121
5.4.7 Trocas gasosas da folha com o ambiente .....	122
5.4.8 Biometria do sistema radicular.....	122
5.4.9 Análise estatística .....	122
5.5 RESULTADOS.....	123
5.5.1 Resumo da análise de variância.....	123
5.5.2 Respostas fisiológicas de videiras cultivadas em consórcio com gramíneas nativas em solo com excesso de cobre, manganês e zinco .....	124

<b>5.5.3 Respostas fisiológicas de gramíneas nativas cultivadas no consórcio com videiras em solo com excesso de cobre, manganês e zinco.....</b>	<b>132</b>
<b>5.6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>138</b>
<b>5.6.1 Respostas fisiológicas de videiras cultivadas em consórcio com gramíneas nativas em solo com excesso de cobre, manganês e zinco.....</b>	<b>138</b>
<b>5.6.2 Respostas fisiológicas de gramíneas nativas cultivadas em consórcio com videiras em solo com excesso de cobre, manganês e zinco.....</b>	<b>142</b>
<b>5.7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>145</b>
<b>5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>145</b>
<b>6 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>150</b>
<b>7 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>153</b>
<b>8 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS .....</b>	<b>154</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>162</b>

## APRESENTAÇÃO GERAL

A viticultura é uma atividade de grande importância econômica para o Brasil, sendo que a maior produção de uvas no país concentra-se no Rio Grande do Sul (RS). Nesse estado, a principal região produtora é a Serra Gaúcha. No entanto, nos últimos anos essa atividade também se expandiu para outras regiões produtoras, como na Campanha Gaúcha, em que o cultivo ocorreu em áreas ocupadas com campo natural do bioma Pampa. Com isso, diversas gramíneas nativas desses campos naturais são mantidas e manejadas como plantas de cobertura de solo nas entrelinhas das videiras e de pomares em geral, favorecendo o cultivo de videiras e proporcionando inúmeros benefícios ao solo e ao ambiente.

Nessa região, os elevados índices pluviométricos favorecem a incidência de doenças fúngicas em videiras, como míldio (*Plasmopara viticola*), tornando-se necessário a aplicação de fungicidas foliares. Entretanto, em função da alta eficiência de controle e baixo custo na prevenção de doenças, muitos produtores realizam aplicações de fungicidas “protetores”, como sulfato de cobre (Cu), mancozebe, entre outros, que possuem em sua composição diversos metais pesados como Cu, manganês (Mn) e zinco (Zn). Diante de aplicações sucessivas desses fungicidas durante o ciclo produtivo das videiras, uma grande quantidade desses elementos é adicionada ao solo podendo, com o passar dos anos, alcançar concentrações elevadas e se tornar tóxicos para às plantas.

A contaminação do solo com metais pesados em áreas de vinhedos do bioma Pampa foram temas de diversos estudos realizados por pesquisadores pertencentes ao Grupo de Pesquisas em Fisiologia de Plantas de Interesse Agrobiológico e/ou Grupo de Estudos de Predição de Adubação e Potencial de Contaminação de Elementos em Solos (GEPACES), ambos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Esses estudos abordaram o diagnóstico dos incrementos dos metais pesados no solo, assim como as respostas e efeitos desses elementos sobre videiras e espécies de gramíneas de cobertura de solo que habitam essas áreas de vinhedos.

Diante disso, diversas Dissertações e Teses já foram realizadas com enfoque em videiras e gramíneas de cobertura de solo de áreas do bioma Pampa, tais como: Tese de Doutorado de Eduardo Giroto, onde estudou o efeito do Cu sobre plantas de aveia preta e a sua biodisponibilidade em solos de vinhedos; Tese de Doutorado de Alcione Miotto, onde estudou o acúmulo e disponibilidade de Cu em solos de vinhedos e o efeito sobre fisiologia de videiras; Tese de Doutorado de Edicarla Trentin, que avaliou genótipos de porta-enxertos de videiras e amenizantes como estratégias para reduzir a fitotoxidez por Cu; Tese de Doutorado de Isley Cristiellem Bicalho da Silva, que estudou a variabilidade da comunidade vegetal e mecanismos



de tolerância de espécies de plantas de cobertura de solo presentes em vinhedos com altos teores de Cu; Dissertação de Mestrado e Tese de Doutorado de Tadeu Luís Tiecher, que estudou o efeito de combinações de elevados níveis de Cu e Zn em plantas de milho e, posteriormente, sobre o crescimento e fisiologia de plantas de videiras jovens e aveia preta; Tese de Doutorado de Lessandro de Conti, que estudou o efeito do excesso de Cu sobre o crescimento, estado nutricional e morfologia radicular de videiras jovens e gramíneas de cobertura de solo, assim como o potencial de utilização dessas gramíneas na fitorremediação de solos de vinhedos contaminados com Cu; Dissertação de Mestrado de Liliane Machado, que estudou aspectos fisiológicos de gramíneas nativas do bioma Pampa sob condições de excesso de alumínio (Al); e a Dissertação de Mestrado de Gabriela Milanesi, que estudou as respostas fisiológicas de gramíneas nativas do bioma Pampa sob excesso de Zn.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, elaborou-se o projeto da presente Tese, que objetivou avaliar as respostas fisiológicas de gramíneas de cobertura de solo de vinhedos sob condições de excesso de Mn e sua combinação com excesso de Cu. Além disso, objetivou-se avaliar os benefícios do consórcio de gramíneas de cobertura de solo com videiras jovens em condições de excesso desses metais. A relevância deste estudo está relacionada à compreensão dos relatos sobre os solos contaminados com metais pesados em diversas áreas do mundo, principalmente em atividades vitivinícolas, e pela preocupação com o aumento crescente da concentração de Mn nos solos de vinhedos do bioma Pampa e em tecidos foliares de plantas de videiras observados por alguns pesquisadores (acima mencionados) ao longo de suas pesquisas.

A ideia de avaliar o efeito combinado do excesso de Cu e Mn, surgiu como uma forma de estudar o comportamento das plantas diante do excesso desses dois metais concomitantemente, assim como identificar se existe interação entre eles no processo de absorção e acúmulo dos elementos na parte aérea das plantas, a partir de hipóteses levantadas pelos pesquisadores anteriormente mencionados. E, para determinar se essas gramíneas realmente favorecem as respostas fisiológicas de videiras, foi proposto estudar o consórcio de videiras com gramíneas nativas do bioma Pampa em solos com excesso de metais, incluindo Cu, Mn e Zn. Portanto, são escassos estudos envolvendo o excesso de Mn em gramíneas nativas, assim como sobre a combinação do excesso de Cu e Mn e o consórcio entre videiras e gramíneas. Os resultados desses estudos estão apresentados no decorrer desta Tese, demonstrando as respostas que as plantas podem vir a apresentar nos próximos anos, assim como a identificação de mecanismos de tolerância de gramíneas de cobertura de solo à toxidez de Mn e potencial de fitoestabilização que favorecem o cultivo de videiras, resultando em uma produção sustentável de uvas a partir da manutenção da vegetação nativa e característica do bioma Pampa.

## 1 INTRODUÇÃO

O manganês (Mn) é um elemento essencial às plantas, em função de participar em diversos processos metabólicos como cofator de inúmeras enzimas importantes em processos como a fotossíntese, respiração e outros (MARSCHNER, 2012; NOUET; MOTTE; HANIKENNE, 2011; SCHMIDT; JENSEN; HUSTED, 2016). Esse micronutriente também desempenha funções no processo de absorção iônica, balanço hormonal, metabolismo de nitrogênio e síntese de proteínas. Além disso, o Mn também está envolvido na biossíntese de lipídios, flavonóides e lignina, sendo assim essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (CHEN et al., 2014; LIDON; BARREIRO; RAMALHO, 2004). Portanto, a deficiência de Mn tem efeitos prejudiciais, principalmente, no aparato fotossintético, em função da redução do transporte de elétrons e estresse oxidativo causado por radicais livres (SCHMIDT; JENSEN; HUSTED, 2016).

Por outro lado, o Mn é um metal pesado e quando absorvido em excesso pelas plantas pode ser tóxico, limitando o seu crescimento. Isso ocorre principalmente em solos ácidos, onde o elemento apresenta maior disponibilidade. O estresse causado por Mn promove acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas plantas, resultando em dano oxidativo, clorose e necrose nas folhas (LE BOT; KIRKBY; BEUSICHEM, 1990; ZHAO et al., 2017). Em *Arabidopsis*, o excesso de Mn promoveu inibição da eficiência fotossintética (MILLALEO et al., 2012), enquanto em plântulas de arroz, o excesso de Mn promoveu estresse oxidativo e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (SRIVASTAVA E DUBEY, 2011). Acredita-se que o cloroplasto seja o alvo primário da toxidez por Mn, em função de romper a estrutura dos tilacoides e interferir na cadeia transportadora de elétrons (CHEN et al., 2014; LIDON; BARREIRO; RAMALHO, 2004).

Atualmente, algumas atividades agrícolas vêm provocando contaminação do solo, principalmente em relação ao acúmulo de metais pesados (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; DE CONTI et al., 2016; LEGUIZAMO; GÓMEZ; SARMIENTO, 2017; WAN et al., 2017). O excesso de Cu e Mn é recorrente, sendo que o Mn é um dos metais pesados que vêm apresentando aumento relevante da sua concentração no solo e nos tecidos das plantas nos últimos anos, em função de atividades antropogênicas como mineração, aplicação de dejetos de animais e, principalmente, em solos de vinhedos e pomares, onde tem-se aplicações constantes de fungicidas (KOMÁREK et al., 2010).

Os fungicidas utilizados para o controle de doenças em pomares, em geral, são à base de cobre (Cu) e Mn, o que causa o acúmulo destes metais no solo. Isso ocorre principalmente

em regiões com precipitações pluviométricas frequentes, em função da transferência destes elementos das folhas para o solo através da água da chuva, o que, conseqüentemente, provoca efeitos tóxicos para algumas espécies de plantas (BALDI et al., 2018; CAMBROLLÉ et al., 2015; KOMÁREK et al., 2010; MIOTTO et al., 2014). Além disso, o excesso de Cu promove estresse nas plantas, resultando em ativação de mecanismos de tolerância que envolvem exsudação radicular de diversos compostos orgânicos que podem aumentar a solubilidade de outros elementos na solução do solo, como o Mn, aumentando a probabilidade deste ser absorvido e armazenado na parte aérea das plantas (DE CONTI et al., 2016).

A competição e interação entre os elementos químicos com as partículas de solo podem modificar a disponibilidade dos nutrientes, assim interferindo nos processos de absorção, translocação e distribuição dos mesmos, resultando em alterações no estado nutricional na planta. De Conti et al. (2018) relataram que o excesso de Cu modificou o acúmulo de outros nutrientes nos tecidos de *Avena strigosa*. Associado a isso, o excesso de Cu pode aumentar a concentração de Mn nos tecidos das plantas (DE CONTI et al., 2019), da mesma forma que o excesso dos dois elementos podem modificar toda composição mineral da planta.

Em videira, o excesso de Cu nos solos afeta o estado nutricional das plantas, principalmente em relação aos níveis de fósforo (P), ferro (Fe) e Mn. Observou-se que folhas, raízes e caule de videiras apresentaram aumento da concentração de Mn com o aumento das doses de Cu no solo, atingindo concentrações próximas aos níveis críticos (DE CONTI et al., 2019). Diante disso, alguns trabalhos reportam que a utilização de gramíneas de cobertura de solo, nas entrelinhas dos vinhedos, promove o aumento do volume radicular das videiras e redução da concentração de Mn nos tecidos de videira quando comparados ao monocultivo (DE CONTI et al., 2019). Os mesmos autores ainda verificaram que em monocultivo a concentração de Mn aumentou significativamente em todos os órgãos da planta (folhas, caule e raízes), quando comparado com videira + *Paspalum plicatulum* e videira + *Axonopus affinis*, ou seja, a concentração de Mn nos tecidos da videira reduziu em consórcio com as gramíneas.

O Rio Grande do Sul (RS) possui a maior área cultivada de videiras no país, com destaque para a região da Serra Gaúcha e nos últimos anos para a Campanha Gaúcha, que apresenta solos arenosos e baixos teores de matéria orgânica (GIROTTO et al., 2016). Nessas áreas de vinhedos do bioma Pampa são observadas espontaneamente diversas espécies de gramíneas que são manejadas como plantas de cobertura de solo. Estima-se que existem cerca de 3.000 espécies de plantas no bioma Pampa, sendo que dessas existe uma diversidade com mais de 450 espécies de gramíneas (BRASIL, 2019). Dentre essas espécies de gramíneas,

*Axonopus affinis*, *Paspalum plicatulum* e *Paspalum notatum* são as espécies nativas mais representativas nesses ambientes (QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009).

As gramíneas nativas e exóticas de áreas de vinhedos no bioma Pampa crescem e se desenvolvem em solos ácidos e com a presença de diversos metais pesados, incluindo micronutrientes como Cu, Mn e Zinco (Zn) (BRUNETTO et al., 2014), o que lhes confere alta adaptação à estes ambientes e potencial de tolerar a presença de metais pesados. Dessa forma, sua utilização como plantas de cobertura de solo pode ser uma alternativa na fitoestabilização de alguns metais, reduzindo a sua disponibilidade (LEGUIZAMO; GÓMEZ; SARMIENTO, 2017). Porém, ainda não foi caracterizado se as espécies nativas como *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* e exóticas como *Avena strigosa* e *Lolium multiflorum* possuem capacidade de apresentar alta concentração Mn, bem como essas espécies respondem ao excesso de Mn isoladamente e em combinação com o excesso de Cu em níveis fisiológicos e bioquímicos.

Compreender mecanismos fisiológicos e bioquímicos das plantas presentes em ambientes com excesso de metais se torna fundamental, para melhorar as estratégias de manejo e de possível fitorremediação ou fitoestabilização (TANG; TAO; LI, 2020). Assim, avaliar as respostas fisiológicas e/ou mecanismos de tolerância adotados por essas espécies de plantas diante de condições de excesso de metais pesados fornece informações valiosas de como determinadas culturas se adaptam nesses ambientes. A partir do conhecimento da fisiologia e sintomas de toxicidade dessas plantas, pode ser possível estabelecer estratégias de manejo a ser introduzidas em outras culturas de interesse agrônomo, bem como usar esses conhecimentos em programas de melhoramento genético para se obter espécies mais tolerantes ao excesso de metais. Além disso, estudar a combinação de Mn e Cu e o consórcio das espécies de plantas de cobertura com uma cultura de interesse (videira, por exemplo) permite identificar a relação e a interação entre as mesmas no ecossistema.

## 1.1 HIPÓTESES

- a) As gramíneas exóticas (*Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*) e nativas do bioma Pampa (*Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*), possuem mecanismos de tolerância que lhes permite apresentar elevadas concentrações de Mn em seus tecidos, que compreendem a manutenção do Mn em organelas menos ativas.

- b) O excesso de Mn afeta as respostas bioquímicas das gramíneas exóticas e nativas, a partir do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e guaiacol peroxidase.
- c) Elevadas concentrações de Cu e Mn diminuem a biomassa, biometria de raízes e fotossíntese das gramíneas e aumentam a atividade de enzimas antioxidantes a fim de evitar estresse oxidativo.
- d) A interação do excesso de Cu e Mn intensifica o efeito de toxicidade desses metais nas respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas, sendo que o excesso de Cu na solução nutritiva aumenta a concentração de Mn nos tecidos das plantas.
- e) O cultivo de videiras jovens em consórcio com gramíneas nativas do bioma Pampa diminui o efeito da toxidez causada pelo excesso de metais pesados no solo, incluindo Cu, Mn e Zn, a partir da melhoria das respostas fisiológicas das videiras.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar respostas fisiológicas e bioquímicas de gramíneas de cobertura de solo sob condições de excesso de manganês e sua combinação com excesso de cobre, bem como seu potencial de atenuar a toxidez desses metais em plantas de videiras.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o crescimento de gramíneas de cobertura de solo de vinhedos sob concentrações crescentes de Mn.
- b) Identificar os mecanismos de tolerância utilizados pelas espécies de gramíneas quando cultivadas em altas concentrações de Mn ou sob combinação com excesso de Cu.
- c) Determinar os efeitos do excesso de metais pesados sobre produção de biomassa, biometria de raízes, fotossíntese e concentração de nutrientes em gramíneas de cobertura de solo e videiras.
- d) Avaliar se o consórcio de videiras jovens com gramíneas nativas do bioma Pampa apresenta potencial de reduzir a toxidez de metais pesados, bem como a concentração desses elementos nos tecidos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO

Os campos nativos da América do Sul apresentam uma grande diversidade de espécies vegetais, existindo mais de 2.200 espécies, sendo que muitas delas apresentam alto valor forrageiro e de cobertura de solo (BOLDRINI et al., 2010). O bioma Pampa no Brasil, que se restringe ao estado do Rio Grande do Sul, possui uma área de aproximadamente 176.496 km<sup>2</sup>, sendo que 41,32% dessa área é ocupada por gramíneas. Esse bioma ocupa em torno de 63% do território do RS e 2,07% do território nacional (IBGE, 2004). Dessa forma, a diversidade das características das espécies está relacionada com as condições climáticas e de solo desses locais.

Existe uma grande variabilidade de espécies vegetais encontradas nessas áreas, sendo que as gramíneas forrageiras e/ou de cobertura são as principais responsáveis pela produção de biomassa, podendo ser encontradas mais de 450 espécies (BOLDRINI et al., 1997). As gramíneas podem ser classificadas de acordo com suas características funcionais e morfológicas, em (i) gramíneas de conservação de recursos, e (ii) gramíneas de captura de recursos (QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009; MARQUES et al., 2020). As espécies de captura de recursos, como *Axonopus affinis*, *Paspalum plicatulum*, *Paspalum notatum* e *Paspalum urvillei*, apresentam maior área foliar específica e menor teor de massa seca. Esse grupo é composto por espécies prostradas, estoloníferas e rizomatosas. As espécies de conservação de recursos, como *Andropogon lateralis*, *Saccharum angustifolium* e *Aristida laevis*, são gramíneas que formam touceiras e ao contrário das espécies de captura de recursos, apresentam maior teor de massa seca foliar e menor área foliar específica (MARQUES et al., 2017; MARQUES et al., 2020). Além disso, gramíneas com estratégias de crescimento de captura de recursos tendem a apresentar maior taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e maior eficiência de carboxilação instantânea de CO<sub>2</sub> (MARQUES et al., 2020).

As diferentes espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa habitam naturalmente áreas da região da Campanha Gaúcha e comumente são manejadas como plantas de cobertura de solo em áreas de vinhedos ou como plantas forrageiras em áreas de pastagens (DE CONTI et al., 2019; MARQUES et al., 2020). No entanto, essas gramíneas apresentam taxa de crescimento lento nas estações de outono-inverno, pois são espécies estivais (QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009). Assim sendo, para aumentar a quantidade de material vegetal e cobertura do solo, no outono-inverno são introduzidas espécies anuais (exóticas) como aveia preta (*Avena strigosa*) e azevém (*Lolium multiflorum*), que contribuem para conservação do

solo, ciclagem de nutrientes e como potencial redutor de efeitos fitotóxicos do excesso de metais, a partir da redução de sua biodisponibilidade no solo (DE CONTI et al., 2018).

O excesso de elementos minerais no solo pode ser resultante do processo de intemperismo, em que os metais pesados presentes naturalmente no material de origem, tornaram-se disponíveis no solo (KEDE et al., 2008). No entanto, a composição desses elementos no solo pode ser alterada pela atividade antrópica, como a mineração, processos industriais, aplicação de dejetos de animais, fertilizantes e fungicidas que possuem metais pesados em sua composição, podendo aumentar a concentração no solo (DA SILVA et al., 2016) e influenciar sobre a fisiologia de espécies vegetais.

## 2.2 ACÚMULO DE MANGANÊS E COBRE NO SOLO E SEU EFEITO SOBRE A FISIOLOGIA DAS PLANTAS

As ocorrências de altos índices pluviométricos na região da Campanha Gaúcha favorecem a ocorrência de doenças fúngicas em folhas em videiras, sendo necessária aplicação de fungicidas para o controle (MIOTTO et al., 2014). Entretanto, a utilização de fungicidas a base de Cu em videiras e pomares em geral podem elevar a concentração de Cu nos solos (BRUNETTO et al., 2016; CAMBROLLÉ et al., 2015; MIOTTO et al., 2017). Além disso, nos últimos anos vem se observando também a elevação da concentração de Mn no solo, em função da aplicação desses fungicidas (DE CONTI et al., 2019; TRENTIN et al., 2019). Elevadas concentrações desses elementos no solo podem promover toxicidade às videiras jovens plantadas em solos de videiras antigas erradicadas e também às gramíneas de cobertura de solo que coabitam essas áreas de vinhedos (MIOTTO et al., 2014).

Diversas espécies de gramíneas do bioma Pampa são comumente encontradas como plantas de cobertura em vinhedos (DE CONTI et al., 2019). Portanto, com a aplicação de fungicidas, após a ocorrência de precipitações ocorre escoamento dos elementos químicos da folha para o solo, sendo que ao longo dos anos podem levar à acumulação de determinados elementos no solo, principalmente na camada superficial (BRUNETTO et al., 2016; TIECHER et al., 2017). Essa acumulação pode causar toxidez tanto nas plantas de cobertura de solo, como também nas videiras, reduzindo a biomassa e podendo causar a morte das plantas em casos mais severos (BRUNETTO et al., 2014; COUTO et al., 2015).

Geralmente, os solos dos vinhedos da Campanha gaúcha são arenosos e com baixo teor de matéria orgânica, o que reduz a adsorção de metais, que ficam disponíveis na solução do solo e podem causar toxidez às plantas (BENEDET et al., 2020). No entanto, as espécies de

gramíneas de cobertura de solo aparentemente apresentam estratégias fisiológicas para sobreviver nesses ambientes contaminados com metais pesados, que podem incluir a regulação da aquisição e distribuição dos elementos, complexação, armazenamento no vacúolo, entre outros (CEBALLOS-LAITA et al., 2018).

O Mn é um metal pesado encontrado em diversos ambientes naturais, comumente encontrado em depósitos de minérios de ferro (PEREIRA et al., 2008). O Mn é um nutriente que apresenta baixa exigência pelas plantas, sendo o nível crítico em torno de 10 a 20 mg kg<sup>-1</sup> de matéria seca (KRAMER, 2010). No entanto, concentrações em excesso, entre 200 a 3.500 mg kg<sup>-1</sup> nos tecidos, são tóxicas (ERDEMIR et al., 2018), sendo que a concentração nas folhas acima de 400 mg kg<sup>-1</sup> afeta o crescimento para a maioria das plantas (MARSCHNER, 2012). Algumas espécies de plantas possuem a capacidade de apresentar alta quantidade de Mn nos tecidos sem apresentar sintomas de toxicidade visíveis ou afetar o crescimento (MAGRI et al., 2020). Diante disso, algumas espécies podem apresentar elevadas concentrações de Mn nas folhas, como observado em *Phytolacca americana* L. e *Alternanthera philoxeroides* que apresentaram mais de 5.000 mg kg<sup>-1</sup> de Mn (XUE et al., 2004; ZHAO et al., 2012). Além disso, algumas plantas podem ser classificadas como hiperacumuladoras, com potencial de armazenar mais de 10.000 mg kg<sup>-1</sup> de Mn em seus tecidos, como é o caso de *Ilex paraguariensis* (MAGRI et al., 2020).

A toxicidade por Mn pode apresentar diversos sintomas nas plantas, como clorose, enrugamento foliar, lesões marrons e atraso no crescimento, pois esses sintomas estão relacionados com processos metabólicos, como fotossíntese e respiração, e outros processos bioquímicos, como o estresse oxidativo, afetando as plantas sensíveis ao excesso do elemento (MILLALEO et al., 2010). Em solos contaminados com níveis de 80 mg de Cu kg<sup>-1</sup>, verificou-se aumento da concentração de Mn no tecido foliar, podendo ocasionar toxicidade em função de alcançar valores próximos aos níveis críticos de toxidez (DE CONTI et al., 2019). Isso demonstra que existe relação entre Cu e Mn no solo ou no processo de absorção pelas plantas.

Embora o Cu seja um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, para espécies sensíveis ao seu excesso, concentrações de 15 a 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cu nos tecidos provoca redução do crescimento (KABATA-PENDIAS, 2010). Isso ocorre pelo fato do Cu promover inibição do alongamento, divisão e diferenciação celular nas regiões meristemáticas e alterações fisiológicas e bioquímicas que afetam o processo fotossintético e atividade enzimática (BOCHICCHIO et al., 2015; DE CONTI et al., 2018).

As alterações na biometria radicular são comumente encontradas em condições de toxicidade por Cu. Essas alterações envolvem principalmente redução do crescimento e aumento



do diâmetro médio de raiz (BOCHICCHIO et al., 2015; DE CONTI et al., 2018). Esse fato ocorre pela redução ou inibição da divisão celular nas regiões do meristema apical da raiz, fazendo com que a redução do alongamento celular seja “compensada” pelo espessamento e aumento do número de raízes laterais (BOCHICCHIO et al., 2015). Portanto, as alterações na biometria radicular podem reduzir a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, provocar clorose e redução do crescimento da parte aérea em função da modificação no estado nutricional nas plantas (BALDI et al., 2018). Um exemplo típico desse desbalanço nutricional ocasionado pela toxicidade de Cu é a clorose internerval das folhas, que normalmente está relacionada com a deficiência de Fe (CAMBROLLÉ et al., 2015).

As plantas possuem mecanismos de tolerância a fim de evitar toxicidade dos metais pesados nas células (YRUELA, 2009). A redução da absorção do metal e/ou exsudação radicular de compostos orgânicos a fim de estabilizar o metal fora da raiz têm sido considerados mecanismos de tolerância (YRUELA, 2009). Contudo, os íons metálicos podem se ligar a ligantes orgânicos com diferentes afinidades, de acordo com escala de afinidade de Irving-Williams ( $Zn^{2+} < Cu^{+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ ), fazendo com que os íons possam ser substituídos uns pelos outros (YRUELA, 2009). Portanto, uma condição de excesso de Cu, por exemplo, tem potencial de influenciar sobre a disponibilidade de diversos elementos, podendo aumentar inclusive a disponibilidade de Mn, em função da maior afinidade do Cu aos ligantes orgânicos. Desse modo, as plantas podem absorver, translocar e armazenar Mn nos seus tecidos.

O principal efeito da toxicidade de metais pesados envolve a formação em excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, subseqüentemente, estresse oxidativo (XUE et al., 2016). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é a forma mais estável das ERO e é produzido em processos fisiológicos em condições normais, mas também é um importante fator envolvido no dano celular oxidativo, sendo assim bastante estudado para identificar a formação de ERO em condições de estresse (JUNGLEE et al., 2014). O estresse oxidativo ocasionado por Mn já foi observado em espécies como *Hordeum vulgare* (DEMIREVSKA-KEPOVA et al., 2004) e *Cucumis sativus* (SHI et al., 2005). Porém, existem espécies que apresentam tolerância ao Mn em função de alterações estruturais em resposta ao estresse oxidativo, como o *Polygonum perfoliatum* (XUE et al., 2018). O estresse oxidativo causado por Cu e o aumento da atividade de enzimas antioxidantes também já foram observados para culturas como *Vitis vinifera* (JUANG et al., 2019) e *Avena strigosa* (TIECHER et al., 2016).

Algumas plantas apresentam grande capacidade de tolerância aos metais, tais como Cu e Mn em solos contaminados. Essa tolerância, evidenciada por algumas espécies de plantas, é

decorrente de diversas estratégias moleculares, bioquímicas e celulares desenvolvidas pelas plantas para evitar os efeitos tóxicos (SHAO et al., 2017). Portanto, essas estratégias de tolerância podem estar relacionadas com ativação do sistema antioxidante (SHENG et al., 2016), regulação da absorção, translocação e distribuição dos elementos (SHAO et al., 2017; TSUNEMITSU et al., 2018), complexação dos íons a partir de compostos orgânicos e inorgânicos (CHEN et al., 2015; CHEN et al., 2016) ou compartimentalizados em vacúolos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, apoplasto e parede celular (GU et al., 2022; TAKEMOTO et al., 2017).

Da mesma forma, diversas gramíneas de cobertura de solo conseguem sobreviver em áreas com elevadas concentrações de metais pesados, dentre eles, o Cu e Mn. Esses mecanismos de tolerância, também podem favorecer o desenvolvimento de outras plantas cultivadas em consórcio, devido à redução da biodisponibilidade do contaminante (BRUNETTO et al., 2016). As gramíneas de cobertura de solo, como as espécies nativas e exóticas que crescem espontaneamente em áreas de vinhedos, se adaptam às condições de baixos níveis de nutrientes e à presença de elementos tóxicos, tornando-se fundamental conhecer as estratégias de tolerância dessas espécies visando o seu uso potencial na fitoestabilização em solos contaminados.

### 2.3 ABSORÇÃO DE COBRE E MANGANÊS E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À METAIS PESADOS

O Mn é absorvido como um cátion divalente ( $Mn^{2+}$ ) pelas células da raiz através de um sistema de transporte ativo (PITTMAN, 2005). A inibição da translocação do Mn funciona como um mecanismo de tolerância ao elemento, assim como observado em plantas de *Triticum polonicum* (SHENG et al., 2015). O Cu é absorvido como  $Cu^{+2}$  e Cu-quelato a partir de um processo ativo, sendo a absorção altamente regulada pela disponibilidade do elemento na solução e pelo status do elemento na planta. A concentração nos tecidos da planta em geral é de 2 a 20 mg  $kg^{-1}$  da matéria seca (FERNANDES; SOUZA; SANTOS, 2018).

Muitas vezes a biomassa pode ser incrementada com o excesso de metais pesados até determinado nível, mas verifica-se redução em concentrações mais elevadas (ZONG et al., 2020). A concentração de Mn nos tecidos foliares e de raízes aumentam conforme o acréscimo da concentração do elemento na solução, sendo facilmente transportado pelo xilema e normalmente concentrado em maior magnitude na parte aérea (XIAO et al., 2020). A maior concentração de Mn nas folhas já foi observado em diversas espécies como *Triticum aestivum*, *Vitis vinífera*, *Eucalyptus globulus*, *Corymbia citriodora*, *Cleome viscosa*, entre outros (DE

OLIVEIRA e ANDRADE, 2020; FARIA et al., 2020; KARAVIN e BATIN, 2020; XIAO et al., 2020).

Por outro lado, o acúmulo de Mn pode ocorrer em maior quantidade no sistema radicular. Em estudo com diferentes concentrações de Mn em *Verbascum olympicum*, Erdemir et al. (2018) observaram que em maiores concentrações na solução nutritiva resultou em maior concentração no tecido vegetal, sendo que as raízes foram os órgãos que apresentaram maior concentração deste elemento, com níveis de aproximadamente  $5.680 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso seco em concentrações de  $200 \text{ }\mu\text{M}$  de Mn no sétimo dia, excedendo a faixa limiar da concentração do elemento nos tecidos, que é de  $1-700 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso seco (VISIOLI e MARMIROLI, 2013). Além disso, parte do elemento geralmente fica adsorvido na superfície das raízes na forma de óxidos de Mn, enquanto em folhas de algumas espécies de plantas pode ocorrer acúmulo de óxido de Mn, e assim promover o aparecimento de manchas marrons (XUE et al., 2016).

O acúmulo de Cu também ocorre tanto nas raízes quanto na parte aérea das plantas conforme o aumento da concentração na solução (BENEDET et al., 2019). Entretanto, o Cu é normalmente concentrado em maior magnitude no sistema radicular das plantas, assim como observado em *Avena sativa*, *Avena strigosa* e *Vitis vinífera* (BENEDET et al., 2019; COMIN et al., 2018; DE CONTI et al., 2019; TRENTIN et al., 2019).

As raízes das plantas são os principais alvos iniciais da toxidez por metais pesados, principalmente em relação ao Cu, pois afetam o crescimento e desenvolvimento desses órgãos, e conseqüentemente afetam a parte aérea. A maioria dos estudos relacionam o efeito da toxidez por metais pesados com respostas fisiológicas das plantas, tais como a produção de ERO, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e redução da fotossíntese (ZHAO et al., 2017), deixando de lado o estudo das características radiculares em resposta à determinados elementos.

As raízes das plantas podem exsudar diversos compostos, como ácidos orgânicos, aminoácidos e, compostos fenólicos que influenciam sobre a disponibilidade de elementos presentes no solo (CHEN; WANG; YEH, 2017; DE CONTI et al., 2016; DRESLER et al., 2014). Portanto, algumas espécies adotam a exsudação como uma forma de estabilizar o metal fora da raiz, limitando a absorção pela planta (DE CONTI et al., 2018). No entanto, quando é realizado o consórcio entre duas espécies vegetais pode ocorrer um processo sinérgico entre elas, quando cultivadas em solos pouco ou moderadamente contaminados com metais pesados, em que as espécies passam a “tolerar” os elementos tóxicos (BRUNETTO et al., 2016; WAN et al., 2017; WAN; LEI; CHEN, 2016).

Os níveis excessivos de um nutriente podem alterar o comportamento de outros, possivelmente em função de semelhanças das características químicas dos elementos

(ARSLAN et al., 2014; MILLALEO et al., 2010). O excesso de Mn por exemplo, pode alterar a absorção, translocação e utilização de outros elementos como cálcio (Ca), magnésio (Mg), Fe e P (MILLALEO et al., 2010), assim como o Cu pode afetar a absorção e translocação de Fe (CAMBROLLÉ et al., 2015). Portanto, o efeito combinado da interação de Cu e Mn pode ocasionar diversas respostas fisiológicas e bioquímicas sobre as gramíneas de cobertura de solo, podendo intensificar o estresse ou até mesmo um elemento mitigar o efeito do outro.

Para tolerar o excesso das ERO, as espécies vegetais possuem estratégias de defesa, a partir de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que reduzem os efeitos do dano celular (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013). Dentre os principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, pode-se destacar o ácido ascórbico, guaiacol peroxidase, carotenoides, catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, entre outros (RAHMAN et al., 2016). Esses antioxidantes são mecanismos de defesa que removem as ERO evitando a ocorrência de dano celular (SERKEDJIEVA, 2011). Além disso, cada enzima antioxidante apresenta uma especialidade sobre as formas de ERO, por exemplo, a superóxido dismutase dismuta os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em  $H_2O_2$ , enquanto a guaiacol peroxidase e catalase são responsáveis pela destoxificação do  $H_2O_2$  nos vegetais durante condições de estresse (BARBOSA et al., 2014).

As características das plantas em absorver e tolerar o excesso de metais podem ser classificadas em excludentes, indicadoras ou acumuladoras. No entanto, diversos mecanismos podem evitar a toxidez de metais pelas plantas, como o sequestro de metais a partir de compostos orgânicos, compartimentação subcelular, imobilização do metal ativo e exsudação de ligantes orgânicos, dentre os mais importantes (WANG et al., 2018). Para tolerar os efeitos tóxicos de Cu por exemplo, as plantas reduzem a disponibilidade do elemento a partir de reações de complexação devido à liberação de íons e compostos orgânicos solúveis ou impedindo a translocação do elemento, promovendo o acúmulo do metal no sistema radicular (BRUNETTO et al., 2016; DE CONTI et al., 2016). Aliás, o acúmulo e/ou imobilização de Cu no sistema radicular das plantas é considerado um mecanismo de tolerância que visa evitar o transporte e acúmulo do metal na parte aérea, onde os efeitos seriam muito mais prejudiciais ao metabolismo da planta (YRUELA, 2009).

**3 ARTIGO 1 – RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO SUBMETIDAS AO EXCESSO DE MANGANÊS**

Periódico: Environmental and Experimental Botany.

## RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE GRAMÍNEAS DE COBERTURA DE SOLO SUBMETIDAS AO EXCESSO DE MANGANÊS

### 3.1 RESUMO

Fungicidas aplicados para o controle de doenças em plantas possuem manganês (Mn) na sua composição, o que pode aumentar o seu teor em solos. Também, plantas cultivadas em condições de excesso de outros metais pesados podem desenvolver mecanismos de adaptação, o qual podem modificar o solo rizosférico, aumentando a concentração de Mn na solução, o que potencializa a toxidez em plantas. Porém, gramíneas exóticas e nativas do bioma Pampa podem possuir mecanismos de tolerância para reduzir o potencial de toxidez. O estudo objetivou avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas em gramíneas nativas e exóticas que podem ser cultivadas em ambiente com excesso de Mn. O experimento foi conduzido em solução nutritiva em casa de vegetação, sob delineamento inteiramente casualizado, bifatorial 4x4, constituído por quatro concentrações de Mn (2 [controle], 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ) em quatro espécies de gramíneas de cobertura de solo (*Avena strigosa*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*). A biomassa e taxas de crescimento, trocas gasosas da folha com o ambiente, pigmentos fotossintéticos, concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , atividade de enzimas antioxidantes, distribuição subcelular de Mn, biometria do sistema radicular, densidade estomática e concentração de nutrientes nos tecidos foram avaliados. Observou-se que a maioria das gramíneas de cobertura de solo apresentam tolerância ao excesso de Mn e capacidade de concentrar alta quantidade de Mn nos seus tecidos, principalmente, na parte aérea. Na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn, mais de 80% de todo Mn absorvido é compartimentalizado na parede celular e vacúolo da célula. A compartimentalização do excesso de Mn em organelas metabolicamente menos ativas é o principal fator de tolerância pela maioria das espécies. As respostas fisiológicas e bioquímicas são estimuladas na presença de 300  $\mu\text{M}$  de Mn para a maioria das espécies, enquanto 900  $\mu\text{M}$  afeta negativamente as respostas das plantas. A espécie de *L. multiflorum* foi mais sensível ao excesso de Mn.

**Palavras-chave:** Contaminação. Estresse. Fisiologia. Metal pesado. Toxidez.

### 3.2 ABSTRACT

Fungicides applied to control plant diseases have manganese (Mn) in their composition, which can increase their content in soils. Also, plants grown in conditions of excess of other heavy metals can develop adaptation mechanisms, which can modify the rhizospheric soil, increasing the concentration of Mn in the solution, which potentiates the toxicity in plants. However, exotic and native grasses of the Pampa biome may have tolerance mechanisms to reduce the potential for toxicity. The study objective to evaluate the physiological and biochemical responses in native and exotic grasses that can be cultivated in an environment with excess Mn. The experiment was conducted out in nutrient solution in a greenhouse under a completely randomized design, bifactorial 4x4, consisting of four concentrations of Mn (2 [control], 300, 600 and 900  $\mu\text{M}$ ) in four species of ground cover grasses (*Avena strigosa*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum*). Biomass and growth rates, leaf gas exchange with the environment, photosynthetic pigments,  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration, antioxidant enzyme activity, subcellular Mn distribution, root system biometry, stomatal density and tissue nutrient concentration were evaluated. It was observed that most of the ground cover grasses show tolerance to excess Mn and the ability to concentrate high amounts of Mn in their tissues, mainly in the shoot. In the presence of 900  $\mu\text{M}$  Mn, more than 80% of all absorbed Mn is

compartmentalized in the cell wall and cell vacuole. The compartmentalization of excess Mn in metabolically fewer active organelles is the main factor of tolerance by most species. Physiological and biochemical responses are stimulated in the presence of 300  $\mu\text{M}$  Mn for most species, while 900  $\mu\text{M}$  negatively affects plant responses. The species of *L. multiflorum* was more sensitive to excess Mn.

**Key-words:** Contamination. Stress. Physiology. Heavy metal. Toxicity.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O manganês (Mn) é um elemento mineral essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, participando em diversos processos metabólicos, como a fotossíntese (MILLALEO et al., 2010; YIN et al., 2019). No processo fotossintético, o Mn atua como um cofator essencial no processo de oxidação da água fornecendo elétrons e hidrogênios para produção de energia química e formação do oxigênio molecular, além de ser relevante para a manutenção da estrutura normal das membranas dos cloroplastos (NEVES et al., 2017; PAN et al., 2018). Esse micronutriente também desempenha funções no processo de absorção iônica, respiração, balanço hormonal, metabolismo de nitrogênio, síntese de proteínas e também está envolvido na biossíntese de lipídios, flavonóides e lignina (CHEN et al., 2014). Porém, o excesso de Mn pode ser tóxico às plantas.

A toxicidade por Mn afeta diversos processos do metabolismo celular, resultando na degradação de lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, podendo causar morte celular em alguns casos (FERNANDO et al., 2013). Além disso, altas concentrações de Mn nos tecidos podem afetar a absorção, redistribuição e utilização de outros elementos minerais como fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e boro (B), assim alterando as respostas fisiológicas e produtivas das plantas (SANTOS et al., 2017). O cloroplasto é a principal organela afetada pela toxicidade de Mn, a partir do rompimento da estrutura dos tilacóides e da cadeia transportadora de elétrons (CHEN et al., 2014), ocasionada em função da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, conseqüentemente, estresse oxidativo, que são responsáveis pela degradação de diversas estruturas celulares (XUE et al., 2016). Portanto, os sintomas da toxicidade podem resultar em clorose e necrose, enrugamento foliar ou lesões marrons, promovendo atraso no crescimento em plantas (MILLALEO et al., 2010).

Algumas atividades antropogênicas como mineração, aplicação de agroquímicos e dejetos de animais na área de fruticultura vêm provocando contaminação do solo por metais pesados, incluindo Mn. Em fruticultura, como áreas de vinhedos no bioma Pampa na América do Sul, onde se tem aplicações constantes de fungicidas a base de cobre (Cu), zinco (Zn) e Mn,

tem-se observado alta concentração desses elementos no solo, as quais são apontadas como causa do menor crescimento das videiras (principalmente em plantas jovens) e das gramíneas de cobertura de solo que habitam esses ambientes (BRUNETTO et al., 2014; COUTO et al., 2015). Os solos dos vinhedos da Campanha Gaúcha, região Sul do Brasil, em sua maioria são arenosos e com baixo teor de matéria orgânica, reduzindo a adsorção de metais pesados. No entanto, diversas espécies de gramíneas de cobertura de solo (nativas e exóticas) apresentam estratégias fisiológicas que as possibilitam sobreviver nesses ambientes contaminados por metais pesados (CEBALLOS-LAITA et al., 2018). Além disso, os estudos com altas concentrações de Cu demonstraram que o consórcio de gramíneas nativas do bioma Pampa (*Paspalum plicatulum* e *Axonopus affinis*), que são manejadas como plantas de cobertura de solo nas entrelinhas dos vinhedos, tendem a reduzir a concentração de Mn nos tecidos de folhas, caule e raiz das videiras quando comparadas ao monocultivo (DE CONTI et al., 2019).

Assim sendo, em função das gramíneas de cobertura de solo possuírem estratégias para tolerar solos geralmente ácidos e com a presença de elementos tóxicos (Al e Mn), a utilização dessas espécies e práticas de manejo podem se tornar estratégias potenciais de baixo custo para a fitoestabilização do excesso de metais (LEGUIZAMO et al., 2017). Portanto, avaliar o efeito da toxicidade de metais pesados, como o Mn, nas respostas bioquímicas e fisiológicas de distintas espécies de gramíneas encontradas espontaneamente em solos de vinhedos contaminados por metais pesados torna-se fundamental para estabelecer estratégias de manejo e avaliar o grau de tolerância dessas plantas. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas em gramíneas nativas e exóticas que podem ser cultivadas em ambiente com excesso de Mn.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Descrição do experimento

O estudo foi realizado em casa de vegetação localizada na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), (29° 42' S, 53° 43' O e 103 m de altitude), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. O experimento foi conduzido em solução nutritiva de 19 de fevereiro de 2020 até 24 de março de 2020, em delineamento experimental inteiramente casualizado, bifatorial 4x4, com três repetições. A unidade experimental consistiu em um recipiente de 5 L de solução nutritiva e seis plantas. As espécies foram *Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Avena strigosa* (cv. BRS 139) e *Lolium multiflorum* (cv. BRS Ponteio), cultivadas em quatro concentrações de Mn: 2 (controle),



300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ . Essas concentrações de Mn foram correspondentes à 0,11; 11,5; 32,96 e 49,45  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente. A escolha das espécies de gramíneas foi baseada na representatividade dos gêneros nos vinhedos do bioma Pampa no Brasil. As mudas das espécies nativas (*Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*) foram propagadas vegetativamente a partir de plantas cultivadas em areia em casa de vegetação. As espécies exóticas (*Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*) foram propagadas através de sementeira em vermiculita realizada aos três dias do mês de fevereiro de 2020. Para o experimento, as mudas de cada espécie foram padronizadas de acordo com número de folhas expandidas (aproximadamente três folhas expandidas) e tamanho de raízes e, posteriormente, foram transplantadas para vasos com solução nutritiva.

As raízes das plantas foram imersas em 5 L de solução nutritiva com aeração constante composta por: 85,31  $\text{mg L}^{-1}$  N; 3,77  $\text{mg L}^{-1}$  P; 11,54  $\text{mg L}^{-1}$  S; 97,64  $\text{mg L}^{-1}$  Ca; 23,68  $\text{mg L}^{-1}$  Mg; 104,75  $\text{mg L}^{-1}$  K; 181,08  $\text{mg L}^{-1}$  Cl; 0,27  $\text{mg L}^{-1}$  B; 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  Mo; 0,01  $\text{mg L}^{-1}$  Ni; 0,13  $\text{mg L}^{-1}$  Zn; 0,03  $\text{mg L}^{-1}$  Cu; 0,11  $\text{mg L}^{-1}$  Mn e 2,68  $\text{mg L}^{-1}$  Fe. As plantas foram fixadas em orifícios de placas de poliestireno com auxílio de esponjas, onde permaneceram durante sete dias em solução nutritiva com concentração de 2  $\mu\text{M}$  de Mn (controle), constituindo o período de aclimação. Posteriormente, foram aplicados os tratamentos com diferentes concentrações de Mn, com troca da solução nutritiva a cada sete dias e pH inicial de 5,5. Durante o período experimental, o pH da solução nutritiva foi monitorado a cada dois dias. Ao final do período de aclimação foi avaliada a massa seca de uma planta por repetição para determinar o crescimento inicial.

### 3.4.2 Produção de biomassa e taxa de crescimento

Aos 27 dias de exposição das gramíneas as concentrações de Mn, três plantas de cada repetição foram coletadas para determinação da massa seca de raízes, parte aérea e total. As raízes das plantas foram lavadas em água destilada e secas em papel absorvente antes da avaliação. As raízes e parte aérea foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar à  $\pm 65^\circ\text{C}$  até atingir massa constante. A determinação da massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) foi realizada em balança de precisão (Shimadzu, AY220).

No início da aplicação dos tratamentos, uma planta foi coletada, preparada e determinada a MST inicial. A taxa de crescimento absoluto ( $\text{TCA}_b$ ), que é um indicador da velocidade média de crescimento durante o período foi determinada através da Equação 1:

$$\text{TCA}_b (\text{g dia}^{-1}) = (\text{MST}_f - \text{MST}_i) / \text{ND} \quad (1)$$

Onde:  $MST_f$  = Massa seca total final;  $MST_i$  = Massa seca total inicial; ND = número de dias.

A taxa de crescimento relativo (TCR), que representa o incremento em massa seca por unidade de massa seca inicial em um intervalo de tempo foi determinada pela Equação 2:

$$TCR (g g^{-1} dia^{-1}) = (log MST_f - log MST_i) / ND \quad (2)$$

Onde:  $MST_f$  = Massa seca total final;  $MST_i$  = Massa seca total inicial; ND = número de dias.

### 3.4.3 Concentração de nutrientes e índice de translocação

Raízes e parte aérea foram moídas em moinho tipo Willey (Tecnal, TE-680). Os resíduos foram passados em peneira de malha de 2 mm. Amostras de 0,250 g foram submetidas à digestão nitroperclórica (3 mL de ácido nítrico [HNO<sub>3</sub>] 65% P.A. e 1 mL de ácido perclórico [HClO<sub>4</sub>] 70% P.A.) (Embrapa, 2009). A concentração total de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e Mn foram analisadas em espectrômetro de absorção atômica (AAS, Perkin Elmer Aanalyst 200) (Tedesco et al., 1995).

O índice de translocação (IT) de Mn para a parte aérea, que representa a magnitude de Mn translocado para a parte aérea foi determinada pela Equação 3:

$$IT = [MnPA] / [MnT] \quad (3)$$

Onde: [MnPA] = Concentração de Mn na parte aérea; [MnT] = Concentração total de Mn.

O fósforo (P) foi analisado em espectrofotômetro (Tecnal, V-5000), conforme metodologia de Murphy & Riley (1962). Para determinação do nitrogênio (N), 0,2 g de material vegetal foram pesados e adicionados em tubo de digestão com 0,2 g de mistura catalítica (100 g de NaSO<sub>4</sub> e 10 g de CuSO<sub>4</sub>). Após, foram adicionadas 1 mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 2 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), colocados no bloco de digestão a 150°C e monitorado durante 30 minutos. As temperaturas foram alteradas para 200, 250, 300 e 350°C a cada 30 minutos. Quando a temperatura atingiu 350°C, os tubos permaneceram por mais uma hora no bloco digestor. Após esse período os tubos foram resfriados e adicionados 20 mL de água destilada para destilação. A destilação do N pelo método de Kjeldahl ocorreu a partir da adição de 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH – 10 mol L<sup>-1</sup>) no tubo e ácido bórico (5 mL) como indicador. A quantificação do nitrogênio total foi realizada por meio de titulação volumétrica, onde a solução indicadora contendo nitrogênio total coletado foi titulada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,025 mol L<sup>-1</sup>).

### 3.4.4 Trocas gasosas da folha com o ambiente

As trocas gasosas da folha com o ambiente foram realizadas a partir de um analisador de gás por radiação infravermelho (Infrared Gas Analyser [IRGA], Mod. LICOR® 6400 XT).

As leituras foram realizadas entre 8h e 10h com concentração de  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  e densidade de fluxo de fótons de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para isso, foi selecionada a penúltima folha expandida de uma planta de cada repetição para realizar a leitura. Nesta avaliação foram determinadas as variáveis: taxa fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $G_s$ ), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco ( $A/C_i$ ), taxa de transpiração ( $E$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e eficiência do uso da água ( $EUA$ ). A  $A/C_i$  foi determinada a partir da relação entre a taxa fotossintética líquida ( $A$ ) e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), o que representa a quantidade de  $\text{CO}_2$  fixado pela fotossíntese. A  $EUA$  foi determinada pela razão entre a taxa fotossintética líquida ( $A$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ).

Ao final do experimento, as mesmas plantas onde foram avaliadas trocas gasosas, foram coletadas e imediatamente congeladas em N líquido e armazenadas em ultrafreezer à  $-80^\circ\text{C}$ . Posteriormente, essas amostras foram maceradas em N líquido para a determinação da distribuição subcelular de Mn nos tecidos, pigmentos fotossintéticos, concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxidação lipídica (TBARS) e atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD).

### 3.4.5 Distribuição subcelular do Mn no tecido

A distribuição do Mn em folhas e raízes em nível celular foram determinados nas concentrações de 2 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn de cada espécie, de acordo com metodologia adaptada de Fu et al. (2013), Wang, Liu e Hu (2016), Huang et al. (2017) e Xiao et al. (2020). Para isso, 1,0 g de material vegetal (de folhas e raízes) macerado em N líquido e congelado em ultrafreezer ( $-80^\circ\text{C}$ ), foram homogeneizados com 10 ml de tampão de 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de Tris-HCl (pH 7,5), 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de Ditioneitol (DTT) e 250  $\text{mmol L}^{-1}$  de sacarose, correspondente à proporção 1:10 (m:v). Todo o processo de homogeneização e centrifugação foram realizados a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, o extrato homogeneizado foi centrifugado a 300 g por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , resultando em um *pellet* correspondente a paredes celulares. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 5.000 g por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O *pellet* dessa fração correspondeu a núcleos e plastídios. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 15.000 g por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . O *pellet* dessa fração correspondeu a fração mitocondrial, enquanto o sobrenadante correspondeu a fração de citosol e vacúolos. Posteriormente, o material fracionado foi seco em estufa a  $70^\circ\text{C}$  até atingir massa constante e em seguida submetido a digestão nitroperclórica (3 mL de ácido nítrico [ $\text{HNO}_3$ ] 65% P.A. e 1 mL de ácido perclórico [ $\text{HClO}_4$ ] 70% P.A.). Ao final da digestão, as amostras foram armazenadas em tubos de acrílicos e completadas com água até atingir peso de 5,0 g. A concentração de Mn nos diferentes

compartimentos subcelular foram analisados em espectrômetro de absorção atômica (AAS, Perkin Elmer Aanalyst 200).

#### **3.4.6 Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos**

A quantificação da concentração dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) nas folhas foi determinada utilizando a metodologia proposta por Hiscox & Israelstam (1979) e estimado a partir da fórmula de Lichtenthaler's (LICHTENTHALER, 1987). Para isso, foram pesados 0,05 g de material vegetal e, posteriormente incubados em banho maria a 65°C em torno de 40 min com 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) até remoção total dos pigmentos presentes no tecido foliar. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) nos comprimentos de onda 663, 645 e 470 nm para determinação da clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente. A clorofila total foi a soma dos valores de clorofila *a* e *b*.

#### **3.4.7 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada de acordo com Loreto & Velikova (2001). Para isso, 0,3 g de amostras congeladas foram homogeneizadas em 3 ml de 0,1% (w/v) de ácido tricloroacético (TCA) e, posteriormente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Uma quantidade de 0,5 mL do sobrenadante da amostra foi adicionado com 0,5 mL de tampão de 10 mmol L<sup>-1</sup> fosfato de potássio (pH 7) e 1 mL de 1 mol L<sup>-1</sup> de iodeto de K (KI). A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) no comprimento de onda 390 nm. Os valores da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> de massa fresca.

#### **3.4.8 Peroxidação lipídica (TBARS)**

Os níveis da peroxidação lipídica foram estimados a partir do método de El-Moshaty (1993), quantificando a concentração de malondialdeído (MDA) como um produto da peroxidação lipídica por reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Para isso, 0,5 g de amostras congeladas foram homogeneizadas com 4 mL de 0,2 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato-citrato (TFK – pH 6,5) contendo 0,5% de Triton-X. As amostras foram centrifugadas a 20.000g em centrífuga refrigerada a 4°C durante 15 minutos. Alíquotas de 1,5 mL de sobrenadante foram separadas para determinação do TBARS. O mesmo volume de 20% de ácido tricloroacético (TCA) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foi adicionado às amostras. A mistura foi aquecida a 95°C por 40 minutos e após rapidamente resfriadas em gelo por 15 minutos. As

amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. A absorvância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) em 532 nm, subtraindo o valor de absorvância de 600 nm como uma correção de turbidez não específica.

#### **3.4.9 Atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD)**

Para determinação da atividade da SOD, amostra de 0,5 g de tecido congelado foi homogeneizado em 3 mL de tampão de 50 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio (pH 7,8), incluindo EDTA (1 mmol L<sup>-1</sup>) e 0,5% de Triton-X. O extrato homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 15 min em centrifuga refrigerada a 4°C. A atividade da SOD e conteúdo de proteína foram determinados pelo uso do sobrenadante (BRADFORD, 1976; ZHU et al., 2004). Para isso, 2,8 mL de solução composta por 50 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio (pH 7,8), metionina (13 mmol L<sup>-1</sup>), EDTA (0,1 µM), *p*-nitro blue tetrazolium - NBT (75 µM) e riboflavina (2 µM) foram adicionadas em tubos de vidro com 200 µL do sobrenadante da amostra de folhas, e incubados sob luz de lâmpadas fluorescente (15 watts) por três minutos. Para raízes foram utilizados 1,3 mL da solução com 700 µL de amostra e incubados na luz por um minuto. A absorvância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) no comprimento de onda 560 nm. A atividade da SOD é dada através da inibição do NBT pela enzima. Tubos sem extrato expostos ou não à luz foram usados como tubos controle (branco) para a reação. A atividade da SOD foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato inibindo 50% da reação NBT e expresso como U mg<sup>-1</sup> de proteína. Para todos os ensaios enzimáticos, a proteína foi determinada pelo método azul de Comassie (BRADFORD, 1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

#### **3.4.10 Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD)**

O mesmo extrato homogeneizado para SOD foi usado para determinação da atividade enzimática da POD. A atividade da POD foi determinada baseada no método espectrofotométrico. Para isso, 3 mL de solução correspondente a 1 mL de 100 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio (pH 6,5), 1 mL de guaiacol (15 mmol L<sup>-1</sup>) e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionadas com 50 µL de extrato da amostra, diretamente na cubeta do espectrofotômetro. A absorvância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Femto, 800 XI) no comprimento de onda 470 nm por 1 minuto e intervalo de 15 segundos. A atividade da enzima é dada através da conversão de guaiacol em tetraguaiacol.

#### **3.4.11 Biometria do sistema radicular**

A biometria do sistema radicular foi determinada utilizando o software WinRhizo Pro 2013, acoplado a um scanner (EPSON Expression 11000). Para isso, as raízes foram suspensas em água em uma bandeja de acrílico e as imagens obtidas em resolução de 600 dpi. A partir deste equipamento foi possível determinar parâmetros biométricos do sistema radicular como: comprimento total, área superficial, diâmetro médio, volume radicular e comprimento específico de raízes. O comprimento específico de raízes foi determinado pela razão entre comprimento total e massa seca de raízes, expresso em  $\text{cm mg}^{-1}$ .

#### **3.4.12 Densidade estomática das folhas**

No final do experimento foram confeccionadas lâminas semipermanentes a partir da impressão da epiderme abaxial e adaxial da folha, com o uso de adesivo de éster de cianoacrilato, técnica conhecida como *imprints* (WEYERS E JOHANSEN, 1985; CAMPOS et al. 2009). As lâminas foram visualizadas em microscópio ótico (Modelo LEICA DM 1000) com câmera acoplada (Modelo LEICA DFC 295), e as imagens micrografadas com auxílio do software “Leica application Suite” (Version 3.0). A densidade estomática foi expressa em número de estômatos por unidade de área foliar.

#### **3.4.13 Análise estatística**

Os dados do experimento foram submetidos à teste de normalidade dos erros com o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância, e quando atendidos os pressupostos estatísticos foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Quando significativos foi realizado comparação múltipla de médias pelo teste de Scott e Knott, com 5% de probabilidade de erro, utilizando programa estatístico R, pacote “ExpDes.pt” (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014). Entretanto, as comparações foram apresentadas apenas para as concentrações de Mn em cada espécie de gramínea. Para distribuição subcelular de Mn, foram comparadas as médias entre cada concentração de Mn e as organelas da célula dentro de cada espécie.

### **3.5 RESULTADOS**

#### **3.5.1 pH da solução nutritiva**

Os valores de pH da solução nutritiva oscilaram durante a condução do experimento (Figura 1). Nós observamos tendência de diminuição dos valores de pH depois de cada troca da solução nutritiva. Durante o período de aclimação (até sete dias após o transplante), o pH

variou de 5,1 a 6,1 para *A. strigosa*; 5,6 a 6,1 para *L. multiflorum*; 4,6 a 5,8 para *P. notatum*; e 4,9 e 5,9 para *P. plicatulum* (Figura 1). Após o início dos tratamentos com as diferentes concentrações de Mn, todas as espécies de gramíneas causaram diminuição do pH da solução nutritiva, atingindo níveis elevados de acidez com valores próximos a 3,0 para *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum* (Figura 1B, 1C e 1D, respectivamente). A *A. strigosa* também apresentou acidificação da solução, mas os valores de pH ficaram próximos de 4,0 (Figura 1A). Aos 16 a 18 dias após o transplante de *A. strigosa* e 23 a 27 dias após o transplante de *L. multiflorum* houve aumento do pH na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn, quando comparado com os demais tratamentos.

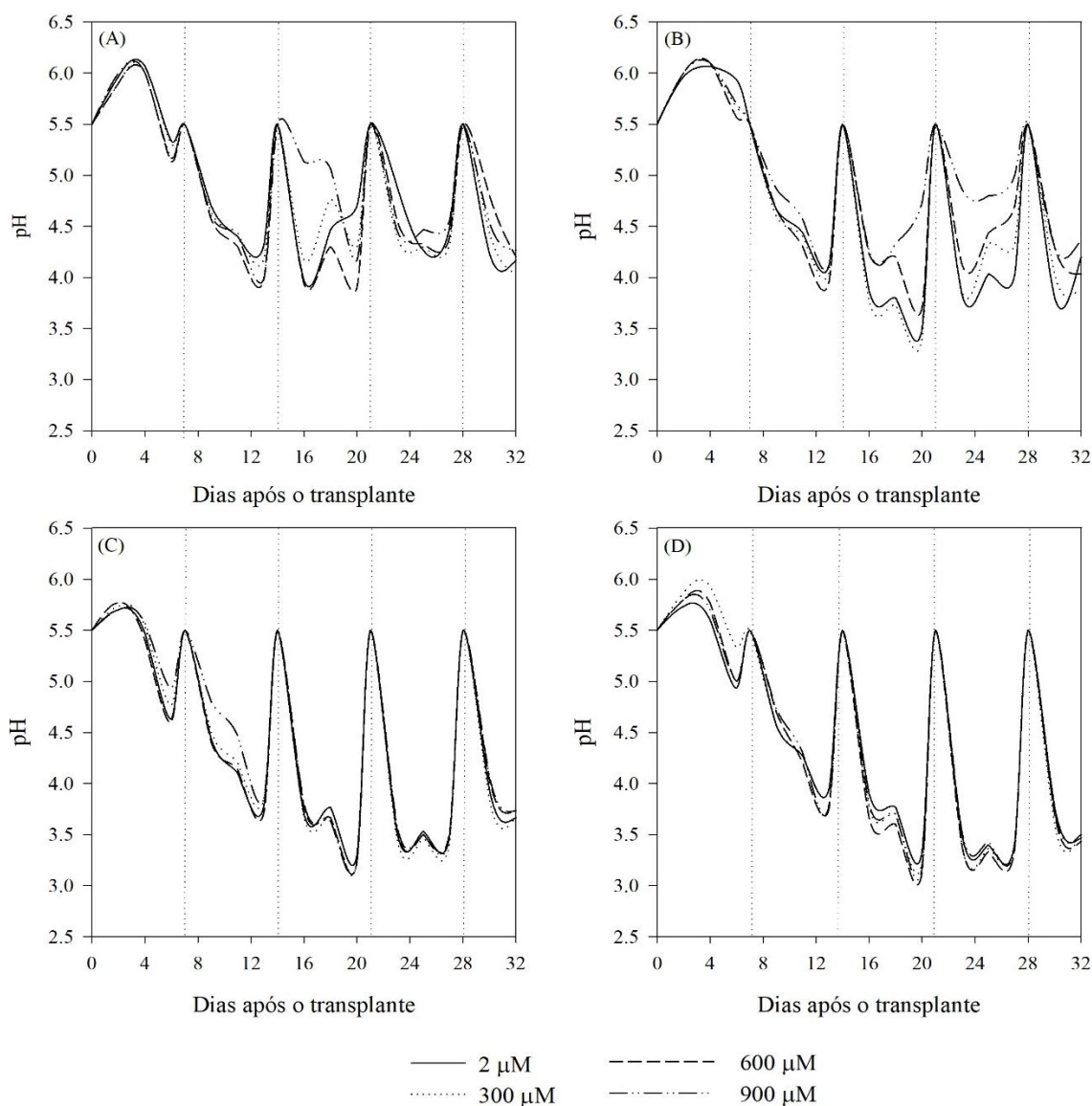


Figura 1. Variação do pH da solução nutritiva em função das diferentes concentrações de Mn em gramíneas de cobertura de solo *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatulum* (D), durante o período de condução do experimento. \*Linhas pontilhadas na vertical indicam os períodos de troca da solução nutritiva, sendo o início dos tratamentos aos sete dias após o transplante.

### 3.5.2 Sintomatologia de toxicidade de Mn

O *L. multiflorum* foi a gramínea que apresentou sintomas de toxicidade de Mn, que foram manchas necróticas marrons nas folhas basais mais velhas (Figura 2). Menores sintomas foram observados nas folhas das plantas cultivadas na presença de 300  $\mu\text{M}$  de Mn. Os maiores sintomas foram observados nas plantas cultivadas em 600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figura 2). Nós destacamos que os sintomas iniciaram na epiderme abaxial da folha e, posteriormente, se expandiram para a epiderme adaxial.

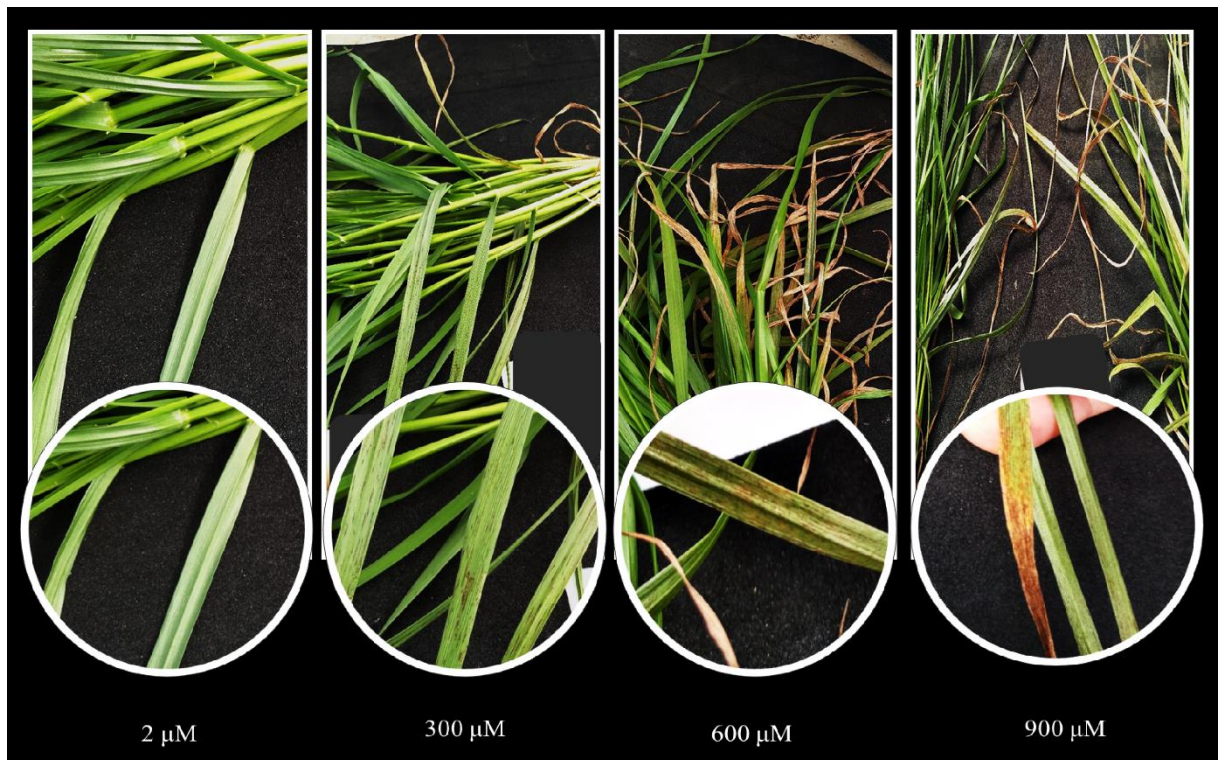


Figura 2. Sintomas de toxicidade de Mn em folhas velhas de *Lolium multiflorum*.

As demais gramíneas não apresentaram sintomas visuais característicos de toxicidade de Mn, porém houve tendência de redução da biomassa na presença da maior concentração de Mn (Figura 3).





Figura 3. Gramíneas de cobertura de solo *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatulum* (D) cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900 μM).

### 3.5.3 Análise de variância

Pela análise de variância, as variáveis de crescimento (massa seca de raízes, parte aérea e total das plantas) apresentaram diferenças significativas para os fatores espécie e concentração de Mn separadamente, pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Para as taxas de crescimento absoluto e relativo houve significância para interação entre os fatores espécie x concentração de Mn. Para as trocas gasosas da folha com o ambiente, as variáveis de taxa fotossintética líquida, condutância estomática, eficiência de carboxilação instantânea da rubisco e taxa de transpiração também apresentaram efeito significativo para a interação entre os fatores espécie x concentração de Mn, enquanto para a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  houve efeito significativo para os fatores espécie e concentração de Mn separadamente e para eficiência do uso da água somente para o fator espécie ( $p < 0,05$ ).

Para pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenoides, razão clorofila *a/b* e razão clorofila total/carotenoides), densidade estomática das folhas (epiderme abaxial, adaxial e total) e análises bioquímicas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , TBARS, SOD e POD) de raízes e folhas, houve interação significativa entre os fatores espécie x concentração de Mn ( $p < 0,05$ ). Para biometria do sistema radicular, houve diferença significativa das variáveis comprimento total, área superficial específica, volume radicular e comprimento específico de raízes para interação espécie x concentração de Mn, enquanto para diâmetro médio de raízes houve diferença significativa para os fatores espécie e concentração de Mn separadamente, pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro.

Para análise de nutrientes nos tecidos, houve interação significativa entre os fatores espécie x concentração de Mn ( $p < 0,05$ ) para K, Fe, Zn e Mn na parte aérea e Ca, Mg, K, Cu, Fe, Zn e Mn nas raízes, enquanto para N e P nas raízes e N, P, Ca, Mg e Cu na parte aérea houve diferença significativa apenas para o fator espécie, pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro. O índice de translocação de Mn para a parte aérea também apresentou interação significativa entre os fatores. No entanto, mesmo em variáveis que apresentaram interação entre os fatores, foram apenas apresentadas as comparações entre as concentrações de Mn em cada espécie em função de serem mais interessantes para esse estudo.

Para a concentração e distribuição subcelular de Mn, houve interação significativa entre os fatores concentração de Mn x fração celular ( $p < 0,05$ ). Contudo, para essa variável foram apresentadas as comparações entre as concentrações de Mn e os compartimentos subcelular.

### 3.5.4 Produção de biomassa e taxas de crescimento

As menores produções de massa seca de parte aérea e total foram observadas na espécie *L. multiflorum* (Figuras 4A e 4C, respectivamente), enquanto a maior massa seca de raiz foi observada para a espécie *P. notatum* (Figura 4A). Com relação ao excesso de Mn, as maiores produções de massa seca de raízes e de parte aérea (Figura 4B) e massa seca total das plantas (Figura 4D) foram observadas na concentração de 300  $\mu\text{M}$  de Mn. Entretanto, a massa seca de raízes, parte aérea e do total da planta diminuíram com a concentração de 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figuras 4B e 4D, respectivamente).

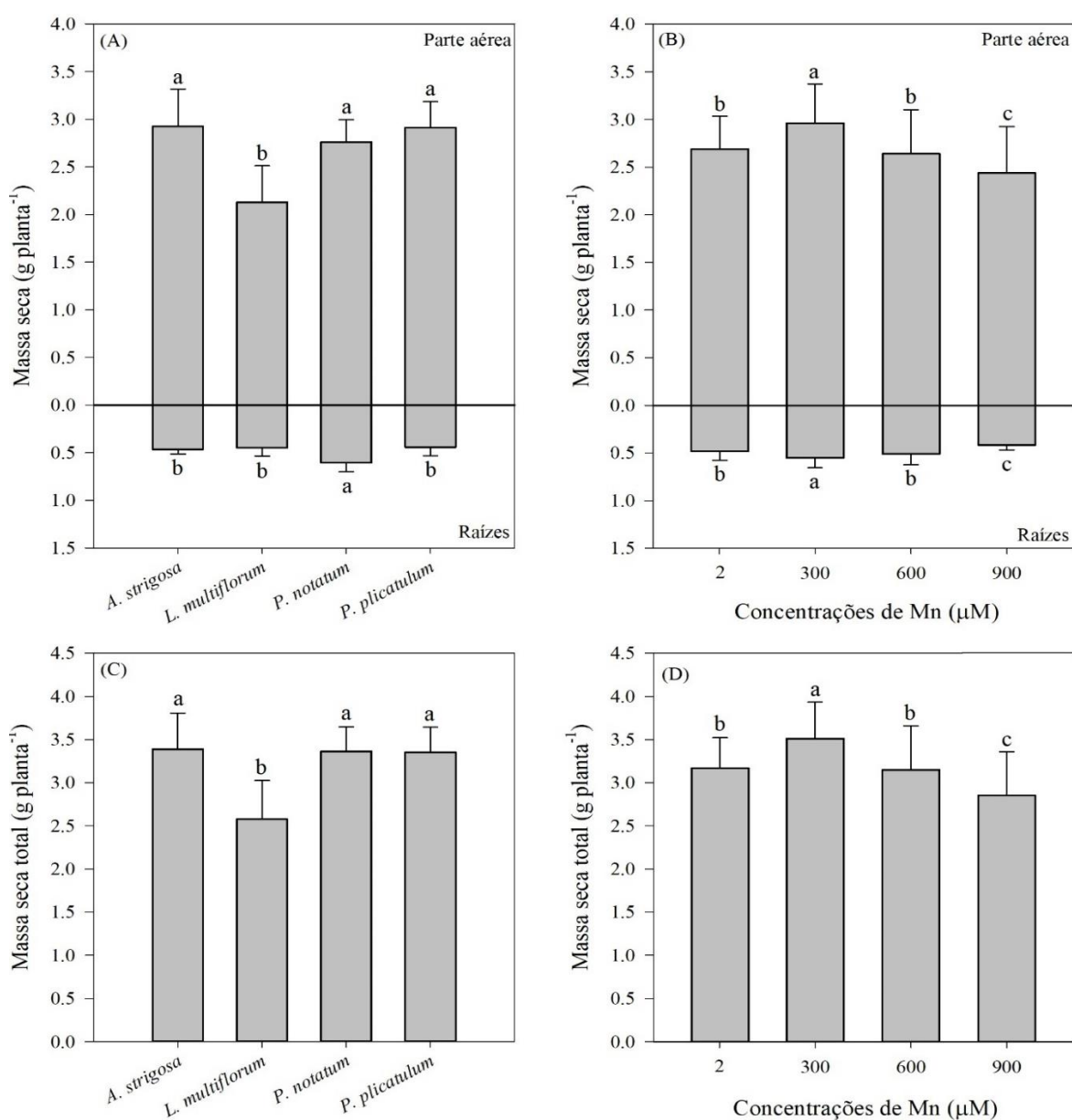


Figura 4. Massa seca de raízes, parte aérea e total (g planta<sup>-1</sup>) de gramíneas de cobertura de solo significativos para o fator espécie (A, C) e concentrações de Mn (B, D). \*Medias seguidas pelas mesmas letras dentro de cada fator não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

As maiores taxas de crescimento absoluto (TCA<sub>b</sub>) foram observadas em 300 e 600  $\mu\text{M}$  de Mn para *A. strigosa* e em 300  $\mu\text{M}$  para *P. plicatum* (Figura 5A). Os menores valores de TCA<sub>b</sub> em *L. multiflorum* foram observados com 600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figura 5A). Por outro lado, as taxas de crescimento relativo (TCR) foram menores em *L. multiflorum* na presença de 900  $\mu\text{M}$ , enquanto foram maiores em *P. plicatum* com 300  $\mu\text{M}$  de Mn (Figura 5B).

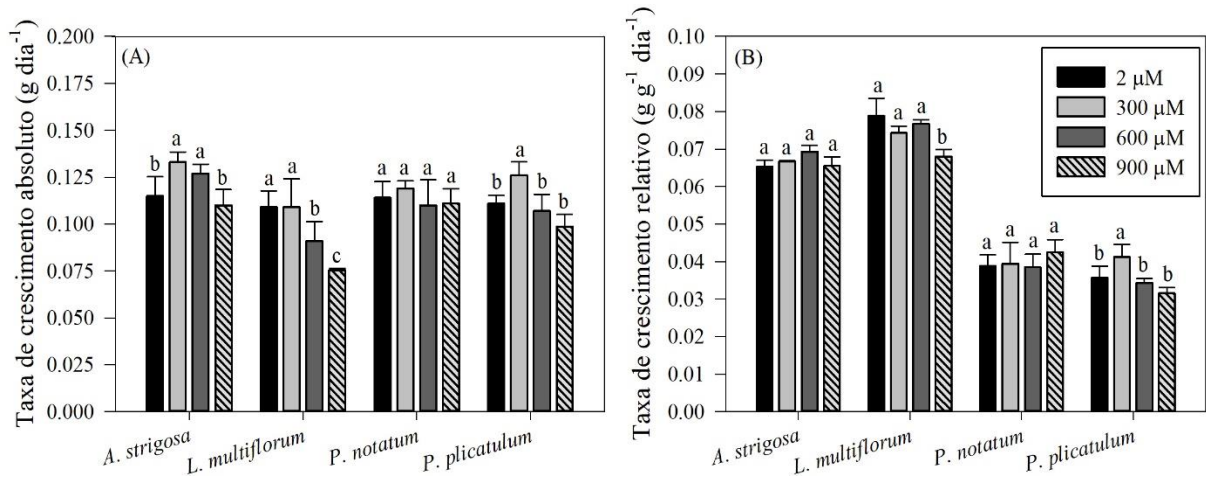


Figura 5. Taxa de crescimento absoluto – g dia<sup>-1</sup> (A) e relativo – g g<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

### 3.5.5 Concentração de nutrientes nas raízes e parte aérea

As concentrações de Mn nas raízes e parte aérea das gramíneas aumentaram com o aumento da concentração do metal na solução nutritiva (Figura 6). As maiores concentrações foram observadas na parte aérea. Entretanto, nas raízes de *A. strigosa* e *L. multiflorum* houve concentração de Mn com valores superiores à 1.500 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 6A).

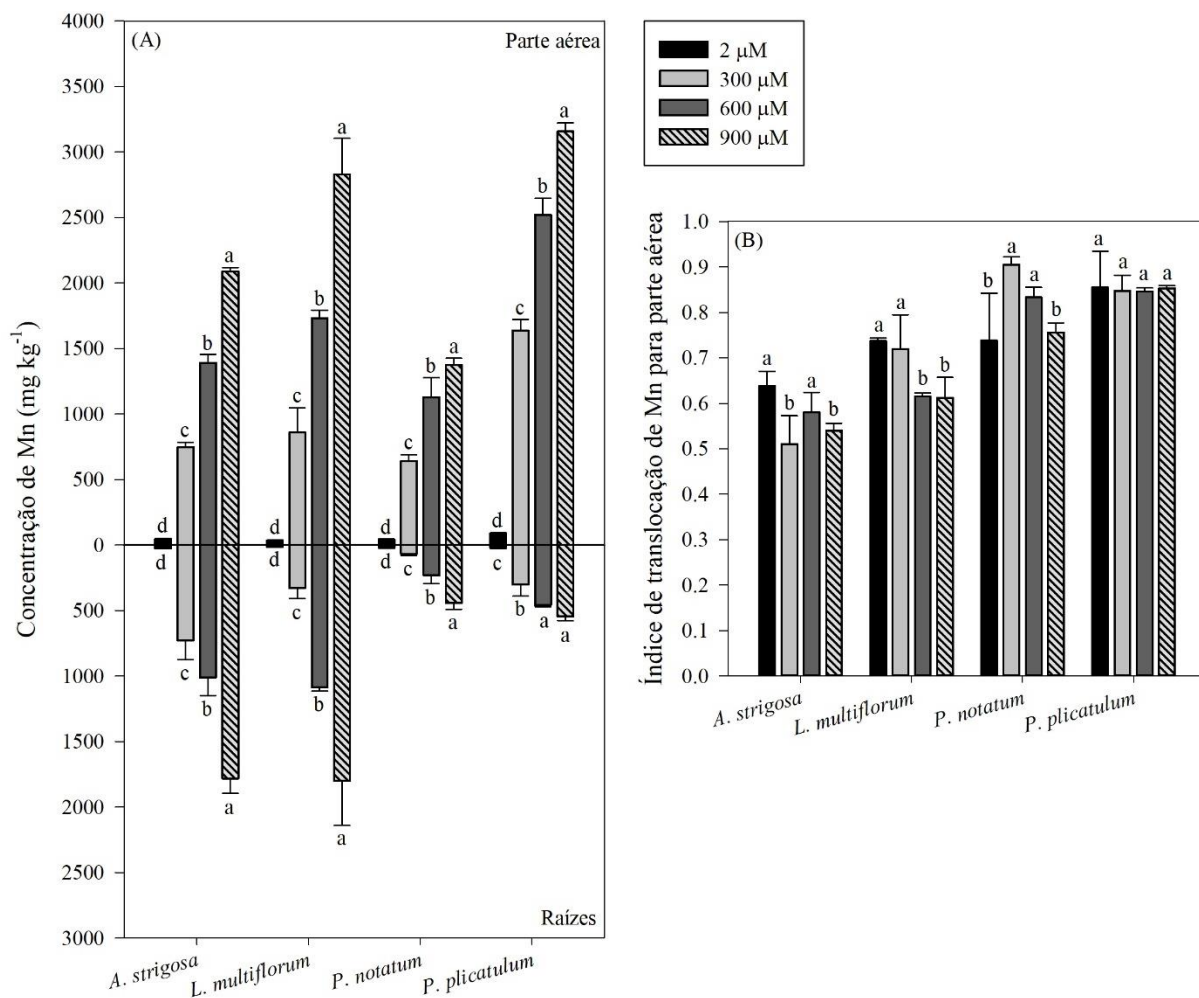


Figura 6. Concentrações de Mn em raízes e parte aérea (A) e índice de translocação de Mn para parte aérea (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900 µM). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

As concentrações de Mn na parte aérea de todas as gramíneas aumentaram com o incremento das concentrações do metal na solução nutritiva (Figura 6A). O *P. plicatum* apresentou maior capacidade de concentrar Mn nos tecidos da parte aérea, atingindo valores médios de 3.156,8 mg kg<sup>-1</sup> na maior concentração de Mn (Figura 6A).

Os maiores valores de índices de translocação de Mn para a parte aérea foram observados na *A. strigosa* com 2 e 600 µM, no *L. multiflorum* com 2 e 300 µM e no *P. notatum* com 300 e 600 µM de Mn (Figura 6B). Esse índice demonstra que a maior proporção do Mn absorvido pelas plantas é translocado para a parte aérea, principalmente, nas espécies nativas. O *P. plicatum*, por exemplo, apresentou translocação para a parte aérea de mais de 80% de todo o Mn absorvido pela planta (Figura 6B).

O excesso de Mn não alterou as concentrações de N e P nas raízes e parte aérea, e Ca e Mg na parte aérea. Entretanto, na presença de 300 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn, houve aumento da concentração de Ca nas raízes de *A. strigosa* e de Mg em *P. plicatum* na presença de 300 e 600  $\mu\text{M}$  de Mn (Tabela 1). As concentrações de K diminuíram na parte aérea de *A. strigosa* com aumento das concentrações de Mn, já em *L. multiflorum* isso só ocorreu com 300  $\mu\text{M}$ . A concentração de K aumentou nas raízes de *L. multiflorum* na presença de 300 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Zn na parte aérea e raízes de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ).

Nutrientes	Concentração de Mn ( $\mu\text{M}$ )	<i>A. strigosa</i>		<i>L. multiflorum</i>		<i>P. notatum</i>		<i>P. plicatum</i>	
		Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
g kg <sup>-1</sup>									
N	2	22,75	40,31	24,11	45,20	15,40	25,15	23,39	23,87
	300	26,20	39,01	23,34	43,73	13,32	23,23	25,24	23,99
	600	26,49	38,02	26,33	44,48	14,02	24,31	23,38	24,78
	900	25,10	35,66	26,21	43,66	15,30	25,07	23,79	23,61
P	2	6,74	6,30	5,26	8,43	4,15	5,31	6,69	5,81
	300	6,89	6,45	7,35	8,06	4,41	4,77	5,37	4,69
	600	7,96	5,45	6,91	7,81	4,77	4,86	5,35	5,02
	900	7,74	5,79	7,77	8,39	4,62	5,70	5,97	4,96
K	2	49,44 a	55,63 a	47,16 b	44,36 b	26,70 a	34,89 a	44,13 a	37,23 a
	300	49,63 a	51,20 b	51,37 a	50,73 a	24,30 a	32,72 a	44,27 a	39,61 a
	600	49,91 a	48,32 b	48,15 b	47,52 b	23,36 a	32,75 a	43,42 a	36,03 a
	900	47,09 a	48,79 b	54,34 a	46,44 b	26,62 a	31,28 a	43,66 a	36,62 a
Ca	2	2,42 b	5,18	1,04 a	6,16	0,53 a	2,79	0,92 a	3,30
	300	3,05 a	5,35	1,05 a	5,29	0,54 a	2,53	0,79 a	3,12
	600	2,34 b	4,31	1,30 a	5,78	0,58 a	2,67	0,81 a	3,04
	900	3,24 a	4,63	1,17 a	6,11	0,54 a	2,41	0,67 a	2,84
Mg	2	1,80 a	1,87	0,94 a	3,31	1,22 a	2,11	1,89 b	2,76
	300	1,79 a	2,05	0,80 a	2,58	1,05 a	2,09	2,18 a	2,28
	600	1,30 a	1,46	0,88 a	2,69	1,27 a	2,12	2,72 a	2,51
	900	1,48 a	1,59	1,03 a	3,04	1,10 a	2,01	1,49 b	2,18
mg kg <sup>-1</sup>									
Cu	2	67,56 a	10,08	47,95 d	21,01	14,85 a	8,64	38,00 a	9,87
	300	118,35 a	10,45	91,16 b	21,44	15,63 a	8,08	43,95 a	11,09
	600	103,41 a	10,08	75,52 c	20,80	18,40 a	8,77	34,88 a	10,13
	900	120,03 a	9,40	111,81 a	23,20	18,93 a	8,32	44,59 a	10,61
Fe	2	1893,47 b	359,92 a	1364,00 b	135,52 a	749,76 a	68,93 a	597,81 a	96,36 a
	300	2417,80 a	202,84 b	1161,60 b	98,76 a	893,20 a	80,08 a	475,79 a	90,64 a
	600	2315,72 a	124,08 c	1453,17 b	119,68 a	984,72 a	60,13 a	506,00 a	53,68 a
	900	1501,28 c	115,28 c	2221,41 a	48,84 a	731,57 a	65,41 a	666,75 a	64,53 a
Zn	2	74,13 a	54,21 a	49,52 b	81,07 d	26,56 a	41,55 a	101,57 a	56,72 a
	300	60,56 b	52,77 a	41,76 b	96,77 c	34,29 a	32,77 a	44,51 b	31,55 b
	600	48,75 c	52,72 a	46,48 b	112,97 b	26,67 a	33,47 a	43,89 b	32,29 b
	900	60,17 b	57,97 a	64,83 a	132,29 a	27,33 a	32,99 a	41,57 b	30,85 b

Os valores foram obtidos a partir das médias de três repetições referente a cada espécie de gramíneas de cobertura de solo. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie (coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Médias sem letras não apresentaram diferença significativa entre os fatores.

As concentrações de micronutrientes foram mais afetadas pelo excesso de Mn. As maiores concentrações de Cu nas raízes de *L. multiflorum* foram observadas quando cultivadas na solução nutritiva com 900  $\mu\text{M}$  de Mn, sendo que 2  $\mu\text{M}$  proporcionou a menor concentração de Cu no tecido. As concentrações de Fe diminuíram nas raízes de *A. strigosa* com a maior concentração de Mn, mas por outro lado, aumentou nas raízes de *L. multiflorum* (Tabela 1). No entanto, a concentração de Fe diminuiu na parte aérea de *A. strigosa* com as maiores concentrações de Mn (600 e 900  $\mu\text{M}$ ). A concentração de Zn nas raízes de *A. strigosa* e *P. plicatum* foi diminuída com o aumento das concentrações de Mn, mas, por outro lado, na presença da maior concentração de Mn houve aumento em *L. multiflorum* (Tabela 1). As concentrações de Zn na parte aérea de *L. multiflorum* aumentaram com o aumento das concentrações de Mn, mas por outro lado diminuiu em *P. plicatum* (Tabela 1).

### 3.5.6 Distribuição subcelular de Mn

A concentração de Mn aumentou em todas as frações subcelulares nas raízes e folhas em todas as espécies (Figura 7A). As concentrações de Mn aumentaram significativamente na parede celular, núcleos e plastídios, mitocôndrias e vacúolos das células das gramíneas na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn, em comparação ao controle (2  $\mu\text{M}$  de Mn). Na presença de 2  $\mu\text{M}$  de Mn na solução nutritiva, as maiores concentrações de Mn foram observadas principalmente na parede celular e vacúolos de todas as gramíneas. Entretanto, com a mais alta concentração de Mn na solução nutritiva, as maiores concentrações de Mn foram observadas nos vacúolos das raízes e folhas de *A. strigosa* (Figura 7A), sendo esse compartimento responsável por compartimentalizar 52,48% e 54,39% do total de Mn nas células de cada órgão, respectivamente (Figura 7B). Além disso, para essa gramínea, altas proporções de Mn também foram observadas na parede celular, contribuindo com 35,44% e 37,81% do Mn concentrado em raízes e folhas, respectivamente (Figura 7A e 7B).



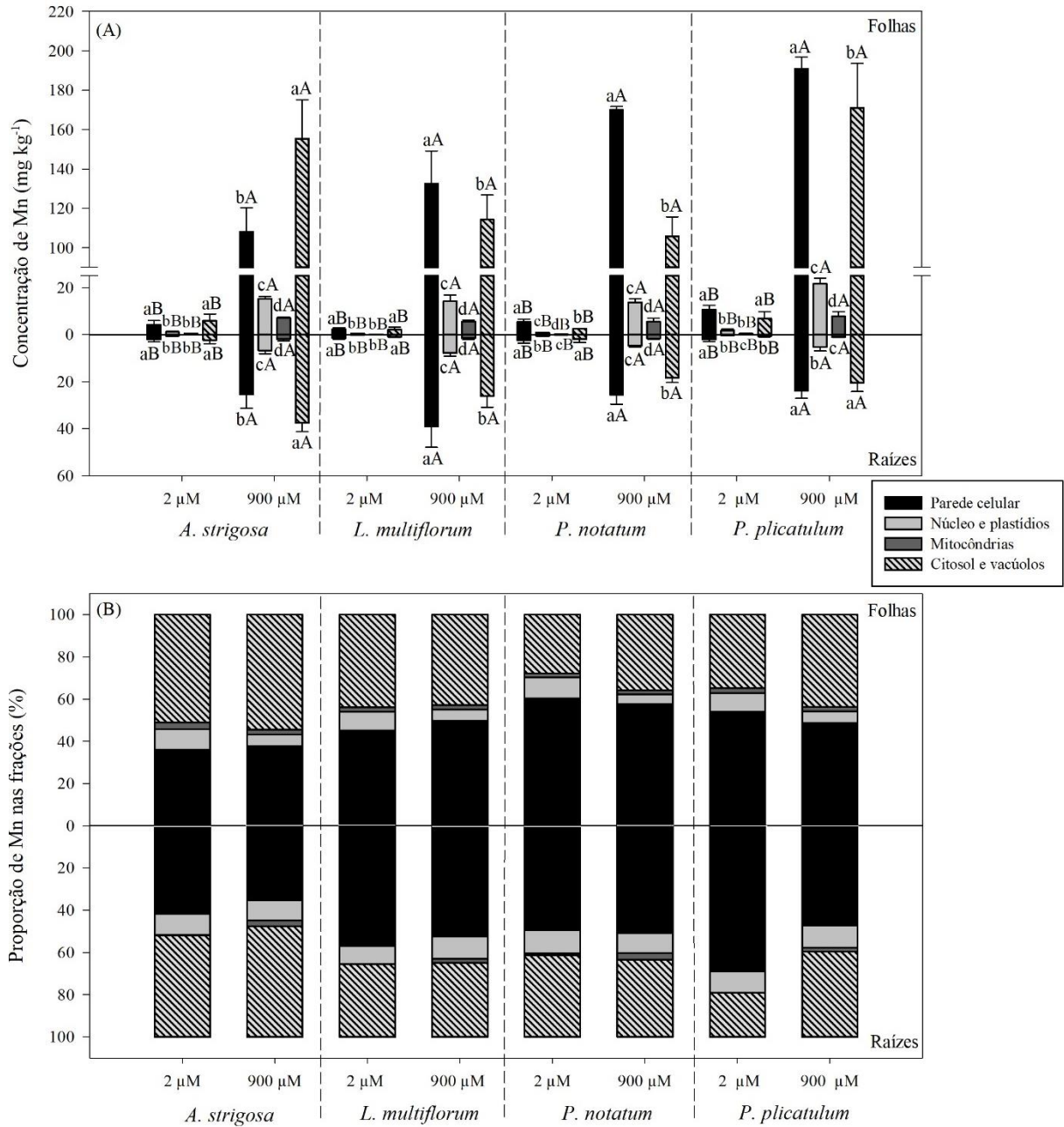


Figura 7. Concentrações de Mn em diferentes compartimentos subcelulares (A) e proporção de Mn armazenado em cada fração celular (B) de raízes e folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com 2 e 900  $\mu\text{M}$ . \*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre concentração de Mn dentro de cada compartimento subcelular e minúscula entre compartimento subcelular dentro de cada concentração de Mn não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão. Linhas pontilhadas separam cada espécie com 2 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn.

Para *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum* cultivadas com 900  $\mu\text{M}$  de Mn, as maiores concentrações de Mn foram observadas na parede celular, tanto em células de raízes como nas folhas (Figura 7A). Para essas gramíneas, a concentração na parede celular correspondeu a 52,51%, 50,80% e 47,15% nas raízes e 49,73%, 57,65% e 48,78% nas folhas do total de Mn, respectivamente (Figura 7B). Nas raízes de *P. plicatulum* as concentrações de



Mn entre parede celular e vacúolos não diferiram significativamente. As concentrações de Mn nos vacúolos foram ligeiramente menores do que as parede celular (Figura 7A). Entretanto, na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn, as menores concentrações de Mn subcelular nas raízes e folhas para todas as gramíneas foram verificadas na fração mitocondrial, seguido pela fração de núcleos e plastídios. Assim, a fração mitocondrial foi a que apresentou menor proporção de Mn, com valores médios não ultrapassando 5% do total concentrado.

### 3.5.7 Trocas gasosas

As respostas fisiológicas relacionadas às trocas gasosas das gramíneas apresentaram grande variabilidade em relação às concentrações de Mn. A taxa fotossintética líquida ( $A$ ) e eficiência de carboxilação instantânea da rubisco ( $A/C_i$ ) foram afetadas negativamente na espécie de *L. multiflorum* na presença de 600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figuras 8A e 8C). Em *P. plicatulum* cultivadas com 2 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn foram observados os menores valores de  $A$  e  $A/C_i$ . Entretanto, os maiores valores de  $A$  e  $A/C_i$  foram verificados na presença de 300  $\mu\text{M}$  de Mn. As demais espécies não apresentaram diminuição dessas variáveis com o excesso de Mn (Figura 8A e 8C).

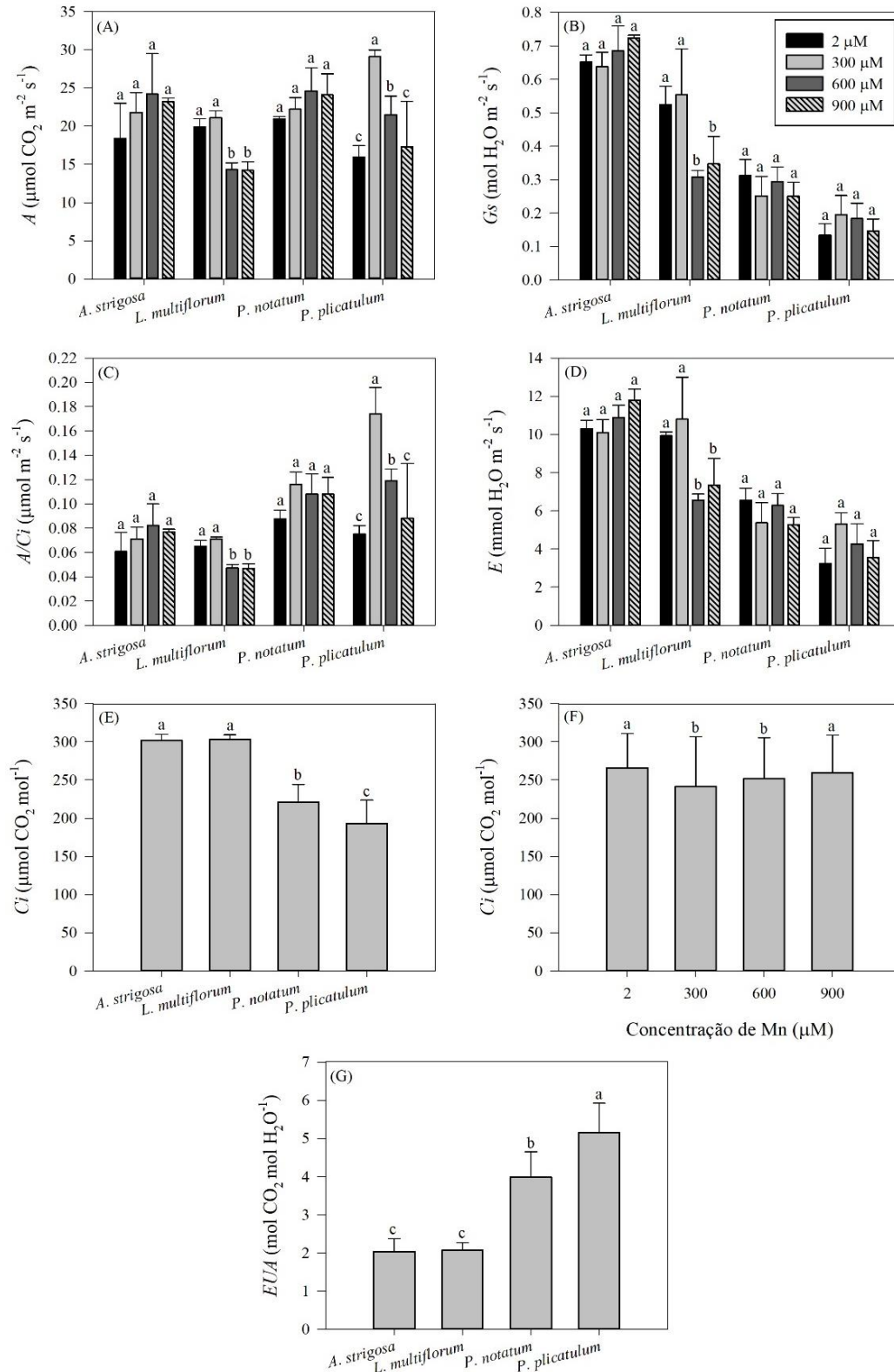


Figura 8. Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), condutância estomática -  $G_s$  (B), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (C), taxa de transpiração -  $E$  (D), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (E, F) e eficiência do uso da água -  $EUA$  (G) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie ou em cada fator não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

A condutância estomática ( $G_s$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ) diminuíram em *L. multiflorum* na presença de 600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figuras 8B e 8D, respectivamente). As maiores concentrações intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) foram observados nas espécies exóticas (*A. strigosa* e *L. multiflorum*) expostas aos tratamentos de 2 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figura 8E e 8F). Por outro lado, as espécies exóticas foram menos eficientes no uso da água, sendo a espécie de *P. plicatulum* mais eficiente (Figura 8G).

### 3.5.8 Análises bioquímicas

As maiores concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram observadas nas folhas de *A. strigosa* cultivadas com 300 e 600  $\mu\text{M}$  de Mn e em menor concentração nas raízes com 300  $\mu\text{M}$ . Em raízes de *L. multiflorum* foram observadas maiores concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de 300 e 600  $\mu\text{M}$  de Mn (Figuras 9A). A maior peroxidação lipídica ocorreu com 300  $\mu\text{M}$  de Mn nas raízes de *A. strigosa* e *L. multiflorum* e com 600 e 900  $\mu\text{M}$  nas folhas de *L. multiflorum* e *P. plicatulum* (Figura 9B).

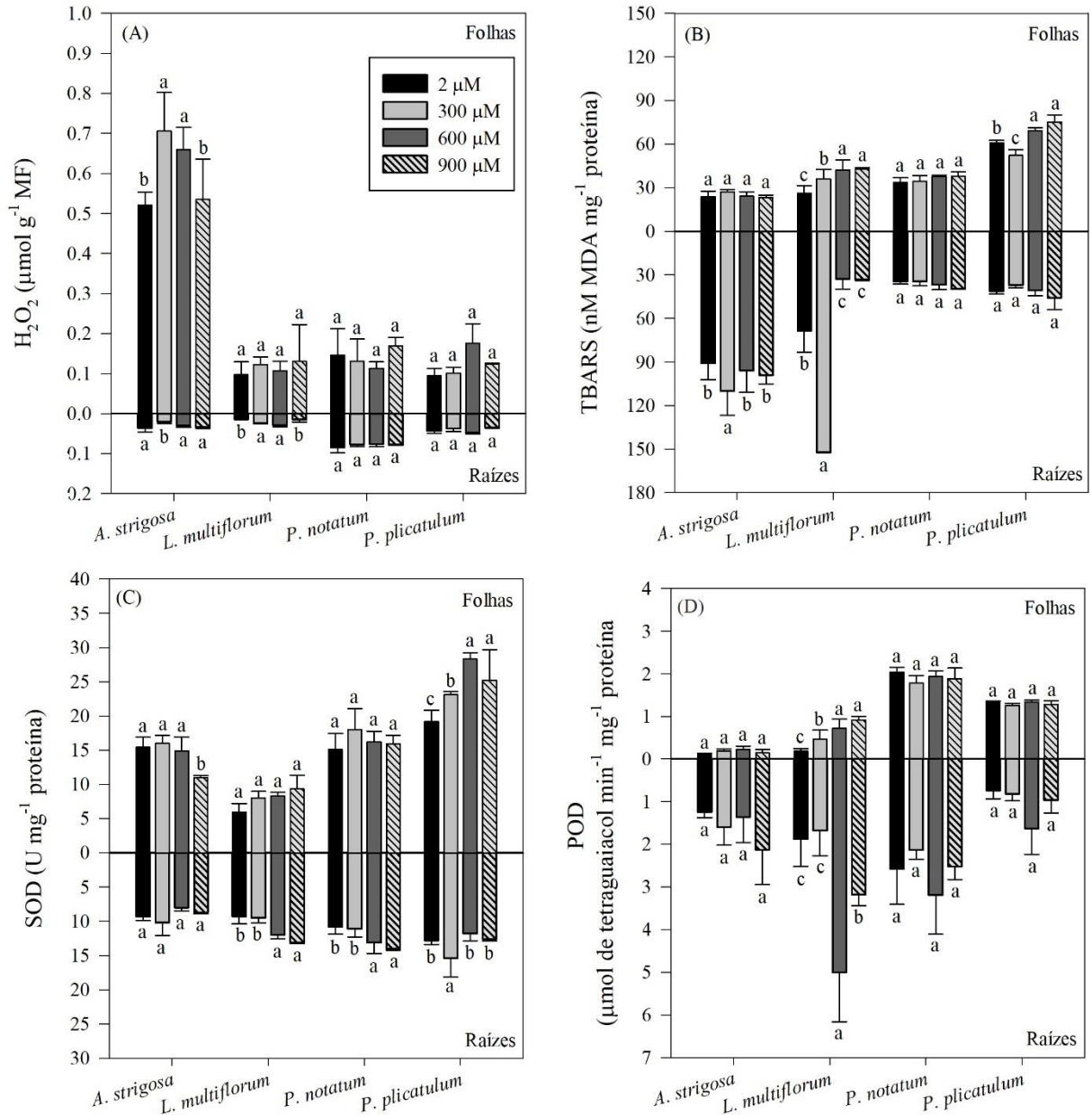


Figura 9. Concentrações de peróxido de hidrogênio – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) e malondialdeído -TBARS (B); e atividade enzimática da Superóxido Dismutase – SOD (C) e Guaiacol Peroxidase – POD (D) em raízes e folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900 μM). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

A atividade enzimática da SOD nas folhas de *A. strigosa* diminuiu na presença de 900 μM de Mn (Figura 9C). A atividade da SOD aumentou nas raízes de *L. multiflorum* e *P. notatum* e nas folhas de *P. plicatulum* com 600 e 900 μM de Mn e com 300 μM nas raízes de *P. plicatulum* (Figura 9C). Nós destacamos que em *P. plicatulum* os menores valores de atividade da SOD foram observados com o controle (2 μM). A atividade da enzima POD aumentou nas

raízes de *L. multiflorum* na presença de 600  $\mu\text{M}$  de Mn e nas folhas com 600 e 900  $\mu\text{M}$  (Figura 9D).

### 3.5.9 Pigmentos fotossintéticos

As concentrações dos pigmentos fotossintéticos foram alteradas apenas nas espécies de *L. multiflorum* e *P. plicatulum*. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides diminuíram nas folhas de *L. multiflorum* em todas as concentrações com excesso de Mn, quando comparado ao controle (Figura 10A-10D). No entanto, para o *P. plicatulum*, foram observados diminuição da concentração de clorofila *a* na presença de 300 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn, quando comparado ao controle. Por outro lado, as concentrações de clorofila *b*, clorofila total e carotenoides foram significativamente maiores na presença de 600  $\mu\text{M}$  de Mn (Figura 10B-10D).

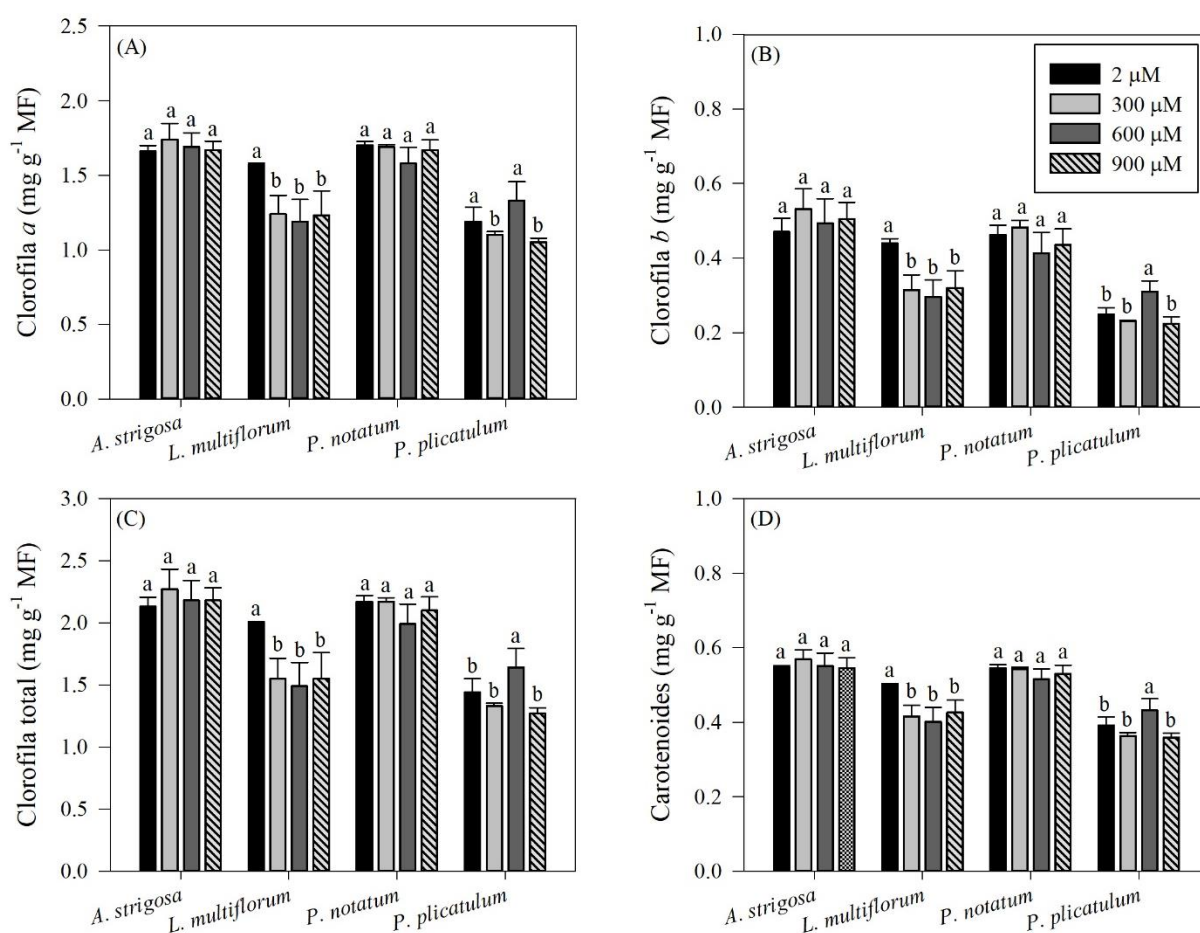


Figura 10. Concentração de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D), de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

### 3.5.10 Densidade estomática

Os efeitos dos tratamentos de Mn diferiram na densidade estomática das epidermes foliares das quatro gramíneas, porém sendo mais marcantes na epiderme adaxial. Na epiderme abaxial de folhas de *A. strigosa* e *P. plicatulum*, observou-se maior densidade estomática na presença de 300 e 600  $\mu\text{M}$  de Mn, respectivamente (Figura 11A). A densidade estomática adaxial das folhas não foi alterada pelas concentrações de Mn em *A. strigosa*, mas aumentou em *L. multiflorum* na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn. Em *P. notatum* e *P. plicatulum* cultivadas com excesso de Mn foram observadas aumento da densidade estomática na epiderme adaxial, quando comparado ao controle (Figura 11A). Desse modo, a densidade estomática total das folhas correlacionou-se fortemente com a densidade estomática adaxial, onde foi aumentada em *L. multiflorum* na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn, bem como aumentou em *P. notatum* e *P. plicatulum* com o aumento das concentrações de Mn. Por outro lado, a densidade estomática total diminuiu em *A. strigosa* na presença de 600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figura 11B).

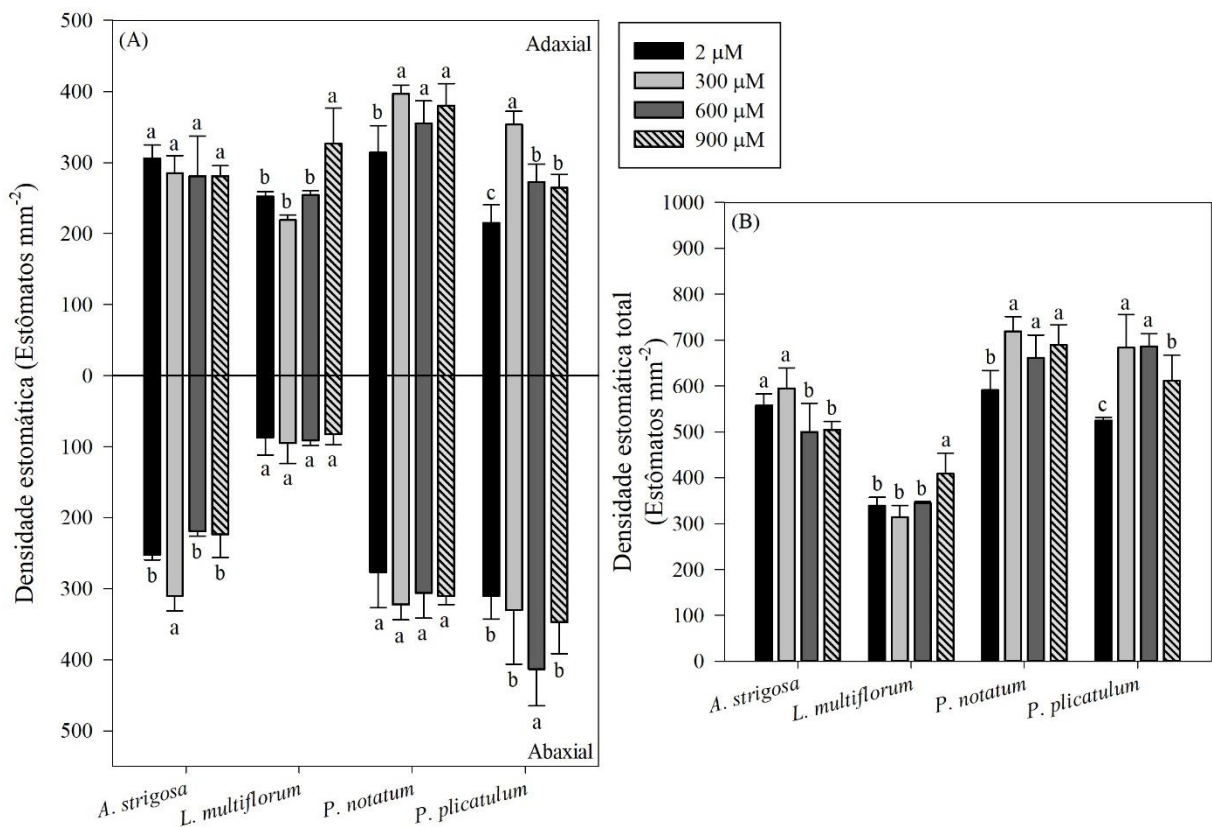


Figura 11. Densidade estomática da epiderme abaxial (A), adaxial (B) e total (C) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão. Adaxial: Epiderme adaxial. Abaxial: Epiderme abaxial.

### 3.5.11 Biometria do sistema radicular

As gramíneas exóticas apresentaram maiores médias para a maioria das variáveis biométricas do sistema radicular em relação às espécies nativas (Figura 12). Assim, o maior comprimento total e volume superficial total de raízes foram observados em *A. strigosa* com 300  $\mu\text{M}$  de Mn e em *L. multiflorum* com 900  $\mu\text{M}$  (Figuras 12A e 12B). O mesmo resultado foi observado para volume radicular, porém, para *A. strigosa* a concentração de 300  $\mu\text{M}$  de Mn não diferiu significativamente de 900  $\mu\text{M}$  (Figura 12C).

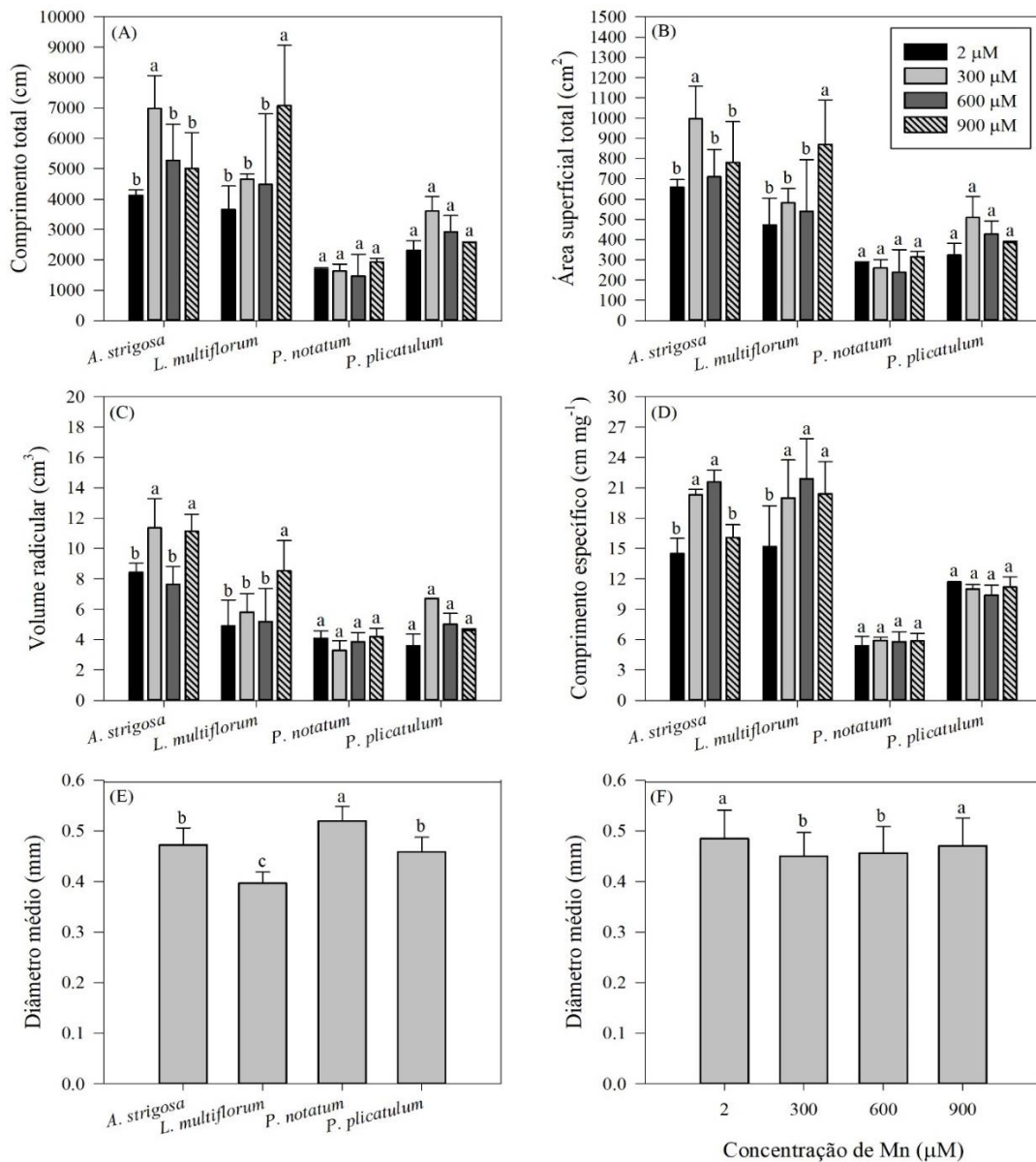


Figura 12. Comprimento total (A), área superficial total (B), volume radicular (C), comprimento específico radicular (D) e diâmetro médio (E, F) de raízes de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Mn (2, 300, 600 e 900  $\mu\text{M}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre concentração de Mn dentro de cada espécie ou em cada fator não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.



Os maiores valores de comprimento radicular específico foram observados em *A. strigosa* cultivadas com 300 e 600  $\mu\text{M}$  de Mn e em *L. multiflorum* em todas as concentrações de Mn, quando comparado ao controle (Figura 12D). As variáveis da biometria radicular nas espécies nativas não apresentaram diferenças significativas em relação às concentrações de Mn. Os maiores valores de diâmetro médio foram observados em *P. notatum* e menores em *L. multiflorum* (Figura 12E). Os menores valores de diâmetro médio foram observados na presença de 300 e 600  $\mu\text{M}$  de Mn, quando comparado ao controle (Figura 12F).

### 3.6 DISCUSSÃO

Na maioria das gramíneas, o pH da solução nutritiva diminuiu ao longo do tempo, demonstrando que a disponibilidade do Mn se manteve alta. A acidificação da solução nutritiva pode ter acontecido por causa da absorção de cátions em relação aos ânions (TOMASI et al., 2014). Por exemplo, absorção predominante de nitrogênio na forma de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) causa acidificação da rizosfera, podendo estimular a diminuição do pH da solução nutritiva (MARSCHNER, 2012). Além disso, no geral, o processo de absorção de nutrientes é dependente da formação de um gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$  que, conseqüentemente, acidifica a rizosfera (MARSCHNER, 2012).

A exsudação de vários compostos orgânicos pelas raízes das plantas é uma das estratégias de tolerância ao excesso de metais (JAVED et al., 2021). As plantas exsudam diversos compostos orgânicos que também podem liberar  $\text{H}^+$  para a rizosfera e podem modificar a biodisponibilidade dos metais pesados a partir da complexação desses elementos (DE CONTI et al., 2020). Para tanto, dentre os principais componentes exsudados estão os ácidos orgânicos de baixo peso molecular como fenóis, ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares, cuja exsudação pode ser aumentada em função da toxicidade por metais (DE CONTI et al., 2020). Entretanto, a exsudação de compostos orgânicos em condições de toxidez pode reduzir a disponibilidade de carbono para o incremento de biomassa nas plantas (TIZIANI et al., 2020).

O pH da solução nutritiva foi variável entre as espécies nativas e exóticas, sendo que nas nativas a acidificação foi mais relevante. O aumento do pH observado em *A. strigosa* e *L. multiflorum* na maior concentração de Mn (Figura 1A e 1B) pode ser uma estratégia de defesa da planta ao excesso de Mn, pois em condições de pH mais elevado ocorre menor disponibilidade desse micronutriente (FERNANDES; SOUZA; SANTOS, 2018). Por outro lado, as gramíneas *P. notatum* e *P. plicatulum* aparentemente não usaram a alteração do pH da rizosfera como estratégia para a diminuição da disponibilidade de Mn.



O Mn é absorvido pelas raízes principalmente na forma  $Mn^{+2}$  e em função de ser um metal pesado, o seu excesso nos tecidos foliares pode se tornar um fator limitante para as plantas, afetando a produção e qualidade de diversas culturas (LI et al., 2019). O excesso de Mn provoca toxicidade que resulta em redução do crescimento e desenvolvimento das plantas, pois afeta diversos processos fisiológicos, como inibição fotossintética, formação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam danos oxidativos, inibição da atividade de várias enzimas e comprometimento da absorção e transporte de outros nutrientes minerais (LI et al., 2010; MILLALEO et al., 2010), assim como obtidos no presente estudo.

Na espécie de *L. multiflorum* foram observados sintomas visuais de toxicidade com as concentrações de 600 e 900  $\mu M$  de Mn (Figura 2), sendo caracterizados por manchas necróticas marrons e distribuição desigual de clorofilas nas folhas mais velhas, que normalmente começam a aparecer nas bordas das folhas, sendo que em casos mais severos também pode ocorrer escurecimento das raízes (HUANG et al., 2019; KABATA-PENDIAS, 2010; SANTOS et al., 2017). No presente estudo, o sistema radicular das gramíneas não apresentou escurecimento com o excesso de Mn. A manifestação de sintomas visuais causados pela toxicidade de um metal é o resultado de uma cadeia de eventos que resultam em modificações celulares e alterações na epiderme foliar, apresentando sintomas característicos (LAVRES JUNIOR et al., 2010).

A sensibilidade das plantas ao excesso de Mn é variável entre espécies e genótipos, pois a toxicidade pode afetar a atividade de enzimas, fitohormônios e síntese de aminoácidos, sendo que os cereais, leguminosas e batata são as plantas cultivadas mais sensíveis ao excesso de Mn (KABATA-PENDIAS, 2010). As manchas cloróticas e necróticas ocorrem em maior proporção nas bordas das folhas porque o Mn é transportado através do fluxo de transpiração foliar (PAGE; LE BAYON; FELLER, 2006). Além disso, as lesões necróticas de cor púrpura escuras, que são interpretadas como um estresse, ocorrem por causa da toxicidade de Mn ser mediada principalmente no apoplasto (FERNANDO e LYNCH, 2015) e geralmente essas manchas marrons são o resultado da presença de Mn oxidado e polifenóis (FARIA et al., 2020). De maneira geral, as gramíneas de cobertura de solo apresentaram diferentes respostas em relação às concentrações de Mn, sendo que apenas a espécie de *L. multiflorum* apresentou sintomas visuais de toxicidade com as concentrações de 600 e 900  $\mu M$  de Mn (Figura 2).

Diversas espécies de plantas que são cultivadas em ambientes contaminados por metais pesados podem sobreviver e concentrar elevadas concentrações dos elementos nos tecidos (ZHANG et al., 2010). A concentração de Mn nos tecidos de raízes e parte aérea tende a aumentar com o aumento das concentrações de Mn, sendo que a maior concentração

normalmente é observada nas folhas (XIAO et al., 2020), fato que corrobora com os resultados observados para todas as espécies de gramíneas do presente estudo, que aumentaram a concentração de Mn na parte aérea conforme o aumento da concentração na solução nutritiva.

As espécies de gramíneas apresentaram elevadas concentrações de Mn nos tecidos, sendo maiores de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca já na presença de  $300 \text{ }\mu\text{M}$  de Mn (Figura 6A). Concentrações de Mn nos tecidos acima de  $400\text{-}500 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca são tóxicas para muitas espécies cultivadas. Entretanto, algumas espécies podem apresentar elevadas concentrações do elemento sem apresentar sintomas visuais de toxicidade (FERNANDES; SOUZA; SANTOS, 2017; MAGRI et al., 2020; MARSCHNER, 2012). No presente estudo, somente o *L. multiflorum* apresentou sintomas visuais de toxicidade em 27 dias de exposição (Figura 2), enquanto as espécies *A. strigosa*, *P. notatum* e *P. plicatum*, mesmo com concentrações de Mn acima dos níveis críticos, não apresentaram sintomas visuais neste período. Isso demonstra que essas espécies apresentam mecanismos de defesa capazes de tolerar o excesso de Mn.

Um mecanismo de tolerância das plantas ao estresse por metais pesados pode ser a distribuição subcelular desses elementos, diminuindo a sua presença em locais metabolicamente ativos e armazenamento em compartimentos ou organelas menos ativas (XIN et al., 2013; ZHAO et al. 2015). Algumas dessas estratégias de tolerância é manter o elemento em uma forma não tóxica à célula, onde normalmente, o excesso do metal é ligado a parede celular ou compartimentalização em vacúolos (GU et al., 2022; SHAO et al., 2017; ZHANG et al., 2010).

As maiores concentrações de Mn observadas na parede celular (seguido pelos vacúolos) nas espécies de *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum* (Figura 7), podem ser atribuídas como um mecanismo das plantas para aliviar os efeitos tóxicos de metais pesados. Isso ocorre por causa da parede celular ser uma estrutura rica em polissacarídeos e proteínas em menor concentração, mas que fornecem grupos carboxila, hidroxila e outros grupos funcionais que participam da adsorção, troca iônica ou complexação, fazendo com que a entrada de íons metálicos no protoplasma seja limitada (FU et al., 2011). A compartimentação de metais na parede celular já foi relatada em outras culturas como *Vitis vinífera* (YAO et al., 2012) e *Macleaya cordata* (PAN et al., 2019), permitindo o acúmulo de elevadas concentrações de Mn em condições de excesso do elemento. Além disso, os resultados obtidos estão de acordo com Xiao et al. (2020), onde observaram elevadas concentrações de Mn na parede celular e vacúolos de plantas de *Cleome viscosa* L. cultivadas com excesso de Mn.

Na *A. strigosa*, as maiores concentrações de Mn foram observadas nos vacúolos (Figura 7). Esse mecanismo de tolerância pode ser atribuído pela presença de ácidos orgânicos e açúcares nos vacúolos que atuam como ligantes, quelando os metais e reduzindo sua toxicidade e interferência sobre processos fisiológicos e bioquímicos em locais mais reativos na célula vegetal (WANG et al., 2015; XIAO et al., 2020; YANG et al., 2018). Diante disso, parede celular e vacúolo são dois compartimentos celulares que desempenham funções fundamentais para reduzir a toxicidade e apresentar tolerância ao excesso de Mn (GU et al., 2022; XIAO et al., 2020).

A presença de altas concentrações de metais nos tecidos não significam alta fitotoxicidade, pois os metais podem ser convertidos em outros produtos químicos menos reativos que apresentam menor fitotoxicidade (XIAO et al., 2020). Esses resultados concordam com os encontrados no presente estudo, onde houve elevadas concentrações de Mn nos tecidos, porém, sem influenciar de maneira muito expressiva sobre o crescimento. Essa resposta de tolerância ocorreu em função da parede celular e dos vacúolos armazenarem juntas mais de 80% do Mn presente nos tecidos de raízes e folhas de todas as espécies de gramíneas. Entretanto, mesmo concentrando altas concentrações de Mn nessas organelas e nos tecidos, o *L. multiflorum* foi a única espécie que apresentou sintomas visuais de toxicidade com maiores concentrações de Mn (600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn).

Entre os mais variados distúrbios fisiológicos que podem ser causados pelo excesso de Mn, salienta-se a absorção de outros nutrientes pelas plantas. A concentração de K foi diminuída nas folhas de *A. strigosa* com excesso de Mn e em *L. multiflorum* com 600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Tabela 1), o que pode ajudar a justificar algumas das respostas obtidas em relação a taxa de crescimento e fotossíntese, visto que o K está envolvido em diversos processos metabólicos e no crescimento das plantas (MEGDA e MONTEIRO, 2010).

Muitas vezes a toxicidade de Mn pode estar vinculada com deficiência de outros nutrientes, como Fe, Ca, Mg ou Zn (ZANÃO JÚNIOR et al., 2010). Porém, os sintomas visuais das deficiências desses nutrientes não foram observados nas folhas de *L. multiflorum*, pois na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn houve aumento da concentração de Zn em raízes e parte aérea, bem como de Fe nas raízes, enquanto para Ca e Mg não houve diferença entre as gramíneas. Devido o Mn apresentar raio iônico similar ao Ca e Mg, ele pode substituir parcialmente esses cátions e alterar as suas respectivas funções (MARSCHNER et al., 2012). Cabe ainda destacar que a concentração de Cu teve um aumento nas raízes de *L. multiflorum* com o aumento das concentrações de Mn, alcançando valores superiores a 100  $\text{mg kg}^{-1}$  na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Tabela 1). A concentração de Cu, de maneira geral, ocorreu especialmente nas raízes.

De maneira geral, o excesso de Mn influenciou mais expressivamente a absorção e acúmulo dos micronutrientes. Dentre estes, o Zn, seguido pelo Fe, foram os mais afetados pelo excesso de Mn e com diferentes respostas para cada espécie de gramínea estudada. Em *L. multiflorum* houve aumento da concentração de Zn nos tecidos na presença de 900  $\mu\text{M}$  de Mn, por outro lado, observou-se diminuição nas raízes de *A. strigosa* e nas raízes e parte aérea de *P. plicatulum*. Esses resultados podem ser atribuídos pela similaridade iônica entre os cátions, promovendo competição pela mesma proteína transportadora durante o processo de absorção, sem haver necessariamente transportador específico para cada nutriente (KABATA-PENDIAS, 2010).

A espécie de *P. notatum* não apresentou alterações da concentração de nutrientes nos tecidos, quando cultivada com o excesso de Mn. Isso demonstra que mesmo apresentando elevadas concentrações de Mn nos tecidos, as plantas apresentaram mecanismos para manter a concentração dos demais nutrientes em níveis semelhantes ao controle. Assim, é possível destacar que a manutenção da concentração dos nutrientes nos tecidos e o armazenamento do excesso de Mn em compartimentos metabolicamente menos ativos, foram essenciais para não modificar as respostas fotossintéticas e bioquímicas, concentrações de pigmentos fotossintéticos, taxas de crescimento e biometria do sistema radicular de *P. notatum*. Portanto, essa espécie se mostra muito tolerante em condições de excesso de Mn.

As menores produções de matéria seca das gramíneas foram observadas na presença da concentração mais alta de Mn (900  $\mu\text{M}$ ), indicando que o excesso de Mn pode interferir no metabolismo da planta e gerar um impacto negativo no crescimento e, conseqüentemente, na produção de biomassa (HUANG et al., 2019; SHUAI, 2016). Por outro lado, a concentração de 300  $\mu\text{M}$  de Mn proporcionou um estímulo no crescimento e maior produção de biomassa, com respostas semelhantes às taxas de crescimento das espécies (Figura 4). Esse resultado demonstra que a biomassa das plantas pode aumentar até determinado nível e posteriormente reduzir com o aumento excessivo das concentrações de Mn (PAN et al., 2019; XIAO et al., 2020).

Os maiores valores de  $\text{TCA}_b$  e TCR observadas com a concentração de 300  $\mu\text{M}$  de Mn indicam que houve aumento da velocidade de crescimento para a maioria das espécies estudadas em relação ao controle ou não diferiu da mesma (Figura 5). Por outro lado, a diminuição da  $\text{TCA}_b$  e TCR na maior concentração de Mn para *L. multiflorum* indica maior sensibilidade da espécie ao excesso de Mn, a qual é comprovada pelos demais resultados de respostas fisiológicas e bioquímicas obtidas nesse estudo.

A diminuição da produção de biomassa e taxas de crescimento nas espécies de *L. multiflorum* e *P. plicatulum* podem ser atribuídas pelas respostas fisiológicas encontradas nas trocas gasosas da folha relacionadas ao metabolismo do carbono, especialmente pela redução da taxa fotossintética líquida nas maiores concentrações de Mn (Figura 8). Portanto, para que exista crescimento e produção de biomassa, as trocas gasosas da folha com o ambiente e, conseqüentemente, a fotossíntese são essenciais para as plantas, sendo que o estresse por metais pesados pode inibir o processo de fotossíntese em função de danos que podem ser causados no centro de reação do PSII (RIBERA et al., 2013).

Os valores da taxa fotossintética líquida e eficiência de carboxilação instantânea da rubisco nas folhas de *P. plicatulum* apresentaram um estímulo nas respostas fisiológicas com 300  $\mu\text{M}$  de Mn, mas posteriormente estas foram reduzidas em concentrações mais elevadas (Figura 8). Contudo, é importante destacar que mesmo reduzindo esses parâmetros da fotossíntese na presença das maiores concentrações de Mn, não houve diferença significativa em relação ao controle. Esses resultados sugerem que as trocas gasosas relacionadas ao metabolismo do carbono podem ser estimuladas pelo aumento da concentração do Mn, porém até certo nível, podendo apresentar níveis significativamente superiores ao tratamento controle (XIAO et al., 2020). No entanto, concentrações muito elevadas de Mn proporcionaram redução desses parâmetros fisiológicos (XIAO et al., 2020).

De maneira diferente, a diminuição da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, eficiência de carboxilação instantânea da rubisco e taxa de transpiração em *L. multiflorum* na presença de 600 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn (Figura 8), pode ser atribuído pelo excesso de Mn limitar a condutância estomática, afetando a absorção de  $\text{CO}_2$  e, conseqüentemente a fotossíntese e o crescimento da planta (KOYRO et al., 2013). Os resultados obtidos estão de acordo com Pan et al. (2018), onde os valores da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  e taxa de transpiração de *Xanthium strumarium* L. também foram diminuídos com o aumento da concentração de Mn. Além disso, o Mn é um elemento que desempenha função essencial na formação estrutural dos componentes fotossintéticos (PAN et al., 2018).

A concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) é um importante parâmetro para avaliar os aspectos fisiológicos e agrônômicos das plantas, pois normalmente estão relacionadas com a atividade fotossintética das plantas (SILVA et al., 2014). Geralmente o estresse por metais pesados, como Mn, pode resultar em alterações na estrutura e função do cloroplasto, desequilíbrio na atividade de enzimas, redução da concentração de clorofila e, conseqüentemente, inibição fotossintética (BHADURI e FULEKAR, 2012; HAN et

al., 2006), o que justifica os resultados encontrados na espécie de *L. multiflorum*, onde houve redução da concentração de clorofilas (Figura 10) e da taxa fotossintética líquida (Figura 8A) na presença de excesso de Mn.

A concentração de pigmentos fotossintéticos na espécie de *P. plicatulum* inicialmente aumentaram até certo ponto e posteriormente reduziram com o aumento da concentração de Mn (Figura 10). Esses resultados indicam que o incremento de baixas concentrações de Mn promove a síntese de clorofila e potencial aumento da fotossíntese, enquanto concentrações mais elevadas reduzem a biossíntese ou promovem degradação da clorofila (XIAO et al., 2020). Entretanto, no presente estudo a maior taxa de fotossíntese não esteve diretamente relacionada com a maior concentração de pigmentos. Respostas semelhantes às encontradas para essa espécie, foram encontradas também em *Cleoma viscosa* (XIAO et al., 2020) e *Macleaya cordata* (PAN et al., 2019),

O aumento da concentração de metais pesados nos tecidos das plantas, a exemplo do excesso de Mn, pode aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que causa peroxidação lipídica, redução da atividade enzimática e da regulação osmótica (GILL e TUTEJA, 2010; GIROTTTO et al., 2016; LI et al., 2019; PAN et al., 2018). As ERO são consideradas como respostas de sinalização e de defesa das plantas em situações de estresse, a exemplo do excesso de metais pesados (SHARMA et al., 2020). A membrana plasmática é o primeiro local a sofrer danos e é a barreira para a entrada de Mn nas células. Portanto, o conteúdo e a composição dos fosfolipídios diferem diante das condições de estresse, sendo a principal estrutura de suporte da membrana celular (TANG et al., 2020).

As maiores concentrações de MDA encontradas nas folhas de *L. multiflorum* e *P. plicatulum* na presença das maiores concentrações de Mn (Figura 9B), representam aumento do estresse oxidativo em função do excesso do metal na solução nutritiva e contribuem para justificar quanto às respostas fotossintéticas e de crescimento obtidas. Portanto, o excesso de Mn promove peroxidação lipídica da membrana celular (HUANG et al., 2019), pois a concentração de MDA é o produto final da peroxidação lipídica e considerado um indicador direto do estresse oxidativo na planta (GIROTTTO et al., 2016; TAUQEER et al., 2016). Além disso, o excesso de Mn na solução nutritiva proporcionou maiores concentrações do elemento em mitocôndrias e plastídios quando comparado ao controle (Figura 5), que pode ter contribuído para formação de ERO e alterações nas demais respostas fisiológicas das plantas.

As plantas apresentam vários mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como a atividade de enzimas antioxidantes (XIAO et al., 2020). As enzimas antioxidantes incluem a SOD e POD que podem reduzir o dano oxidativo a partir da conversão de ERO em outros

produtos (LI et al., 2016; PAN et al., 2018). No entanto, sob maiores concentrações de Mn a produção de ERO pode superar a capacidade de eliminação pelas enzimas antioxidantes, gerando danos à célula vegetal e ao sistema de enzimas (XIAO et al., 2020). Portanto, sob menores concentrações de Mn as plantas regulam a concentração de ERO mantendo o metabolismo celular em condições adequadas, enquanto sob maiores concentrações de Mn a atividade das enzimas de tolerância da planta foi superada pelo excesso de ERO, correspondendo ao maior acúmulo de MDA, por exemplo.

Em resposta ao estresse por metais pesados o aumento e produção de ERO pode ser regulada a partir do aumento da atividade das enzimas antioxidantes (LI et al., 2016; RANI et al., 2014). No entanto, a concentração de Mn pode ser muito alta, a ponto que pode estar afetando o desempenho das enzimas antioxidantes (FARIA et al., 2020). Esse fato é evidenciado ao observar a maior atividade das enzimas SOD e POD em folhas de *P. plicatum* e *L. multiflorum*, respectivamente, onde houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes (Figuras 9C e 9D) e mesmo assim ocorreu maior peroxidação lipídica (Figura 9B) e alterações sobre fotossíntese (Figura 8). Da mesma forma, essas enzimas também apresentaram maior atividade nas raízes de plantas que foram expostas às maiores concentrações de Mn, como mecanismo de evitar danos oxidativos ao sistema radicular, o qual afetaria negativamente a absorção de nutrientes.

A toxicidade por metais pesados também pode reduzir a densidade e tamanho dos estômatos, assim como promover variações da densidade nas epidermes abaxial e adaxial (SAGARDOY et al., 2010). Esses efeitos foram observados principalmente nas espécies de *A. strigosa* e *P. plicatum* (Figura 11). Além disso, a toxicidade pode resultar em fechamento estomático e redução da condutância estomática e taxa de transpiração das plantas (PAULA et al., 2015). No entanto, essas respostas não foram tão evidentes no presente estudo, pois a densidade estomática não apresentou uma relação direta com a condutância estomática e taxa de transpiração.

A inibição do crescimento radicular que resulta em redução de comprimento, área superficial, volume de raiz, entre outros, pode ocorrer em função da presença do excesso de determinados metais. Porém, o excesso de Mn, dentro dos níveis testados no presente estudo não influenciou negativamente a biometria radicular das espécies nativas. Na presença de 300  $\mu\text{M}$  de Mn para *A. strigosa* e 900  $\mu\text{M}$  de Mn para *L. multiflorum* houve maior crescimento radicular (Figura 12), que podem ter favorecido para a absorção de outros nutrientes. Nessas gramíneas exóticas houve maior concentração de Mn nas raízes do que nas espécies nativas.

Em *Arabidopsis paniculata*, 1 mmol L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub> também promoveu a formação de raízes mais longas do que das plantas controle, demonstrando que essa concentração não foi estressante para a espécie e esse maior comprimento pode auxiliar na absorção de nutrientes (TANG et al., 2020). Além disso, o Mn é responsável pelo alongamento celular e com isso afeta o crescimento de raiz e conseqüentemente da parte aérea. As altas concentrações de Mn promovem degradação do ácido-indol-3-acético (AIA) devido ao aumento da atividade de oxidases e polifenoloxidase (FECHT-CHRISTOFFERS et al., 2007). Com a degradação do AIA, ocorre perda da dominância apical e formação de brotos/perfilhos auxiliares que podem contribuir para o aumento da matéria seca da planta.

### 3.7 CONCLUSÃO

As gramíneas de cobertura de solo apresentaram tolerância e capacidade de apresentar elevadas concentrações de Mn nos seus tecidos de raízes e folhas, sendo o metal compartimentalizado, principalmente na parede celular e vacúolos das células. As características fisiológicas e bioquímicas fornecem informações importantes para explicar os mecanismos de tolerância ao Mn, contudo, a compartimentalização em organelas celulares metabolicamente menos ativas é considerada o principal fator de tolerância pelas plantas, como constatado em maior magnitude nas espécies de gramíneas nativas *P. notatum* e *P. plicatulum*. As respostas fisiológicas, bioquímicas e nutricionais para a maioria das espécies de gramíneas foram estimuladas na presença de 300 µM de Mn, enquanto em 900 µM houve diminuição dessas variáveis nas plantas. O *L. multiflorum* foi a espécie mais sensível ao excesso de Mn, com aparecimento de sintomas de toxicidade caracterizados por manchas necróticas marrons em folhas velhas.

Portanto, o presente estudo fornece uma caracterização inicial robusta da predição de respostas fisiológicas e bioquímicas de gramíneas de cobertura de solo nativas e exóticas, as quais são presentes em áreas de vinhedos do bioma Pampa, em condições de excesso de Mn. No entanto, mais estudos são necessários para gerar novas informações e compreender de forma mais abrangente os mecanismos de tolerância ao Mn adotados pelas plantas, assim como o efeito combinado do excesso de Mn com outros metais pesados, como Cu e Zn que também estão presentes em altas concentrações nessas áreas de vinhedos do bioma Pampa.



AGRADECIMENTOS: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### 3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHADURI, A. M.; FULEKAR, M. H. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, n. 1, p. 55-69, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUNETTO, G. et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 5, p. 609-624, 2014.

CAMPOS, M. L. et al. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 15, p. 4347-4361, 2009.

CEBALLOS-LAITA, L. et al. Effects of manganese toxicity on the protein profile of tomato (*Solanum lycopersicum*) roots as revealed by two complementary proteomic approaches, two-dimensional electrophoresis and shotgun analysis. **Journal of proteomics**, v. 185, p. 51-63, 2018.

CHEN, Z. et al. Malate Synthesis and Secretion Mediated by a Mn Enhanced Malate dehydrogenase, SgMDH1, Confers Superior Mn Tolerance in *Stylosanthes guianensis*. **Plant Physiology**, pp-114, 2014.

COUTO, R. R. et al. Environmental vulnerability and phosphorus fractions of areas with pig slurry applied to the soil. **Journal of environmental quality**, v. 44, n. 1, p. 162-173, 2015.

DE CONTI, L. et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019.

DE CONTI, L. et al. Iron fertilization to enhance tolerance mechanisms to copper toxicity of ryegrass plants used as cover crop in vineyards. **Chemosphere**, v. 243, p. 125298, 2020.

EL-MOSHATY, F. I. B. et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 109-119, 1993.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos plantas e fertilizantes**. 2 ed., Brasília, 2009. 627 p.

FARIA, J. M. S. et al. Toxic levels of manganese in an acidic Cambisol alters antioxidant enzymes activity, element uptake and subcellular distribution in *Triticum aestivum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 193, p. 110355, 2020.

FECHE-CHRISTOFFERS, M. M. et al. The role of the leaf apoplast in manganese toxicity and tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). In: **The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 307-321.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, R. S.; SANTOS, L. A. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2018.

FERNANDO, D. R. et al. Multiple metal accumulation within a manganese-specific genus. **American journal of botany**, v. 100, n. 4, p. 690-700, 2013.

FERNANDO, D. R.; LYNCH, J. P. Manganese phytotoxicity: new light on an old problem. **Annals of botany**, v. 116, n. 3, p. 313-319, 2015.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952, 2014.

FU, X. et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 103-107, 2011.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIROTTI, E. et al. Biochemical changes in black oat (*Avena strigosa* Schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 199-207, 2016.

GU, D. et al. Metal tolerance protein family members are involved in Mn homeostasis through internal compartmentation and exocytosis in *Brassica napus*. **Environmental and Experimental Botany**, p. 104785, 2022.

HAN, S. H. et al. Alleviation of Cd toxicity by composted sewage sludge in Cd-treated Schmidt birch (*Betula schmidtii*) seedlings. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 541-546, 2006.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1132-1334, 1979.

HUANG, G. et al. Accumulation and distribution of copper in castor bean (*Ricinus communis* L.) callus cultures: in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 1, p. 177-186, 2017.

HUANG, H. et al. Physiological responses of *Broussonetia papyrifera* to manganese stress, a candidate plant for phytoremediation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 181, p. 18-25, 2019.

JAVED, M. T. et al. Chromium retention potential of two contrasting *Solanum lycopersicum* Mill. cultivars as deciphered by altered pH dynamics, growth, and organic acid exudation under Cr stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 22, p. 27542-27554, 2021.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. Fourth Edition. CRC press. 2010.

KOYRO, H. W. et al. Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 91, p. 22-29, 2013.

LAVRES JUNIOR, J. et al. Changes in the ultrastructure of soybean cultivars in response to manganese supply in solution culture. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 3, p. 287-294, 2010.

LEGUIZAMO, M. A. O.; GÓMEZ, W. D. F.; SARMIENTO, M. C. G. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands - a review. **Chemosphere**, v. 168, p. 1230-1247, 2017.

LI, J. et al. Advances in the mechanisms of plant tolerance to manganese toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5096, 2019.

LI, Q. et al. Effects of manganese-excess on CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 42, 2010.

LI, S. et al. Cadmium-induced oxidative stress, response of antioxidants and detection of intracellular cadmium in organs of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) seedlings. **Chemosphere**, v. 153, p. 107-114, 2016.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.

MAGRI, E. et al. Manganese hyperaccumulation capacity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. and occurrence of interveinal chlorosis induced by transient toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 111010, 2020.

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Third. Academic Press, London. 2012.

MEGDA, M. M.; MONTEIRO, F. A. Nitrogen and potassium supply and the morphogenic and productive characteristics of marandu palisadegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.39, n. 8, p. 1666-1675, 2010.

- MILLALEO, R. et al. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 4, p. 470-481, 2010.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.
- NEVES, M. I. et al. Manganese toxicity hardly affects sulfur metabolism in *Brassica rapa*. In: **Sulfur Metabolism in Higher Plants-Fundamental, Environmental and Agricultural Aspects**. Springer, Cham, 2017. p. 155-162.
- PAGE, V.; LE BAYON, R. C.; FELLER, U. Partitioning of zinc, cadmium, manganese and cobalt in wheat (*Triticum aestivum*) and lupin (*Lupinus albus*) and further release into the soil. **Environmental and experimental Botany**, v. 58, n. 1-3, p. 269-278, 2006.
- PAN, G. et al. Integrative study of subcellular distribution, chemical forms, and physiological responses for understanding manganese tolerance in the herb *Macleaya cordata* (papaveraceae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 181, p. 455-462, 2019.
- PAN, G. et al. Morphophysiological responses and tolerance mechanisms of *Xanthium strumarium* to manganese stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 165, p. 654-661, 2018.
- PAULA, L. S. et al. Silicon (Si) ameliorates the gas exchange and reduces negative impacts on photosynthetic pigments in maize plants under Zinc (Zn) toxicity. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 10, p. 901, 2015.
- RANI, A. et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. **International journal of environmental health research**, v. 24, n. 4, p. 378-399, 2014.
- RIBERA, A. E. et al. Photosynthetic impairment caused by manganese toxicity and associated antioxidative responses in perennial ryegrass. **Crop and Pasture Science**, v. 64, n. 7, p. 696-707, 2013.
- SAGARDOY, R. et al. Stomatal and mesophyll conductances to CO<sub>2</sub> are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. **New Phytologist**, v. 187, n. 1, p. 145-158, 2010.
- SANTOS, E. F. et al. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant physiology and biochemistry**, v. 113, p. 6-19, 2017.
- SHAO, J. F. et al. The key to Mn homeostasis in plants: Regulation of Mn transporters. **Trends in plant science**, v. 22, n. 3, p. 215-224, 2017.
- SHARMA, A. et al. The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 540, 2020.
- SHUAI, X. Two-dimensional segmented regression model for aluminum and manganese toxicity and their interaction in Soybean. **Agronomy Journal**, v. 108, n. 3, p. 1041-1049, 2016.

SILVA, M. et al. Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 173-181, 2014.

TANG, T.; TAO, F.; LI, W. Characterisation of manganese toxicity tolerance in *Arabidopsis paniculata*. **Plant Diversity**, 2020.

TAUQEER, H. M. et al. Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 138-146, 2016.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TIZIANI, R. et al. Phosphorus deficiency changes carbon isotope fractionation and triggers exudate reacquisition in tomato plants. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

TOMASI, N. et al. Nutrient accumulation in leaves of Fe-deficient cucumber plants treated with natural Fe complexes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, p. 973-982, 2014.

WANG, Q. Y.; LIU, J. S.; HU, B. Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees. **Environmental and Experimental Botany**, v. 123, p. 125-131, 2016.

WANG, Y. et al. Transport, ultrastructural localization, and distribution of chemical forms of lead in radish (*Raphanus sativus* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 293, 2015.

WEYERS, J. D. B.; JOHANSEN, L. G. Accurate estimation of stomatal aperture from silicone-rubber impressions. **New phytologist**, v. 101, n. 1, p. 109-115, 1985.

XIAO, Z. et al. Effects of exogenous manganese on its plant growth, subcellular distribution, chemical forms, physiological and biochemical traits in *Cleome viscosa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p. 110696, 2020.

XIN, J. et al. Comparison of cadmium subcellular distribution in different organs of two water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.) cultivars. **Plant and soil**, v. 372, n. 1-2, p. 431-444, 2013.

XUE, S. et al. Effects of manganese on the microstructures of *Chenopodium ambrosioides* L., a manganese tolerant plant. **International journal of phytoremediation**, v. 18, n. 7, p. 710-719, 2016.

YANG, L. P. et al. Effect of Cd on growth, physiological response, Cd subcellular distribution and chemical forms of *Koeleruteria paniculata*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 160, p. 10-18, 2018.

YAO, Y. et al. Subcellular Mn compartation, anatomic and biochemical changes of two grape varieties in response to excess manganese. **Chemosphere**, v. 89, n. 2, p. 150-157, 2012.

YIN, J. et al. Responses of *Vallisneria natans* (Lour.) Hara to the combined effects of Mn and pH. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 10, p. 1177-1189, 2019.

ZANÃO JÚNIOR, L. A. et al. Rice grown in nutrient solution with doses of manganese and silicon. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 5, p. 1629-1639, 2010.

ZHANG, Y. et al. Mechanisms of manganese toxicity and manganese tolerance in plants. **Chinese Bulletin of Botany**, v. 45, n. 04, p. 506, 2010.

ZHAO, Y. et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in the edible seaweed, *Porphyra yezoensis*. **Food chemistry**, v. 168, p. 48-54, 2015.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 527–533, 2004.

**4 ARTIGO 2 – INTERAÇÃO DO EXCESSO DE COBRE E MANGANÊS EM  
GRAMÍNEAS EXÓTICAS E NATIVAS**

Periódico: Environmental and Experimental Botany.

## INTERAÇÃO DO EXCESSO DE COBRE E MANGANÊS EM GRAMÍNEAS EXÓTICAS E NATIVAS

### 4.1 RESUMO

A presença de elevadas concentrações de metais pesados presentes em áreas de vinhedos da região da Campanha Gaúcha, como cobre (Cu) e manganês (Mn), resultante de aplicações frequentes de fungicidas para o controle de doenças em plantas, podem afetar os processos fisiológicos de videiras e outras espécies de cobertura de solo que coabitam esses ambientes. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e nutricionais de gramíneas de cobertura de solo de vinhedos submetidas à interação de excesso de Cu e Mn. O experimento foi conduzido em solução nutritiva em casa de vegetação sob delineamento inteiramente casualizado, bifatorial 4x4, constituído por quatro combinações de excesso de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) em quatro espécies de gramíneas de cobertura de solo (*Avena strigosa*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*). As letras “L” e “H” representam baixa e alta concentração dos elementos, sendo 300 e 900  $\mu\text{M}$  para Mn e 0,5 e 40  $\mu\text{M}$  para Cu, respectivamente. A biomassa e taxas de crescimento, trocas gasosas da folha com o ambiente, pigmentos fotossintéticos, concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , atividade de enzimas antioxidantes, biometria do sistema radicular, densidade estomática e concentração de nutrientes nos tecidos foram avaliados. Observou-se que o Cu é armazenado predominantemente na raiz e o Mn na parte aérea da maioria das gramíneas, sendo ambos os metais pesados em concentrações extremamente altas. As combinações contendo excesso de Cu, independentemente da concentração de Mn, afetaram negativamente as respostas fisiológicas, bioquímicas, nutricionais e biometria do sistema radicular das espécies. Dessa forma, conclui-se que o excesso de Cu é potencialmente mais tóxico para as gramíneas do que o excesso de Mn. O excesso combinado de Cu e Mn não intensificou o efeito de toxicidade sobre a maioria das variáveis avaliadas, quando comparadas somente com o excesso de Cu. Entretanto, tanto excesso de Mn ou Cu afeta as respostas fotossintéticas de *L. multiflorum*, mostrando-se a espécie mais sensível à toxidez dos metais.

**Palavras-chave:** Clorose. Estresse. Fisiologia. Metais pesados. Toxicidade.

### 4.2 ABSTRACT

The presence of high concentrations of heavy metals present in vineyard areas in the Campanha Gaúcha region, such as copper (Cu) and manganese (Mn), resulting from frequent applications of fungicides to control plant diseases, can affect the physiological processes of vines and other land cover species that cohabit these environments. Therefore, the objective of this study was to evaluate the physiological, biochemical and nutritional responses of ground cover grasses in vineyards subjected to the interaction of excess Cu and Mn. The experiment was carried out in a nutrient solution in a greenhouse under a completely randomized design, bifactorial 4x4, consisting of four combinations of excess Cu and Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  and  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) in four species of ground cover grasses (*Avena strigosa*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum*). The letters "L" and "H" represent low and high concentration of the elements, being 300 and 900  $\mu\text{M}$  for Mn and 0.5 and 40  $\mu\text{M}$  for Cu, respectively. Biomass and growth rates, leaf gas exchange with the environment, photosynthetic pigments,  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration, antioxidant enzyme activity, root system biometry, stomatal density and tissue nutrient concentration were evaluated. It was observed that Cu is stored predominantly in the root and Mn in the shoot of most grasses, both being heavy metals in extremely high



concentrations. The combinations containing excess Cu, regardless of Mn concentration, negatively affected the physiological, biochemical, nutritional and biometric responses of the root system of the species. Thus, it is concluded that excess Cu is potentially more toxic to grasses than excess Mn. The combined excess of Cu and Mn did not intensify the toxicity effect on most of the variables evaluated, when compared only with the excess of Cu. However, both Mn or Cu excess affect the photosynthetic responses of *L. multiflorum*, proving to be the most sensitive grass to metal toxicity.

**Key-words:** Chlorosis. Stress. Physiology. Heavy metals. toxicity.

#### 4.3 INTRODUÇÃO

O acúmulo excessivo de metais pesados nos solos tem sido demonstrado em diferentes partes do mundo, sendo proveniente de atividades humanas, especialmente em atividades agrícolas (DE CONTI et al., 2016; LEGUIZAMO et al., 2017). Dentre essas atividades, um exemplo bem típico é representado por áreas de vinhedos e pomares em geral, onde tem-se aplicações sucessivas de fungicidas para controle de várias doenças, principalmente em regiões com precipitações frequentes e altas temperaturas durante o ciclo das culturas. Esses fungicidas protetores possuem na sua formulação elementos como Cu e Mn, que são depositados nas folhas e com as precipitações pluviométricas acabam escorrendo para o solo, onde é acumulado e, com o passar do tempo, podem atingir níveis de toxicidade para as culturas (BALDI et al., 2018; CAMBROLLÉ et al., 2015; KOMÁREK et al., 2010; MIOTTO et al., 2014). Portanto, em solos de áreas de vinhedos é muito comum encontrar altas concentrações de Cu (BRUNETTO et al., 2016) e também altas concentrações de Mn (MIOTTO et al., 2014) que impactam sobre a produtividade das culturas.

Em estudo avaliando a contribuição de espécies de gramíneas nativas em limitar a disponibilidade de Cu para videiras, o aumento da concentração de Cu no solo (40 e 80 mg de Cu kg<sup>-1</sup> de solo) resultou em aumento expressivo na concentração de Mn nas raízes, caule e folhas de videiras (DE CONTI et al., 2019), sendo que nas folhas essas concentrações ficaram próximas ou acima dos níveis críticos de excesso, que é considerado acima de 400 mg kg<sup>-1</sup> para a maioria das espécies de plantas (MARSCHNER, 2012). Portanto, esses resultados representam uma situação de alerta, principalmente em solos contaminados com altas concentrações Cu e Mn. A presença de elevadas concentrações de Cu e Mn é muito comum nos solos de áreas de vinhedos, principalmente aqueles que foram implantados a mais tempo (MIOTTO et al., 2014). Portanto, o excesso desses metais pesados no solo ou na água, podem ser absorvidos e apresentarem elevadas concentrações nos tecidos das plantas, tendo assim potencial de provocar toxicidade a partir de estresse oxidativo e alterações em processos

metabólicos, como fotossíntese e respiração, que resultam em redução do crescimento e desenvolvimento para muitas espécies vegetais (DE CONTI et al, 2019; MILLALEO et al., 2010; MIOTTO et al., 2014).

A vitivinicultura é uma atividade que apresentou uma expansão relevante nas últimas décadas, principalmente na região da Campanha Gaúcha, no estado do Rio Grande do Sul, que possui solos arenosos e com baixos teores de matéria orgânica (GIROTTTO et al., 2016). A expansão ocorreu principalmente em áreas de campos naturais do bioma Pampa do sul do Brasil. Diante disso, diversas espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa são encontradas espontaneamente no interior dos vinhedos e manejadas como plantas de cobertura de solo. Dentre as gramíneas, a *Axonopus affinis*, *Paspalum plicatulum* e *Paspalum notatum* são as espécies nativas mais presentes nesses ambientes (QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009). Entretanto, como essas espécies nativas apresentam uma redução do crescimento durante o inverno, o cultivo de espécies exóticas, como *Lolium multiflorum* e *Avena strigosa*, se tornam alternativas interessantes para manutenção da cobertura de solo e incremento da matéria orgânica entre as fileiras de videiras durante esse período (GIROTTTO et al., 2014; TIECHER et al., 2016). Contudo, a presença de elevadas concentrações de metais pesados presentes em áreas de vinhedos da região da Campanha Gaúcha, como Cu e Mn, podem influenciar as respostas fisiológicas e bioquímicas dessas espécies de gramíneas de cobertura de solo.

Recentemente, alguns estudos vêm demonstrando a variedade de respostas fisiológicas que ocorrem nas diferentes espécies de plantas quando são expostas isoladamente ao excesso de Cu (DE CONTI et al., 2018; MARASTONI et al., 2019a; SALEEM et al., 2020b; TRENTIN et al., 2019) ou excesso de Mn (HUANG et al., 2019; MAGRI et al., 2020; PAN et al., 2019; SANTOS et al., 2017; TANG, TAO e LI , 2021; XIAO et al., 2020). No entanto, não se tem relatos na literatura sobre a interação do excesso de Cu e Mn combinados sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas de gramíneas de cobertura de solo de vinhedos, como *Avena strigosa*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*. A partir disso, estabeleceu-se como hipóteses: a) As gramíneas de cobertura de solo de vinhedos do bioma Pampa possuem mecanismos de tolerância que lhes permite apresentarem elevadas concentrações de Cu e Mn em seus tecidos; b) A interação do excesso de Cu e Mn intensifica o efeito de toxicidade desses metais nas respostas fisiológicas, como fotossíntese e crescimento, das diferentes espécies de gramíneas; c) O excesso de Cu e Mn afeta as repostas bioquímicas das gramíneas de cobertura de solo a partir do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e guaiacol peroxidase; d) O excesso de Cu na solução nutritiva aumenta a toxicidade e concentração de Mn nos tecidos, bem como promove

alterações no estado nutricional da planta. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar respostas fisiológicas, bioquímicas e nutricionais de gramíneas de cobertura de solo de vinhedos submetidas à interação de excesso de Cu e Mn em solução nutritiva.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.4.1 Descrição do experimento

O estudo foi realizado em casa de vegetação localizada na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (29° 42' S, 53° 43' O e 103 m de altitude), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. O experimento foi realizado em solução nutritiva de 01 de outubro de 2020 até 03 de novembro de 2020, em delineamento experimental inteiramente casualizado, bifatorial 4x4, com três repetições. A unidade experimental consistiu em um recipiente de 5L de solução nutritiva e seis plantas. As espécies foram *Avena strigosa* (cv. BRS 139), *Lolium multiflorum* (cv. BRS Ponteio), *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*, cultivadas em diferentes concentrações de Mn (300 e 900  $\mu\text{M}$ ; L<sup>Mn</sup> e H<sup>Mn</sup>, respectivamente) e Cu (0,5 e 40  $\mu\text{M}$ ; L<sup>Cu</sup> e H<sup>Cu</sup>, respectivamente).

As concentrações de 300 e 900  $\mu\text{M}$  de Mn equivalem a 16,5 e 49,45 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente; enquanto 0,5 e 40  $\mu\text{M}$  de Cu equivalem a 0,03 e 2,54 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para isso, foram projetados quatro tratamentos que correspondem às combinações dos diferentes níveis de Cu com diferentes níveis de Mn, sendo L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup>, L<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup>, H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> e H<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup>. As letras “L” e “H” representam baixa e alta concentração dos elementos, respectivamente. A combinação L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> representa o tratamento “controle”, sendo que a concentração de 300  $\mu\text{M}$  de Mn foi definida a partir de experimentos anteriores em que as gramíneas apresentaram melhores respostas de crescimento nessa condição.

As mudas das espécies nativas do bioma Pampa (*Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*) foram propagadas vegetativamente a partir de plantas cultivadas em areia em casa de vegetação. As espécies exóticas (*Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*) foram propagadas através de semeadura em vermiculita. Para o experimento, as mudas de cada espécie foram padronizadas de acordo com número de folhas expandidas (aproximadamente três folhas expandidas) e tamanho de raízes e, posteriormente, foram transplantadas para vasos com solução nutritiva.

As raízes das plantas foram imersas em 5 L de solução nutritiva com aeração constante composta por: 85,31 mg L<sup>-1</sup> N; 3,77 mg L<sup>-1</sup> P; 11,54 mg L<sup>-1</sup> S; 97,64 mg L<sup>-1</sup> Ca; 23,68 mg L<sup>-1</sup> Mg; 104,75 mg L<sup>-1</sup> K; 181,08 mg L<sup>-1</sup> Cl; 0,27 mg L<sup>-1</sup> B; 0,05 mg L<sup>-1</sup> Mo; 0,01 mg L<sup>-1</sup> Ni; 0,13

mg L<sup>-1</sup> Zn; 0,03 mg L<sup>-1</sup> Cu; 0,11 mg L<sup>-1</sup> Mn e 2,68 mg L<sup>-1</sup> Fe. As plantas foram fixadas em orifícios de placas de poliestireno com auxílio de esponjas onde permaneceram por 12 dias em período de aclimatação, em solução nutritiva com concentração normal de Cu e Mn. Subsequentemente, foram aplicados os tratamentos com diferentes combinações de Cu e Mn, com troca da solução nutritiva a cada sete dias e pH inicial de 5,5. Durante o período experimental, o pH da solução nutritiva foi monitorado a cada dois dias. Ao final do período de aclimatação foi avaliada a biomassa de uma planta por repetição para determinar o crescimento inicial.

#### 4.4.2 Produção de biomassa e taxas de crescimento

Aos 21 dias de exposição das gramíneas as combinações de Cu e Mn, três plantas de cada repetição foram coletadas para determinação da massa seca de raízes, parte aérea e total. As raízes das plantas foram lavadas em água destilada e secas em papel absorvente antes da avaliação. As raízes e parte aérea foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de com circulação forçada de ar à  $\pm 65^{\circ}\text{C}$  até atingir massa constante. A determinação da massa seca de raízes (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) foi realizada em balança de precisão (Shimadzu, AY220).

No início da aplicação dos tratamentos, uma planta foi coletada, preparada e determinada a MST inicial. A taxa de crescimento absoluto (TCA<sub>b</sub>), que é um indicador da velocidade média de crescimento durante o período foi determinada através da Equação 1:

$$TCA_b (g \text{ dia}^{-1}) = (MST_f - MST_i) / ND \quad (1)$$

Onde: MST<sub>f</sub> = Massa seca total final; MST<sub>i</sub> = Massa seca total inicial; ND = número de dias.

A taxa de crescimento relativo (TCR), que representa o incremento em massa seca por unidade de massa seca inicial em um intervalo de tempo foi determinada pela Equação 2:

$$TCR (g \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}) = (\log MST_f - \log MST_i) / ND \quad (2)$$

Onde: MST<sub>f</sub> = Massa seca total final; MST<sub>i</sub> = Massa seca total inicial; ND = número de dias.

#### 4.4.3 Concentração de nutrientes e índice de translocação

Raízes e parte aérea foram moídas em moinho tipo Willey (Tecnal, TE-680). Os resíduos foram passados em peneira de malha de 2 mm. Amostras de 0,250 g foram submetidas à digestão nitroperclórica (3 mL de ácido nítrico [HNO<sub>3</sub>] 65% P.A. e 1 mL de ácido perclórico [HClO<sub>4</sub>] 70% P.A.) (Embrapa, 2009). A concentração total de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e Mn foram analisadas em espectrômetro de absorção atômica (AAS, Perkin Elmer Analyst 200) (Tedesco et al., 1995). O fósforo (P) foi

analisado em espectrofotômetro (Tecnal, V-5000), conforme metodologia de Murphy & Riley (1962).

O índice de translocação (IT) de Mn e Cu para a parte aérea foram determinadas pelas Equações 3 e 4, respectivamente:

$$IT = [MnPA] / [MnT] \quad (3)$$

$$IT = [CuPA] / [CuT] \quad (4)$$

Onde: [MnPA] = Concentração de Mn na parte aérea; [MnT] = Concentração total de Mn na planta; [CuPA] = Concentração de Cu na parte aérea; [CuT] = Concentração total de Cu na planta.

#### 4.4.4 Trocas gasosas da folha com o ambiente

As trocas gasosas da folha com o ambiente foram determinadas a partir de um analisador de gás por radiação infra-vermelho (Infrared Gas Analyser [IRGA], Mod. LICOR® 6400 XT). As leituras foram realizadas aos sete e 17 dias após o início dos tratamentos com diferentes combinações de Cu e Mn, entre 8h e 10h, com concentração de 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  e densidade de fluxo de fótons de 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para isso, a penúltima folha expandida de uma planta de cada repetição foi selecionada para realizar a leitura. Nesta avaliação foram determinadas as variáveis: taxa fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $G_s$ ), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco ( $A/C_i$ ), taxa de transpiração ( $E$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e eficiência do uso da água ( $EUA$ ). A  $A/C_i$  foi determinada a partir da relação entre a taxa fotossintética líquida ( $A$ ) e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), o que representa a quantidade de  $\text{CO}_2$  fixado pela fotossíntese. A  $EUA$  foi determinada pela razão entre a taxa fotossintética líquida ( $A$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ).

Ao final do experimento, as mesmas plantas onde foram avaliadas trocas gasosas, foram coletadas e imediatamente congeladas em N líquido e armazenadas em ultrafreezer à  $-80^\circ\text{C}$ . Posteriormente, essas amostras foram maceradas em N líquido para a determinação de pigmentos fotossintéticos, concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxidação lipídica (TBARS) e atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD).

#### 4.4.5 Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos

A quantificação da concentração dos pigmentos fotossintéticos (clorofila  $a$ ,  $b$  e carotenoides) nas folhas foi determinada utilizando a metodologia proposta por Hiscox & Israelstam (1979) e estimado a partir da fórmula de Lichtenthaler's (LICHTENTHALER, 1987). Para isso, foram pesados 0,05 g de material vegetal e, posteriormente incubados em

banho maria a 65°C em torno de 40 min com 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) até remoção total dos pigmentos presentes no tecido foliar. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) nos comprimentos de onda 663, 645 e 470 nm para determinação da clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente. A clorofila total foi a soma dos valores de clorofila *a* e *b*.

#### **4.4.6 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada de acordo com Loreto & Velikova (2001). Para isso, 0,3 g de amostras congeladas foram homogeneizadas em 3 mL de 0,1% (w/v) de ácido tricloroacético (TCA) e, posteriormente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Uma quantidade de 0,5 mL do sobrenadante da amostra foi adicionado com 0,5 mL de tampão de 10 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio (pH 7) e 1 mL de 1 mol L<sup>-1</sup> de iodeto de K (KI). A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) no comprimento de onda de 390 nm. Os valores da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> de massa fresca.

#### **4.4.7 Peroxidação lipídica (TBARS)**

Os níveis da peroxidação lipídica foram estimados a partir do método de El-Moshaty (1993), quantificando a concentração de malondialdeído (MDA) como um produto da peroxidação lipídica por reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Para isso, 0,5 g de amostras congeladas foram homogeneizadas com 4 mL de 0,2 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato-citrato (TFK – pH 6,5) contendo 0,5% de Triton-X. As amostras foram centrifugadas a 20.000g em centrifuga refrigerada a 4°C durante 15 minutos. Alíquotas de 1,5 mL de sobrenadante foram separadas para determinação do TBARS. O mesmo volume de 20% de ácido tricloroacético (TCA) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foi adicionado às amostras. A mistura foi aquecida a 95°C por 40 minutos e após rapidamente resfriadas em gelo por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) em comprimento de onda de 532 nm, subtraindo o valor de absorbância de 600 nm como uma correção de turbidez não específica.

#### **4.4.8 Atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD)**

Para determinação da atividade da SOD, 0,5 g de amostra de tecido congelado foi homogeneizado em 3 mL de tampão de 50 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio (pH 7,8), incluindo EDTA (1 mmol L<sup>-1</sup>) e 0,5% de Triton-X. O extrato homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g

por 15 min em centrifuga refrigerada a 4°C. A atividade da SOD e conteúdo de proteína foram determinados pelo uso do sobrenadante (BRADFORD, 1976; ZHU et al., 2004). Para isso, 2,6 mL de solução composta por 50 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio (pH 7,8), metionina (13 mmol L<sup>-1</sup>), EDTA (0,1 µM), ρ-nitro blue tetrazolium - NBT (75 µM) e riboflavina (2 µM) foram adicionadas em tubos de vidro com 400 µL do sobrenadante da amostra de folhas, e incubados sob luz de lâmpadas fluorescente (15 watts) por três minutos. Para raízes, foram utilizados 1,3 mL de solução, 700 µL do sobrenadante da amostra e incubados na luz por um minuto. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105) no comprimento de onda de 560 nm. A atividade da SOD é dada através da inibição do NBT pela enzima. Tubos sem extrato expostos ou não à luz foram usados como tubos controle (branco) para a reação. A atividade da SOD foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato inibindo 50% da reação NBT e expresso como U mg<sup>-1</sup> de proteína. Para todos os ensaios enzimáticos, a proteína foi determinada pelo método azul de Comassie (BRADFORD, 1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.4.9 Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (POD)**

O mesmo extrato homogeneizado para SOD foi usado para determinação da atividade enzimática da POD. Para isso, 3 mL de solução correspondente a 1 mL de 100 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio (pH 6,5), 1 mL de guaiacol (15 mmol L<sup>-1</sup>) e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionadas com 50 µL de extrato da amostra, diretamente na cubeta do espectrofotômetro. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro (Femto, 800 XI) no comprimento de onda 470 nm por 1 minuto e intervalo de 15 segundos. A atividade da enzima é dada através da conversão de guaiacol em tetraguaiacol.

#### **4.4.10 Biometria do sistema radicular**

A biometria do sistema radicular foi determinada utilizando o software WinRhizo Pro 2013, acoplado a um scanner (EPSON Expression 11000). Para isso, as raízes foram suspensas em água em uma bandeja de acrílico e as imagens obtidas em resolução de 600 dpi. A partir deste equipamento foi possível determinar parâmetros biométricos do sistema radicular como: comprimento total, área superficial, volume radicular e diâmetro médio de raiz.

#### **4.4.11 Densidade estomática das folhas**

No final do experimento foram confeccionadas lâminas semipermanentes a partir da impressão da epiderme abaxial e adaxial da folha, com o uso de adesivo de éster de

cianoacrilato, técnica conhecida como *imprints* (SEGATTO et al., 2004; CAMPOS et al., 2009). As lâminas foram visualizadas em microscópio ótico (Modelo LEICA DM 1000) com câmera acoplada (Modelo LEICA DFC 295), e as imagens micrografadas com auxílio do software “Leica application Suite” (Version 3.0). A densidade estomática foi expressa em número de estômatos por unidade de área foliar.

#### 4.4.12 Análise estatística

Os dados do experimento foram submetidos à teste de normalidade dos erros com o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância, e quando atendidos os pressupostos estatísticos foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Quando significativos, foi realizada comparação múltipla de médias pelo teste de Scott e Knott, com 5% de probabilidade de erro, utilizando programa estatístico R, pacote “ExpDes.pt” (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014). As comparações foram apresentadas apenas para as combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie.

### 4.5 RESULTADOS

#### 4.5.1 pH da solução nutritiva

Os valores de pH da solução nutritiva oscilaram durante a condução do experimento (Figura 1). Nós observamos leve aumento do pH aos dois dias após o transplante atingindo valores próximos de 6,0, seguido de uma diminuição até o final da aclimação (valores próximos a 3,0) e após cada troca da solução nutritiva (Figura 1). A espécie de *P. notatum* apresentou menor acidificação durante a aclimação, com valores mínimos de pH de 4,6. Após o início dos tratamentos com diferentes combinações de Cu e Mn, também se observou acidificação do pH para todas as gramíneas estudadas. Entretanto, em todas as espécies, as combinações contendo excesso de Cu ( $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) causaram diminuição do pH quando comparado com os demais tratamentos. Nos tratamentos de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , os menores valores de pH foram de 2,8; 2,7; 3,4 e 2,6 para as espécies de *A. strigosa* (Figura 1A), *L. multiflorum* (Figura 1B), *P. notatum* (Figura 1C) e *P. plicatulum* (Figura 1D), respectivamente. Porém, em  $L^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}L^{Cu}$ , menores valores foram de 3,1; 2,7; 3,3 e 2,9 para *A. strigosa* (Figura 1A), *L. multiflorum* (Figura 1B), *P. notatum* (Figura 1C) e *P. plicatulum* (Figura 1D), respectivamente. Além disso, observou-se que na presença de  $L^{Mn}L^{Cu}$  houve tendência de o pH ser levemente superior em vários momentos durante a condução do experimento (Figura 1).



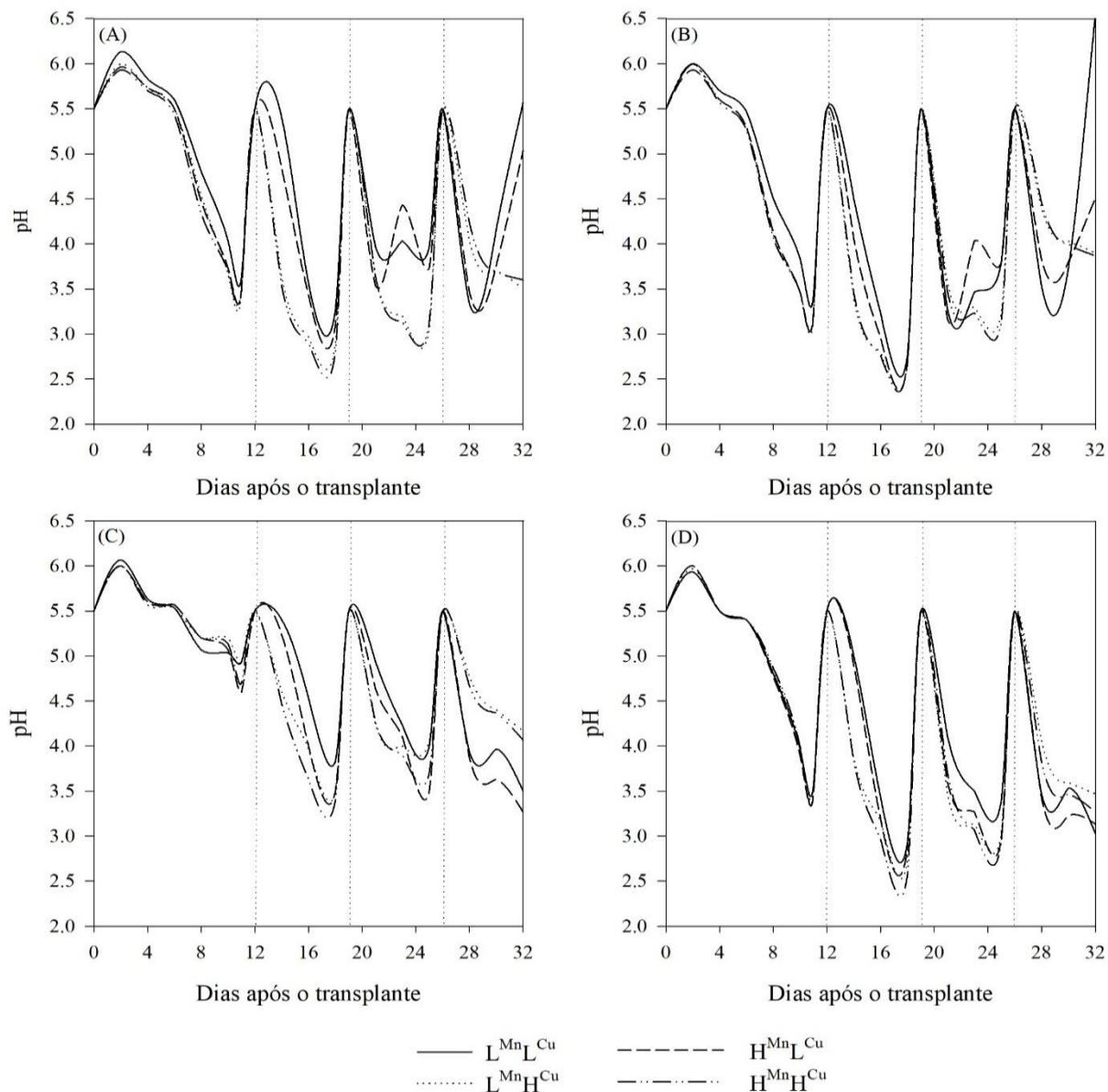


Figura 1. Variação do pH da solução nutritiva em função das diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) em gramíneas *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatulum* (D), durante o período de condução do experimento. \*Linhas pontilhadas na vertical indicam os períodos de troca da solução nutritiva, sendo o início dos tratamentos aos 12 dias após o transplante.

#### 4.5.2 Resumo da análise de variância

As diferentes combinações dos metais pesados alteraram todas as variáveis avaliadas nas plantas. Pela análise de variância, as variáveis de crescimento (massa seca de raízes, massa seca de parte aérea, massa seca total e número de perfilhos) e taxas de crescimento (absoluto e relativo) apresentaram interação significativa para os fatores espécie vegetal x combinação de Cu e Mn, pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Para análise da concentração de nutrientes nos tecidos, houve interação significativa entre os fatores espécie vegetal x concentração de Cu e Mn ( $p < 0,05$ ) para todos os nutrientes avaliados (P, K, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe e Zn) nas raízes e parte aérea, assim

como o índice de translocação de Cu e Mn para a parte aérea das plantas, pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro.

Para as trocas gasosas da folha com o ambiente aos sete dias após o início dos tratamentos, as variáveis de taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, eficiência de carboxilação instantânea da rubisco e taxa de transpiração apresentaram efeito significativo para a interação entre os fatores espécie vegetal x combinação de Cu e Mn, enquanto para eficiência do uso da água houve efeito significativo somente para o fator espécie ( $p < 0,05$ ). Para as trocas gasosas da folha com o ambiente aos 17 dias após o início dos tratamentos, todas as variáveis (taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, eficiência de carboxilação instantânea da rubisco, taxa de transpiração e eficiência do uso da água) apresentaram interação significativa entre os fatores espécie vegetal x combinação de Cu e Mn ( $p < 0,05$ ).

Da mesma forma, para as variáveis de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides), análises bioquímicas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS, SOD e POD de raízes e folhas), densidade estomática (epiderme abaxial, adaxial e total) e biometria do sistema radicular (comprimento total, área superficial total, volume radicular e diâmetro médio de raízes), houve efeitos significativos para interação espécie vegetal x combinação de Cu e Mn, pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro. Contudo, os resultados foram apresentados com comparações de médias somente entre as combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie.

#### 4.5.3 Concentração de nutrientes nas raízes e parte aérea

As plantas cultivadas com alta concentração de Cu na solução nutritiva apresentaram aumento da concentração do elemento nas raízes e parte aérea. As concentrações de Cu aumentaram nas raízes de todas as gramíneas, na presença de H<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup> (seguido por L<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup>). Além disso, a concentração de Cu aumentou nas raízes de *A. strigosa* com H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup>, quando comparado com o controle (L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup>). Na presença de H<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup> e L<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup>, a concentração de Cu aumentou na parte aérea de *A. strigosa* e *L. multiflorum*, enquanto em *P. notatum* e *P. plicatulum* a maior concentração de Cu ocorreu na presença de L<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup> (Figura 2A). Entretanto, maiores concentrações de Cu na parte aérea de *P. notatum* foram observadas na presença de H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup>, quando comparado ao controle (L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup>).

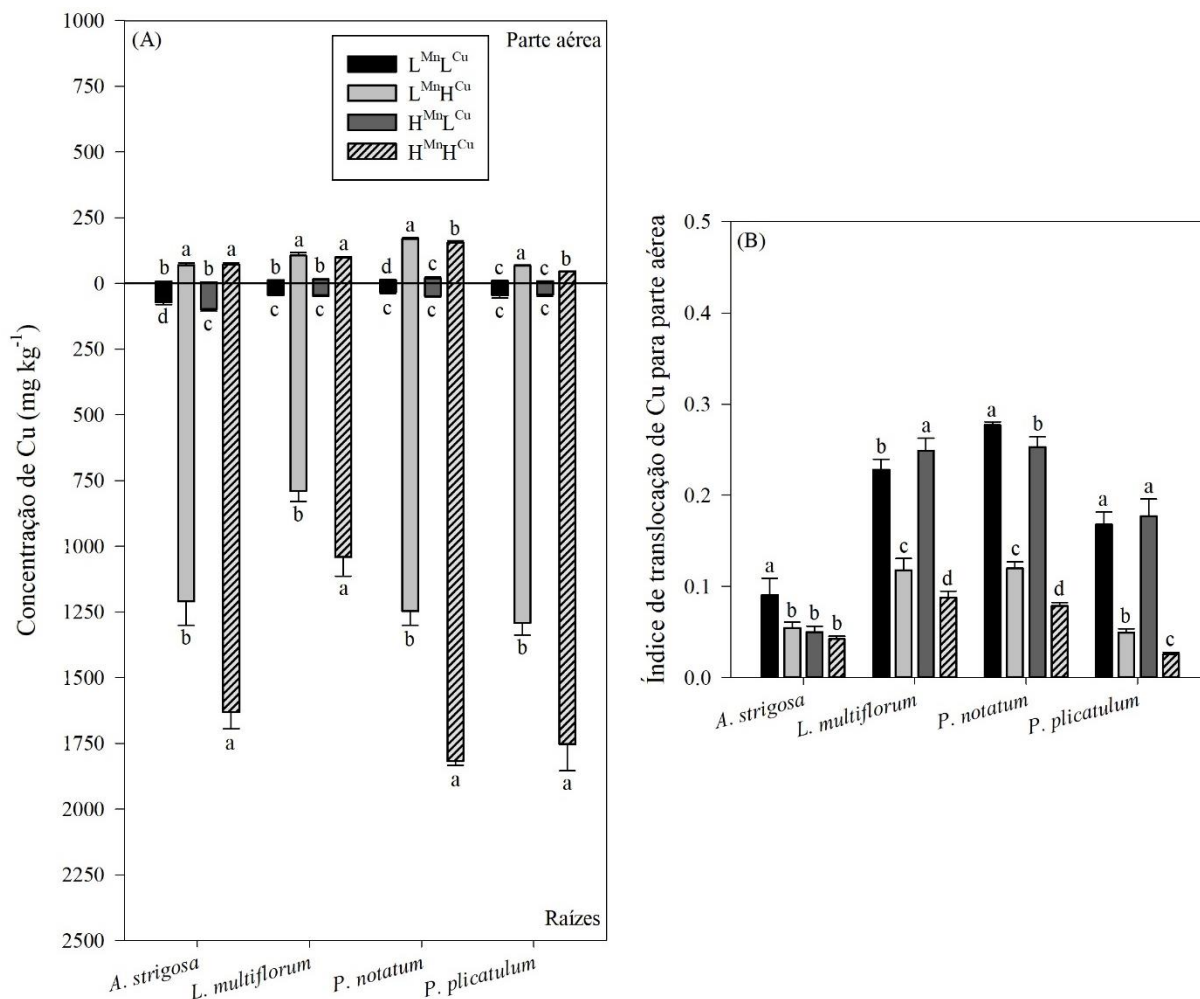


Figura 2. Concentrações de Cu nas raízes e parte aérea (A) e índice de translocação de Cu para parte aérea (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn (L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup>, L<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup>, H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> e H<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup>). \* Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

O índice de translocação de Cu para a parte aérea de *A. strigosa* foi maior no tratamento controle (L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup>). Em *L. multiflorum* o maior índice de translocação de Cu para parte aérea ocorreu com H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> e em *P. notatum* com L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> enquanto em *P. plicatulum*, os maiores índices de translocação ocorreram na presença de L<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> e H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> (Figura 2B). Entretanto, a interação H<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup> proporcionou menores índices de translocação de Cu para a parte aérea das gramíneas.

Com relação à concentração de Mn nos tecidos de raízes e parte aérea, houve uma alta variabilidade de respostas entre as gramíneas e a interação do excesso de Cu e Mn (Figura 3). A concentração de Mn aumentou na parte aérea de *A. strigosa*, *L. multiflorum* e *P. notatum* na presença de H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> e H<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup>, enquanto a maior concentração na parte aérea de *P. plicatulum* foram observadas na presença de H<sup>Mn</sup>L<sup>Cu</sup> e menores em L<sup>Mn</sup>H<sup>Cu</sup> (Figura 3A). Para a maioria

dos tratamentos, as gramíneas *A. strigosa* e *L. multiflorum* apresentaram maiores concentrações de Mn nas raízes em relação à parte aérea. As concentrações de Mn aumentaram nas raízes de *A. strigosa* na presença de  $L^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}L^{Cu}$  e diminuíram com  $L^{Mn}H^{Cu}$ . De maneira semelhante, as maiores concentrações de Mn em *L. multiflorum* foram observadas na presença de  $H^{Mn}H^{Cu}$  seguido por  $H^{Mn}L^{Cu}$ , mas com diminuição da concentração em  $L^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 3A). Entretanto, a maior concentração de Mn nas raízes de *P. notatum* foram observadas na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  e em *P. plicatumum* com  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ .

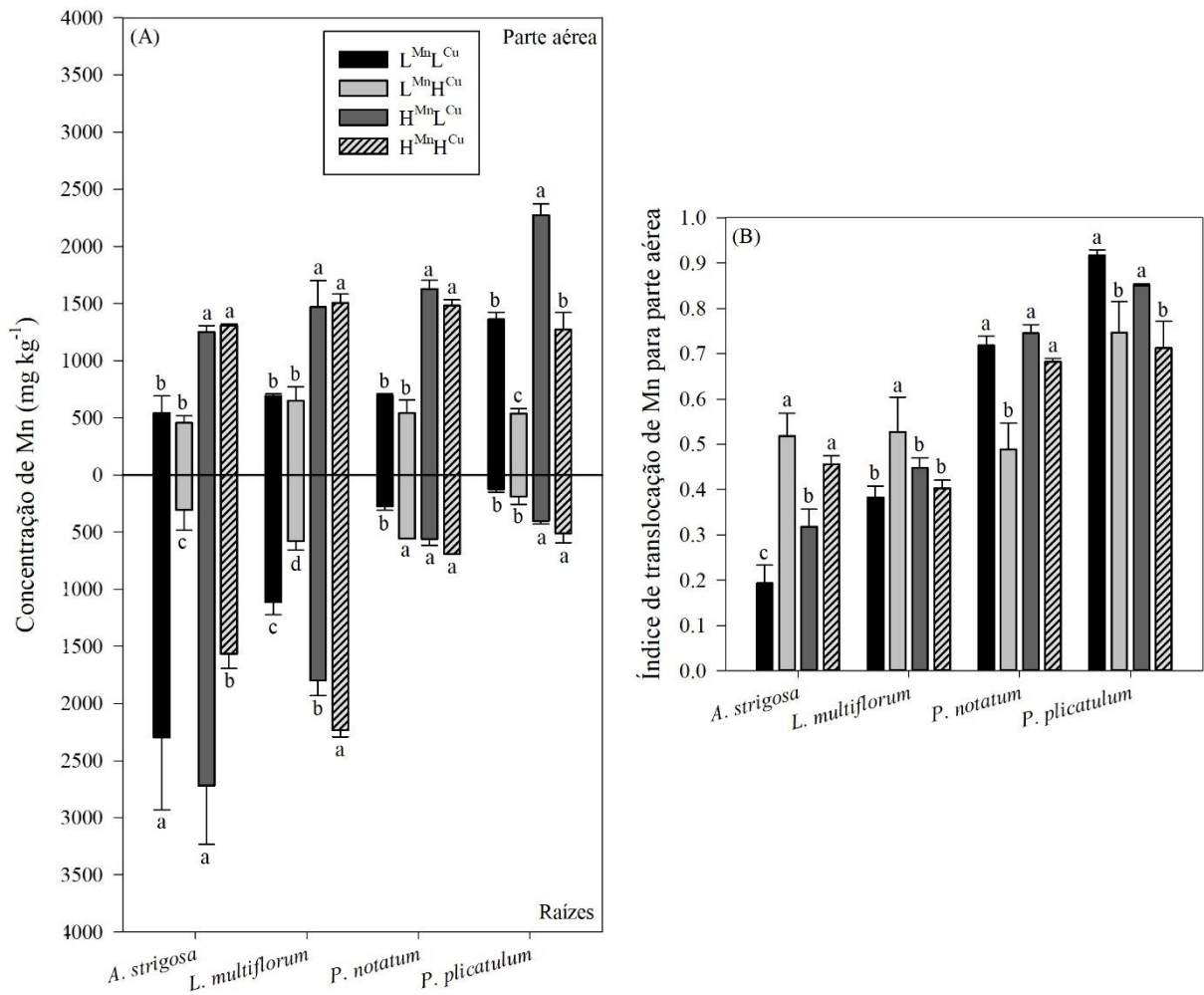


Figura 3. Concentrações de Mn nas raízes e parte aérea (A) e índice de translocação de Mn para parte aérea (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatumum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). \* Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

Os maiores índices de translocação de Mn para a parte aérea de *A. strigosa* e *P. plicatulum* foram obtidos com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  e em *L. multiflorum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 3B). Contudo, no *P. notatum* houve menor índice de translocação com  $L^{Mn}H^{Cu}$ .

As concentrações de macronutrientes e micronutrientes nos tecidos foram afetadas com as diferentes interações do excesso de Cu e Mn. A concentração de P aumentou nas raízes de *A. strigosa* na presença de  $H^{Mn}H^{Cu}$  e em *L. multiflorum* com  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , enquanto na parte aérea de *L. multiflorum* a concentração de P aumentou em  $H^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Tabela 1). Com relação as espécies nativas, as maiores concentrações de P foram observadas nas raízes e parte aérea de *P. notatum* na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$ , enquanto concentrações foram diminuídas nos tratamentos contendo excesso de Cu ( $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). Em raízes e parte aérea de *P. plicatulum* houve diminuição da concentração de P para todos os tratamentos com excesso dos metais, quando comparado ao controle ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ). A concentração de K diminuiu nas raízes de *A. strigosa* e *L. multiflorum* com  $H^{Mn}H^{Cu}$ , *P. notatum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e de *P. plicatulum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Tabela 1). A concentração de K na parte aérea de todas as gramíneas estudadas diminuíram na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ . A concentração de Ca diminuiu nas raízes de *A. strigosa* e *L. multiflorum* na presença de excesso dos metais ( $H^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ), enquanto houve aumento nas raízes de *P. notatum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$ . A concentração de Ca nas raízes e parte aérea de *P. plicatulum* e na parte aérea de *L. multiflorum* foram diminuídas na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ . A concentração de Mg diminuiu nas raízes e parte aérea de *A. strigosa* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , enquanto nas raízes de *L. multiflorum* isso ocorreu em todas as combinações com excesso de metais e na parte aérea com  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ . Contudo, a concentração de Mg diminuiu nas raízes e parte aérea de *P. notatum* e *P. plicatulum* na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações de P, K, Ca, Mg, Fe e Zn nas raízes e parte aérea de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ).

Nutrientes	Combinação de Cu e Mn	<i>A. strigosa</i>		<i>L. multiflorum</i>		<i>P. notatum</i>		<i>P. plicatulum</i>	
		Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
g kg <sup>-1</sup>									
P	$L^{Mn}L^{Cu}$	3,13 b	3,51 a	3,16 b	3,69 b	5,26 b	5,13 b	4,70 a	4,55 a
	$L^{Mn}H^{Cu}$	3,48 b	3,85 a	6,42 a	4,70 a	3,71 c	2,66 c	3,79 b	3,61 b
	$H^{Mn}L^{Cu}$	3,26 b	3,51 a	3,56 b	4,30 a	6,73 a	5,82 a	3,81 b	3,98 b
	$H^{Mn}H^{Cu}$	5,01 a	3,86 a	6,04 a	4,53 a	3,79 c	3,22 c	4,11 b	3,35 b
K	$L^{Mn}L^{Cu}$	38,57 a	37,78 a	41,01 a	42,65 a	27,16 a	29,13 b	37,96 a	30,54 a
	$L^{Mn}H^{Cu}$	36,98 a	26,61 b	26,83 b	31,83 c	8,70 c	16,84 c	18,08 b	22,62 b
	$H^{Mn}L^{Cu}$	42,94 a	35,93 a	41,21 a	38,63 b	30,13 a	32,94 a	38,69 a	30,39 a
	$H^{Mn}H^{Cu}$	30,80 b	26,66 b	19,25 c	33,94 c	15,46 b	19,24 c	24,14 b	22,03 b
Ca	$L^{Mn}L^{Cu}$	1,28 a	2,40 a	0,76 a	3,94 a	0,45 b	3,38 a	0,67 a	2,27 a
	$L^{Mn}H^{Cu}$	0,92 b	2,51 a	0,48 b	3,38 b	1,06 a	3,72 a	0,61 a	2,18 a
	$H^{Mn}L^{Cu}$	0,95 b	2,37 a	0,46 b	2,54 c	0,36 b	2,53 b	0,34 b	1,89 b
	$H^{Mn}H^{Cu}$	0,95 b	2,45 a	0,53 b	2,51 c	0,57 b	2,90 b	0,39 b	1,77 b
Mg	$L^{Mn}L^{Cu}$	3,99 a	1,17 a	0,91 a	1,72 a	1,73 a	2,07 a	0,95 a	1,96 a
	$L^{Mn}H^{Cu}$	0,37 c	0,94 b	0,24 b	1,62 a	0,29 b	1,46 b	0,58 b	1,34 b
	$H^{Mn}L^{Cu}$	1,39 b	1,16 a	0,44 b	1,43 b	1,68 a	2,10 a	1,05 a	1,77 a
	$H^{Mn}H^{Cu}$	0,40 c	0,92 b	0,27 b	1,38 b	0,29 b	1,33 b	0,53 b	1,18 b
mg kg <sup>-1</sup>									
Fe	$L^{Mn}L^{Cu}$	961,45 c	79,80 a	1004,57 c	77,19 b	994,60 d	158,02 c	856,44 c	104,39 a
	$L^{Mn}H^{Cu}$	2652,43 b	47,70 b	5015,55 a	102,15 a	4342,42 a	247,16 a	2682,53 a	77,19 b
	$H^{Mn}L^{Cu}$	854,68 c	62,39 a	1377,69 b	77,88 b	1768,41 c	139,64 c	436,97 d	96,39 a
	$H^{Mn}H^{Cu}$	4533,81 a	45,19 b	5059,64 a	79,11 b	3505,71 b	208,04 b	1387,94 b	64,52 b
Zn	$L^{Mn}L^{Cu}$	47,87 a	36,72 a	41,12 b	66,72 a	38,05 a	49,33 b	45,23 a	28,00 a
	$L^{Mn}H^{Cu}$	37,67 a	18,48 b	38,66 b	38,53 b	35,34 a	24,48 c	41,43 a	17,97 b
	$H^{Mn}L^{Cu}$	44,48 a	35,25 a	34,13 b	63,52 a	45,87 a	79,04 a	31,01 b	19,23 b
	$H^{Mn}H^{Cu}$	44,48 a	18,51 b	64,67 a	44,35 b	36,59 a	29,89 c	34,93 b	16,48 b

Os valores foram obtidos a partir das médias de três repetições referente a cada espécie de gramíneas de cobertura de solo. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie (coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

A concentração dos micronutrientes Fe e Zn foram bastante afetadas com o excesso dos metais na solução nutritiva. A concentração de Fe aumentou nas raízes e parte aérea de *P. notatum*, raízes de *P. plicatulum* e na parte aérea de *L. multiflorum* na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$ . Contudo, maiores concentrações de Fe foram observadas nas raízes de *A. strigosa* com  $H^{Mn}H^{Cu}$  e nas raízes de *L. multiflorum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ . Por outro lado, a concentração de Fe diminuiu na parte aérea de *A. strigosa* e de *P. plicatulum* na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , assim como nas raízes de *P. plicatulum* com  $H^{Mn}L^{Cu}$ .

A concentração de Zn nas raízes de *L. multiflorum* aumentou com a presença de  $H^{Mn}H^{Cu}$  e na parte aérea de *P. notatum* com  $H^{Mn}L^{Cu}$ . Porém, as concentrações de Zn diminuíram na parte aérea de *A. strigosa*, *L. multiflorum* e *P. notatum* na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  e em *P. plicatulum* com  $H^{Mn}L^{Cu}$ . Além disso, a concentração de Zn diminuiu nas raízes de *P. plicatulum* na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Tabela 1).

#### 4.5.4 Produção de biomassa e taxas de crescimento

O efeito da interação do excesso de Cu e Mn na solução nutritiva contribuiu para redução da produção de biomassa, especialmente em condições com excesso de Cu (Figura 4). Na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  houve diminuição da massa seca de raízes e de parte aérea (Figura 4A) e, conseqüentemente, da massa seca total de todas as espécies de gramíneas (Figura 4B). Por outro lado, a massa seca de raízes diminuiu em *A. strigosa* na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$  (Figura 4A) e a massa seca de parte aérea e total aumentaram em *P. notatum* (Figura 4A e 4B), quando comparado em relação ao controle ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ).

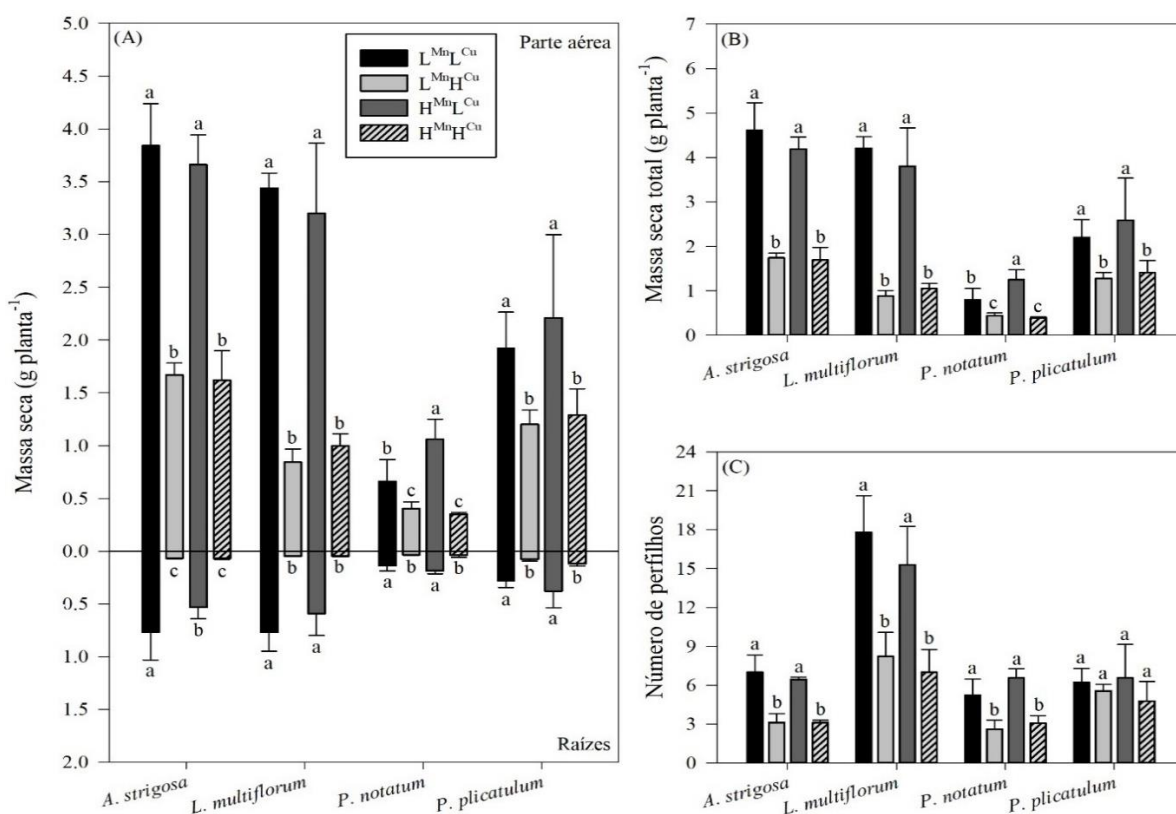


Figura 4. Massa seca de raízes e de parte aérea (A), massa seca total (B) e números de perfilhos (C) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

O número de perfilhos das espécies de *A. strigosa*, *L. multiflorum* e *P. notatum* diminuíram na presença de alta concentração de Cu independente da concentração de Mn ( $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ), porém, com  $H^{Mn}L^{Cu}$  não houve diferença significativa em relação ao controle ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ) (Figura 4C). Para *P. plicatulum* não houve diferença no número de perfilhos. Além disso, pode se observar que as plantas exóticas (*A. strigosa* e *L. multiflorum*) apresentaram maior biomassa e número de perfilhos com  $L^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}L^{Cu}$ , quando comparada com os demais tratamentos.

A taxa de crescimento absoluto (TCA<sub>b</sub>) e relativo (TCR) diminuíram drasticamente na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , de modo que para  $H^{Mn}L^{Cu}$  não houve diferença da TCA<sub>b</sub> em relação ao controle (Figura 5A). Entretanto, a TCR diminuiu em *A. strigosa* na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$ , sendo essa ainda mais reduzida nas combinações de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 5B).

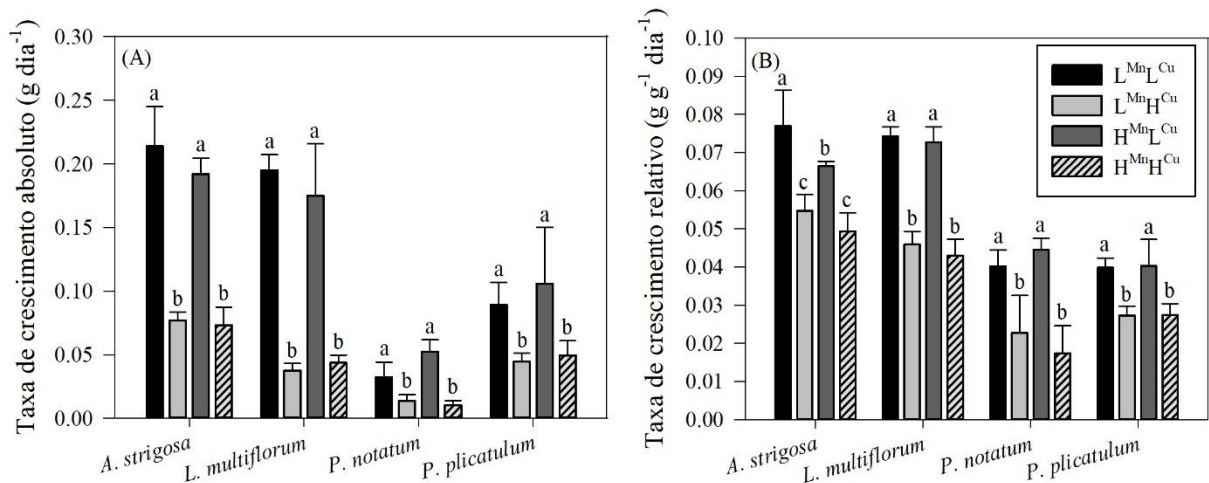


Figura 5. Taxa de crescimento absoluto (A) e relativo (B) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

Os resultados de biomassa, número de perfilhos e taxas de crescimento se manifestaram visualmente nas respectivas espécies de gramíneas estudadas. Portanto, em todas as espécies observou-se visualmente diminuição do crescimento do sistema radicular e da parte aérea nos tratamentos com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , além de clorose foliar (Figura 6).





Figura 6. Gramíneas de cobertura de solo *A. strigosa* (A), *L. multiflorum* (B), *P. notatum* (C) e *P. plicatulum* (D) cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn.  $L^{Mn}L^{Cu}$ : controle;  $L^{Mn}H^{Cu}$ : Excesso de Cu;  $H^{Mn}L^{Cu}$ : Excesso de Mn;  $H^{Mn}H^{Cu}$ : Excesso de Cu e Mn.

#### 4.5.5 Trocas gasosas da folha com o ambiente

Aos sete dias após o início dos tratamentos, a taxa fotossintética líquida ( $A$ ) diminuiu em todas as espécies na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , exceto em *P. plicatum* onde não houve diferença significativa. É possível destacar ainda que a interação da alta concentração de ambos os metais ( $H^{Mn}H^{Cu}$ ) intensificou a diminuição da  $A$  em *A. strigosa* (Figura 7A). Respostas semelhantes à  $A$  foram encontradas para condutância estomática ( $G_s$ ), com modificações apenas em relação a espécie de *P. notatum*, onde houve diminuição da  $G_s$  na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$ , seguido de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , respectivamente (Figura 7B).

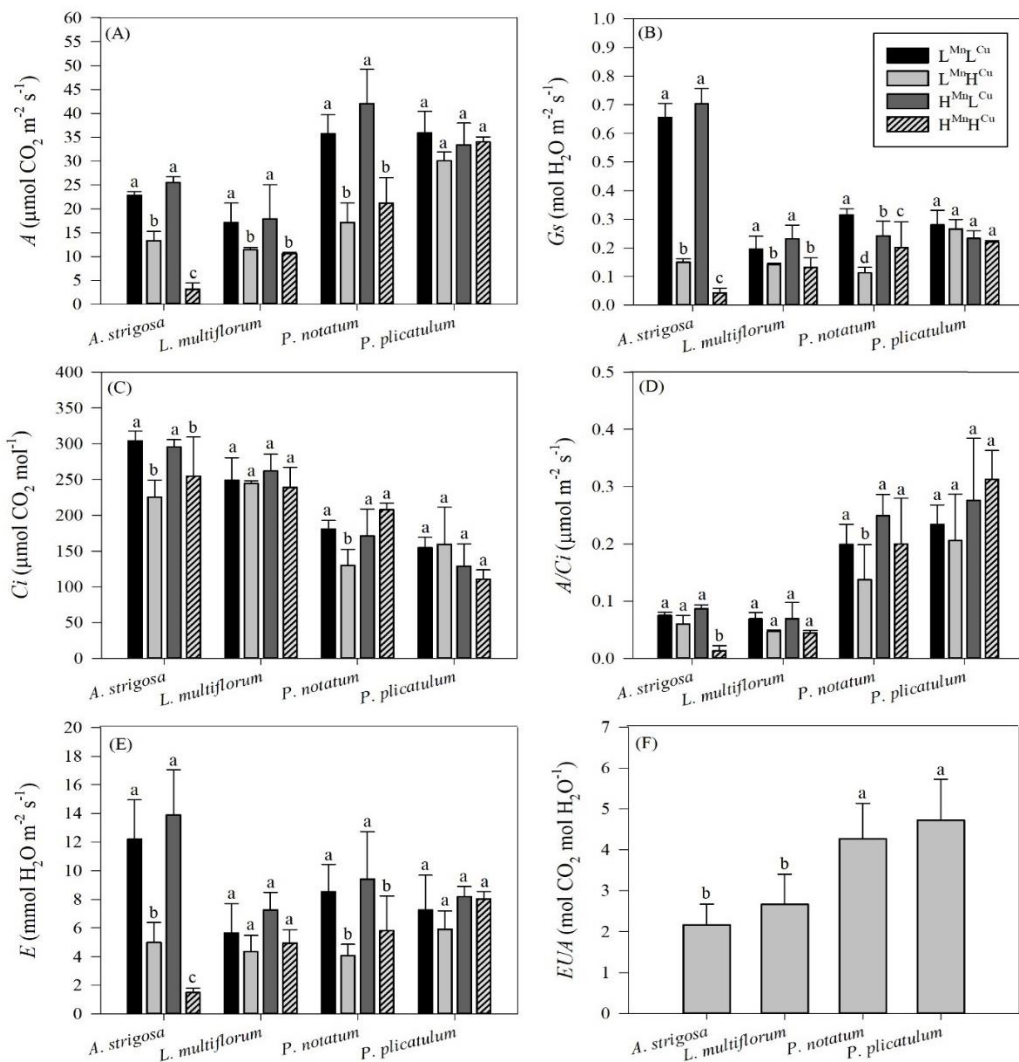


Figura 7. Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), condutância estomática -  $G_s$  (B), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (C), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (D), taxa de transpiração -  $E$  (E) e eficiência do uso da água -  $EUA$  (F) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) aos sete dias após o início dos tratamentos. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

A concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) diminuiu em *A. strigosa* com  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e em *P. notatum* com  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  (Figura 7C). Para eficiência de carboxilação da rubisco ( $A/C_i$ ), houve diminuição em *A. strigosa* com  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e em *P. notatum* com  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ , enquanto as demais interações não diferiram do controle. Em *A. strigosa* e *P. notatum*, as taxas de transpiração ( $E$ ) foram afetadas negativamente com a presença de  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  onde apresentaram os menores valores (Figura 7E). No entanto, para eficiência do uso da água ( $EUA$ ) houve diferença somente entre espécies, onde as gramíneas nativas *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram maior  $EUA$  (Figura 7F).

As respostas fisiológicas relacionadas as trocas gasosas das gramíneas foram sendo modificadas com aumento do período de exposição nas diferentes interações de excesso de Cu e Mn. Aos 17 dias de exposição aos tratamentos, a taxa fotossintética diminuiu em *A. strigosa* e *P. notatum* na presença de excesso de Cu, porém, com maior intensidade em  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ , enquanto  $\text{H}^{\text{MnL}^{\text{Cu}}}$  não diferiu do controle  $\text{L}^{\text{MnL}^{\text{Cu}}}$  (Figura 8A). A taxa fotossintética em *P. plicatulum* diminuiu com a presença de  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ , enquanto em *L. multiflorum* houve redução dessa variável em todas as interações de excesso de Cu e Mn (Figura 8A).

A  $G_s$  diminuiu com as interações combinadas de excesso de Cu ( $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ ), porém, em *L. multiflorum* o excesso de Mn ( $\text{H}^{\text{MnL}^{\text{Cu}}}$ ) também diminuiu essa variável (Figura 8B). A  $C_i$  diminuiu em *A. strigosa* com  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ , mas por outro lado aumentou em *P. notatum* com  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e em *P. plicatulum* com  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  (Figura 9C). Com isso, a  $A/C_i$  diminuiu em *A. strigosa* e *P. plicatulum* com  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ , em *P. notatum* com  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e em *L. multiflorum* com  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ ,  $\text{H}^{\text{MnL}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  (Figura 9D).

A  $E$  diminuiu em todas as espécies na presença de  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  e  $\text{H}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$ , enquanto em *L. multiflorum* a menor taxa foi observada em  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  (Figura 9E). Em *A. strigosa* e *L. multiflorum* houve maior  $EUA$  na presença de  $\text{L}^{\text{MnH}^{\text{Cu}}}$  (Figura 9F).

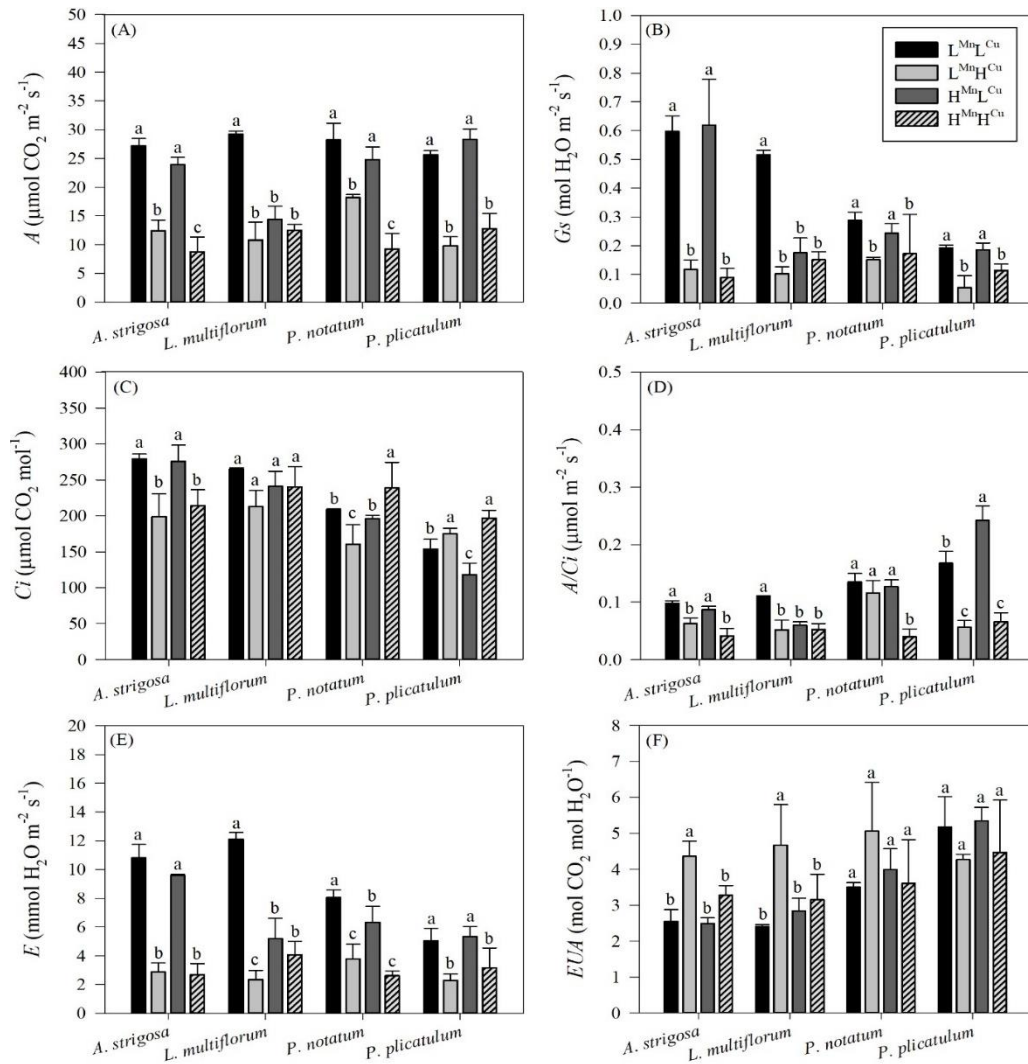


Figura 8. Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), condutância estomática -  $G_s$  (B), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (C), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (D), taxa de transpiração -  $E$  (E) e eficiência do uso da água -  $EUA$  (F) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) aos 17 dias após o início dos tratamentos. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

#### 4.5.6 Pigmentos fotossintéticos

A concentração dos pigmentos fotossintéticos foi alterada em todas as espécies de gramíneas em função da interação do excesso de Cu e Mn, especialmente em função do Cu. De maneira geral, a concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides foram diminuídas na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , quando comparado ao tratamento controle (Figura 9). Entretanto, a concentração de clorofila *a* diminuiu significativamente em folhas de *L. multiflorum* e *P. notatum* com  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 9A), enquanto essa interação também proporcionou diminuição da concentração de clorofila *b* e total em *L. multiflorum* (Figura 9B e



9C). Além disso, é interessante ressaltar que houve diminuição da concentração da clorofila *b* em *L. multiflorum* na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$ , quando comparado ao controle (Figura 9B).

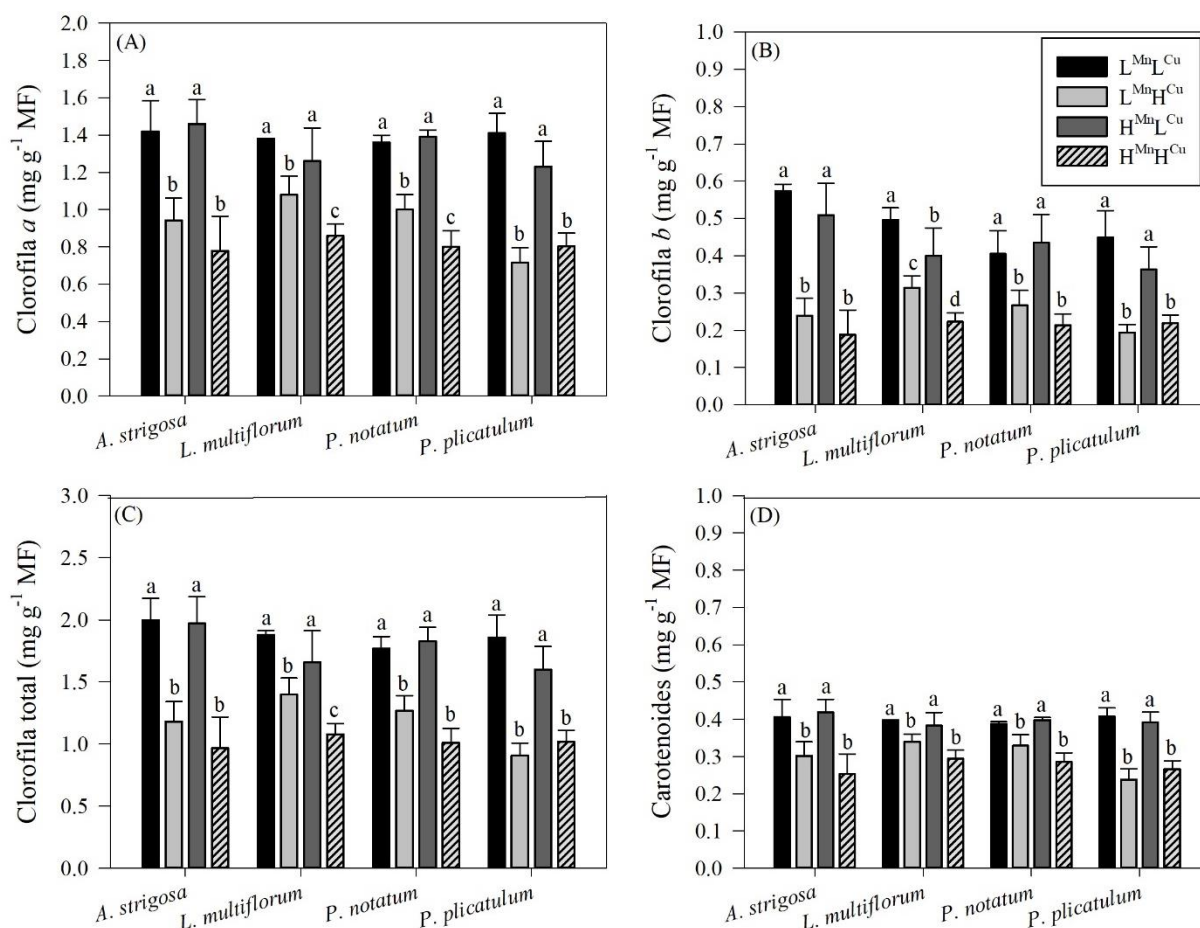


Figura 9. Concentração de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D), de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

#### 4.5.7 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas observou-se que houve aumento da concentração de  $H_2O_2$  em folhas de *A. strigosa* nas interações com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  e em raízes de *P. plicatum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$ , seguido por  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 10A). Contudo, maior peroxidação lipídica foram encontradas em folhas de *P. notatum* com  $H^{Mn}H^{Cu}$  e de *P. plicatum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 10B).

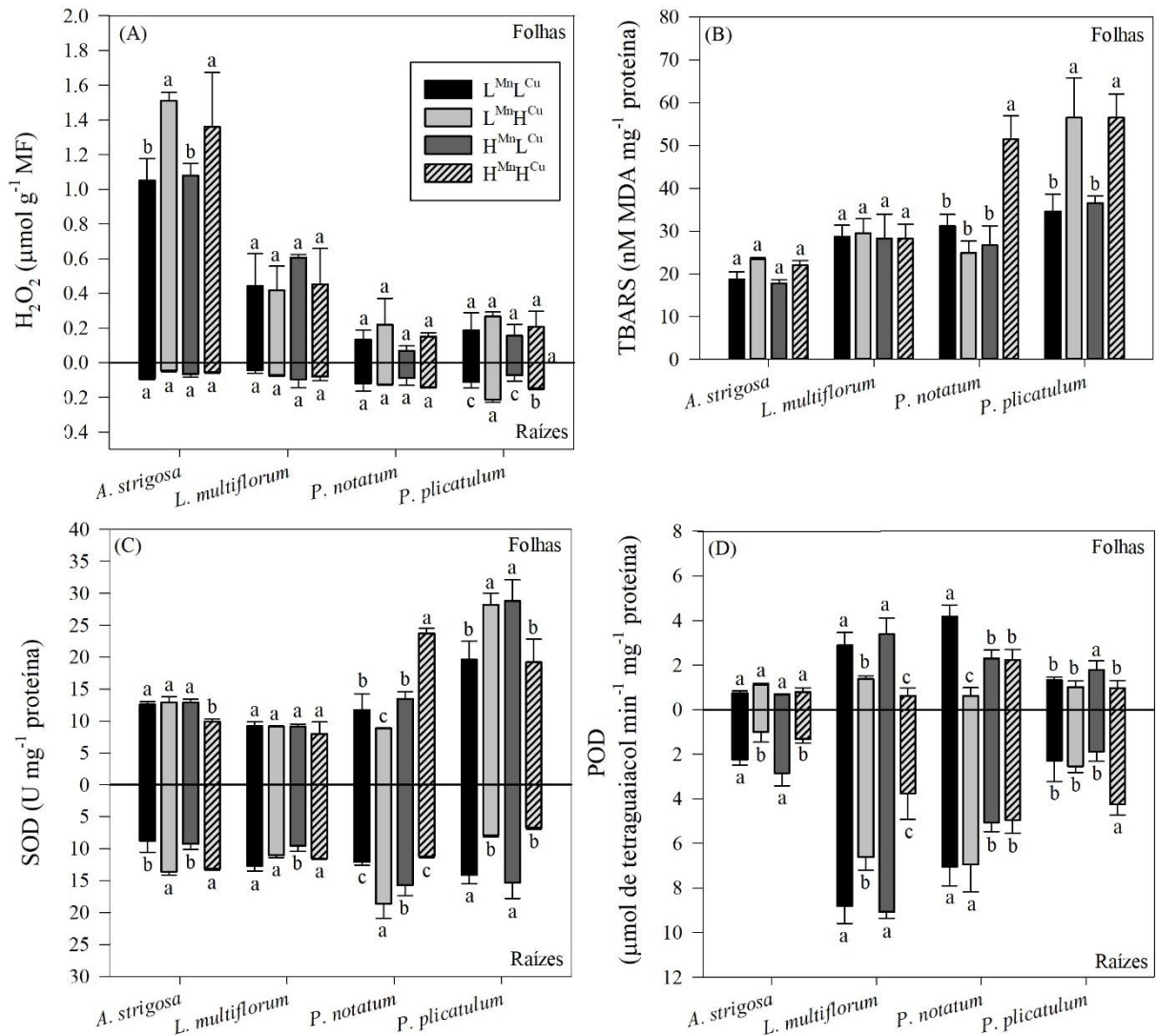


Figura 10. Concentração de peróxido de hidrogênio –  $H_2O_2$  (A) e de malondialdeído -TBARS (B) e atividade enzimática da Superóxido Dismutase – SOD (C) e Guaiacol Peroxidase – POD (D) em raízes e folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). \* Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

A resposta da atividade de enzimas antioxidantes também foi variável em função da espécie de gramínea e de cada interação dos metais. A atividade da SOD diminuiu em folhas de *A. strigosa* com  $H^{Mn}H^{Cu}$ , mas aumentou nas raízes com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 10C). A atividade enzimática da SOD diminuiu nas raízes de *L. multiflorum* com  $H^{Mn}L^{Cu}$  e de *P. plicatulum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , mas aumentou nas raízes de *P. notatum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 10 C). Por outro lado, nas folhas de *P. notatum* houve aumento da atividade da SOD com  $H^{Mn}H^{Cu}$  e diminuição com  $L^{Mn}H^{Cu}$ . Nas folhas de *P. plicatulum*, a atividade da enzima aumentou com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}L^{Cu}$ , quando comparado aos demais tratamentos (Figura 10C).

A atividade enzimática da POD diminuiu nas raízes de *A. strigosa* e *L. multiflorum* com a presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  e de *P. notatum* com  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , mas aumentou nas raízes de *P. plicatum* com  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 10D). Nas folhas de *L. multiflorum* houve diminuição da atividade da POD com  $H^{Mn}H^{Cu}$ , enquanto nas folhas de *P. notatum* houve diminuição mais drástica em  $L^{Mn}H^{Cu}$ . Nas folhas de *P. plicatum* houve aumento na atividade da POD com  $H^{Mn}L^{Cu}$  (Figura 10D).

#### 4.5.8 Densidade estomática

O efeito dos tratamentos promoveu alterações na densidade estomática na epiderme foliar de algumas gramíneas. Na epiderme abaxial de *P. notatum* observou-se maior densidade estomática com  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  e em *P. plicatum* com  $L^{Mn}H^{Cu}$ , resultando na mesma resposta para densidade estomática total (Figura 11A). Na epiderme adaxial houve diferença significativa apenas na espécie de *L. multiflorum*, onde a presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$  proporcionou menor densidade estomática quando comparado aos demais tratamentos. Essa resposta também resultou em menor densidade estomática total nas folhas de *L. multiflorum* (Figura 11B).

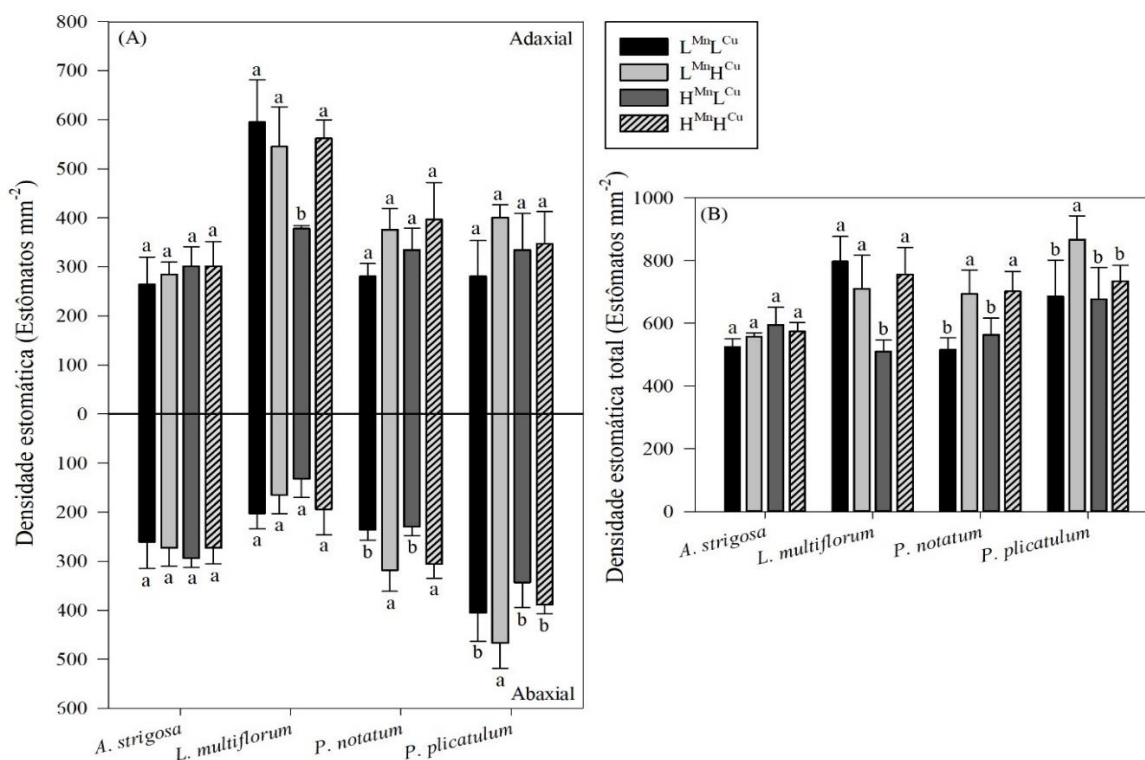


Figura 11. Densidade estomática da epiderme abaxial (A), adaxial (B) e total (C) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão. Adaxial: Epiderme adaxial. Abaxial: Epiderme abaxial.

#### 4.5.9 Biometria do sistema radicular

A biometria do sistema radicular foi afetada com maior expressividade em combinações que continham excesso de Cu, ou seja,  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 12). Na presença dessas combinações houve diminuição do comprimento total de raízes, área superficial e volume radicular em todas as espécies de gramíneas estudadas. Entretanto, em *A. strigosa* também houve diminuição dessas variáveis em  $H^{Mn}L^{Cu}$ , quando comparado com ao controle. Por outro lado, na presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$  houve aumento dessas variáveis em *P. notatum* (Figuras 12A, 12B e 12C, respectivamente). O diâmetro médio das raízes das espécies nativas *P. notatum* e *P. plicatum* aumentaram na presença de  $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ , especialmente em *P. plicatum* com  $H^{Mn}H^{Cu}$ , onde houve aumento da espessura do diâmetro de 65,76% em relação ao controle (Figura 12D).

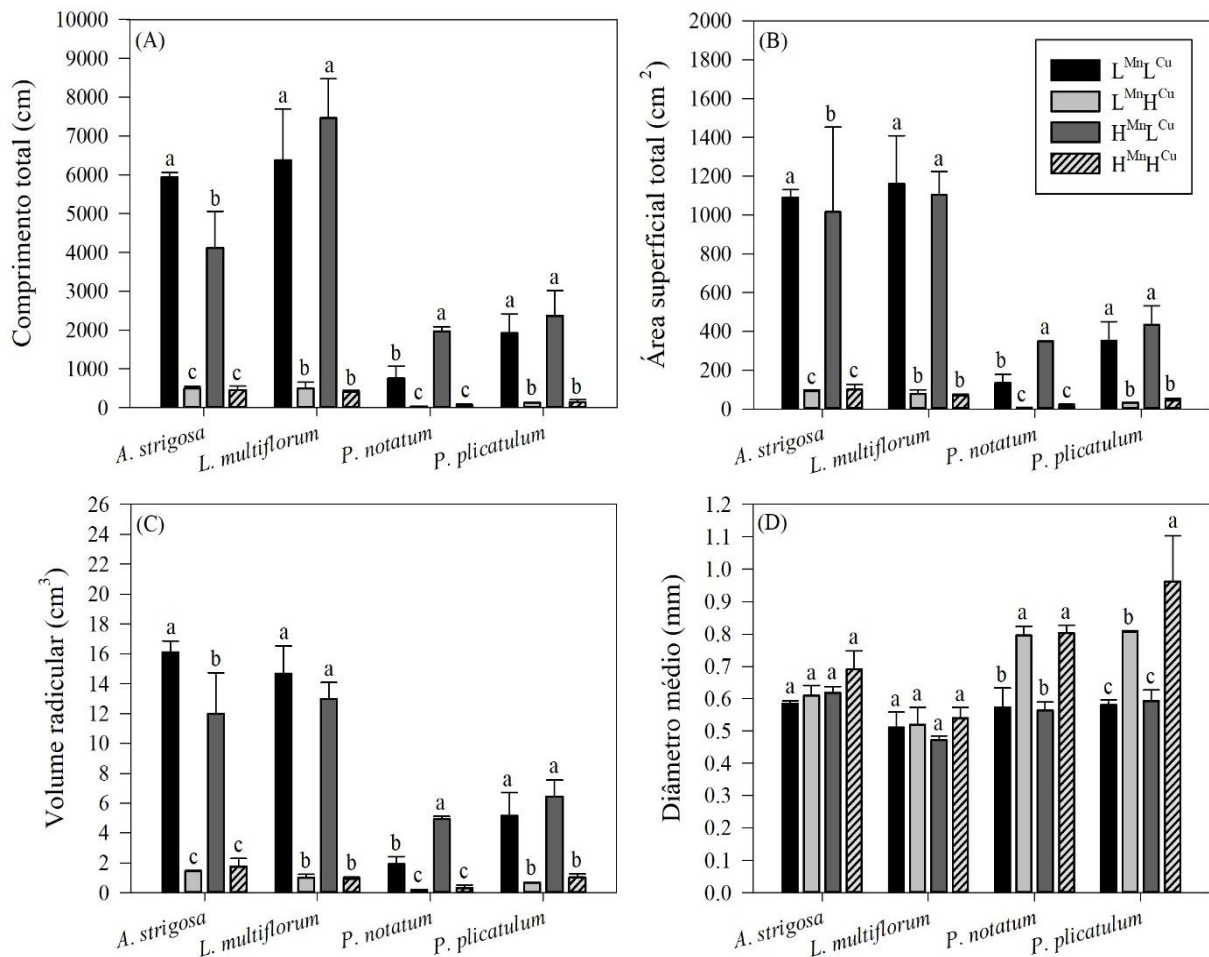


Figura 12. Comprimento total (A), área superficial total (B), volume radicular (C) e diâmetro médio de raízes (D) de gramíneas de cobertura de solo (*A. strigosa*, *L. multiflorum*, *P. notatum* e *P. plicatum*), cultivadas em diferentes combinações de Cu e Mn ( $L^{Mn}L^{Cu}$ ,  $L^{Mn}H^{Cu}$ ,  $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ). \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre combinações de Cu e Mn dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.



## 4.6 DISCUSSÃO

O pH acidificou após cada troca de solução nutritiva para todas as espécies de gramíneas, tornando-se ligeiramente mais ácido nos tratamentos que continham excesso de Cu (Figura 1). A acidificação do pH da solução nutritiva em concentrações mais elevadas de Cu também foram observadas em estudos com *Avena sativa* (MARASTONI et al., 2019a). A acidificação do pH observada para todas as combinações estudadas pode estar relacionada ao processo de absorção ativa de nutrientes, onde ocorre efluxo de  $H^+$  para a solução nutritiva.

A toxicidade por metais provoca lesões na membrana do sistema radicular a partir de ruptura nos meristemas e na zona de alongamento da raiz, o qual resulta na liberação de prótons para a solução nutritiva (KOPITTKKE; BLAMEY; MENZIES, 2008; LEQUEUX et al., 2010; MARASTONI et al., 2019a). Portanto, a acidificação ligeiramente mais intensa observada em combinações contendo excesso de Cu, pode ser em decorrência desse vazamento de prótons.

As lesões nas membranas de células de raízes causadas pelo excesso de Cu podem resultar em escurecimento do ápice das raízes, como observado no presente estudo. Além disso, a liberação de exsudatos radiculares contendo diversos compostos orgânicos na solução podem complexar os metais e, assim, influenciar a disponibilidade do Cu (BRUNETTO et al., 2016) e Mn (TIECHER et al., 2017) e, conseqüentemente sobre o pH da solução nutritiva. Portanto, o aumento da síntese de compostos orgânicos e exsudação pelas raízes das plantas podem favorecer a homeostase do metal, o qual é interessante para fitoestabilização e/ou fitorremediação de metais (DE CONTI et al. 2019), bem como provocar mudanças no pH da solução nutritiva.

Os excessos de Cu e Mn na solução nutritiva, especialmente no excesso de Cu ( $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) afetaram negativamente todas as respostas fisiológicas, bioquímicas e nutricionais das plantas, porém, as respostas foram variáveis em função de cada espécie de gramínea. O excesso de Cu causa anormalidades no sistema radicular das plantas a partir da inibição do crescimento, aumento da espessura e escurecimento das raízes (KUMAR et al., 2021; MARASTONI et al., 2019a). No presente estudo, inicialmente os tratamentos contendo excesso de Cu promoveram o aparecimento desses sintomas visuais, que incluem o escurecimento das pontas das raízes e a redução do crescimento das gramíneas. Contudo, as anormalidades no sistema radicular ocorrem antes de afetar o crescimento da parte aérea (Figura 6).

Conforme aumenta o período de exposição das plantas ao excesso de Cu, tem-se redução do crescimento da parte aérea e aparecimento de sintomas visuais nas folhas caracterizados por clorose internerval. A presença de  $H^{Mn}L^{Cu}$  não influenciou sobre o crescimento do sistema

radicular, mas as combinações contendo excesso de Mn ( $H^{Mn}L^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) possibilitou o aparecimento de manchas necróticas nas folhas velhas somente em plantas de *L. multiflorum*. Esses sintomas visuais são característicos de toxicidade por excesso de Mn (FERNANDO e LYNCH, 2015).

Como esperado, a concentração de Cu e Mn aumentaram nas raízes e parte aérea conforme o aumento da concentração na solução nutritiva (Figuras 2 e 3). Os resultados demonstraram que os tecidos radiculares são os principais locais de acúmulo de Cu, corroborando com alguns relatos da literatura (LU et al., 2017; MARASTONI et al., 2019a; ZHAO et al., 2010). Entretanto, as gramíneas translocaram uma quantidade significativa desses metais para a parte aérea, podendo influenciar sobre as respostas fisiológicas das plantas. Por outro lado, normalmente a maior concentração de Mn ocorre na parte aérea das plantas (MAGRI et al., 2020). Essa característica também foi observada nas gramíneas nativas de *P. notatum* e *P. plicatum*, porém, nas gramíneas exóticas, *A. strigosa* e *L. multiflorum*, observou-se maior concentração de Mn nas raízes (Figura 3A), que pode ser considerado um mecanismo de tolerância a fim de evitar maiores danos se eles forem translocados para a parte aérea.

Um resultado interessante observado foi que a interação do excesso de Cu e Mn ( $H^{Mn}H^{Cu}$ ) diminuiu a concentração de Cu na parte aérea e aumentou nas raízes de *P. notatum* e *P. plicatum*, quando comparado ao excesso de Cu ( $L^{Mn}H^{Cu}$ ). Além disso, a concentração de Mn na parte aérea de *P. plicatum* diminuiu na presença de  $H^{Mn}H^{Cu}$  quando comparado ao excesso de Mn ( $H^{Mn}L^{Cu}$ ). Dessa forma, entende-se que para essa gramínea, a interação do excesso dos metais diminuiu a translocação para a parte aérea permitindo o acúmulo de grandes quantidades nas raízes das plantas como um mecanismo de tolerância a fim de evitar danos ao metabolismo na parte aérea. Por outro lado, a maior concentração de Cu encontrada nas raízes de todas as gramíneas na presença de  $H^{Mn}H^{Cu}$  possivelmente ocorrem pela competição entre os dois metais, impedindo que Cu seja transportado para a parte aérea. Entretanto, a concentração de Cu não apresentou diferenças significativas na parte aérea de *A. strigosa* e *L. multiflorum* com a presença de  $H^{Mn}H^{Cu}$  em relação ao  $L^{Mn}H^{Cu}$  (Figura 2A).

De maneira geral, todas as gramíneas apresentaram capacidade de concentrar grandes quantidades dos metais nos tecidos em níveis acima dos considerados críticos para a maioria das culturas agrícolas. Normalmente, a concentração de Mn nos tecidos acima de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca e de Cu superior à  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  são consideradas tóxicas para a maioria das culturas (MARSCHNER, 2012; SHARMA, NAGPAL, KAUR, 2018). Assim sendo, se observa que o excesso dos elementos promoveu concentrações nos tecidos acima desses níveis e, que mesmo

sobrevivendo a tal condição, resultou em alterações no metabolismo, sintomas de toxicidade, redução de crescimento e estado nutricional das plantas.

Dentre os distúrbios fisiológicos causados pela toxicidade de metais, a alteração do estado nutricional das plantas é um parâmetro que pode ser afetado e pode ocorrer de forma sinérgica, antagônica ou competitiva com outros nutrientes e é variável entre espécies (DE CONTI et al., 2019; MARASTONI et al., 2019b). Alguns estudos apontam que a toxicidade por Cu provoca deficiência induzida de outros nutrientes nos tecidos, como Fe e Zn (KOPITTKE e MENZIES, 2006; MARASTONI et al., 2019a). De fato, essa resposta se confirma com os resultados encontrados, pois a interação contendo excesso de Cu ( $H^{Mn}H^{Cu}$  ou  $L^{Mn}H^{Cu}$ ) diminuiu a concentração desses micronutrientes nos tecidos de determinadas gramíneas (Tabela 1). A redução da concentração desses nutrientes nos tecidos pode impactar sobre algumas respostas fisiológicas nas plantas, como a fotossíntese, discutida mais adiante.

O aumento da concentração de Cu na solução nutritiva também pode resultar em diminuição da absorção e concentração de P e K nos tecidos (AMBROSINI et al., 2018). Portanto, essa afirmação corrobora com os resultados encontrados em relação ao K, em que as interações contendo excesso de Cu resultaram em menores concentrações de K nos tecidos de todas as gramíneas. Essa redução significativa da concentração do K, especialmente na parte aérea, pode influenciar sobre outras respostas fisiológicas que incluem a diminuição na condutância estomática, taxa de fotossíntese líquida e carregamento de fotoassimilados no floema (ANSCHÜTZ; BECKER; SHABALA, 2014), sendo algumas dessas respostas verificadas nas gramíneas desse estudo.

Em estudo avaliando o crescimento de *Avena strigosa* em solo contaminado com Cu, De Conti et al. (2018) observaram ligeiro aumento nas concentrações de Ca e Mg nos tecidos de parte aérea conforme o aumento da concentração de Cu no solo. De forma contrária, no presente estudo, as concentrações de Mg diminuíram nos tecidos de praticamente todas as gramíneas com interações contendo excesso de Cu e para algumas combinações com excesso de Mn (Tabela 1). O excesso de metais também pode promover formação de complexos entre o metal e clorofilas, como a substituição do Mg pelo Cu ou Mn em função da similaridade do raio iônico (MAGRI et al., 2020; MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2009), podendo alterar suas funções, bem como intensificar os sintomas de clorose foliar. O Ca, por sua vez, parece ter sido afetado de forma mais significativa com as interações contendo excesso de Mn.

Dessa forma, o excesso de metais pesados compromete a absorção de outros elementos minerais essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas (KUMAR et al, 2021). A presença do excesso de Cu e Mn separadamente ou combinados na solução nutritiva, demonstra

as interações que existem entre os nutrientes e alterações no estado nutricional causado nos tecidos das plantas. Portanto, concentrações de Cu e Mn em excesso alteram a composição mineral das plantas e resultam em modificações das respostas fisiológicas e bioquímicas e, conseqüentemente, do potencial produtivo das gramíneas.

O efeito combinado do excesso de Cu e Mn ( $H^{Mn}H^{Cu}$ ), ou apenas no excesso de Cu ( $L^{Mn}H^{Cu}$ ), diminuíram significativamente o crescimento, em função da redução de massa seca de raízes, parte aérea e do número de perfilhos (Figura 4). Para a maioria das espécies estudadas, o excesso de Cu foi consideravelmente mais tóxico que o Mn. Mas, de maneira geral, mesmo que as diferentes gramíneas sobreviveram com as elevadas concentrações desses metais, as plantas apresentaram maior suscetibilidade à alta concentração de Cu e maior tolerância em relação ao excesso de Mn.

Um efeito predominante da exposição das plantas ao excesso de Cu é a diminuição do crescimento e biomassa de raízes e parte aérea, sendo que os efeitos tóxicos são variáveis em função da espécie (ADREES et al., 2015; SALEEM et al., 2020b). Da mesma forma, a interação de altas concentrações de Cu e Zn em *A. strigosa* resultou em menor produção de biomassa nas interações que continha excesso de Cu (TIECHER et al., 2016). Em outro estudo com duas cultivares de *Avena sativa* também houve diminuição da biomassa de raízes e de parte aérea, quando cultivadas com alta concentração de Cu (MARASTONI et al., 2019b). Portanto, a redução da biomassa e do crescimento radicular, assim como clorose foliar, são respostas comumente encontradas em condições de excesso de Cu (KUMAR et al., 2021; LANGE et al., 2017). Além disso, a diminuição na quantidade de perfilhos também contribui para os menores resultados de biomassa.

O Cu em excesso afeta muitos processos fisiológicos nas plantas (BRUNETTO et al., 2016). A redução do crescimento e desenvolvimento das plantas quando expostas em condições de excesso dos metais, principalmente Cu, pode ser atribuído à diminuição da assimilação de carbono no processo de fotossíntese (CAMBROLLÉ et al., 2015). Essa redução da assimilação de carbono é o resultado de alterações na composição de membranas dos cloroplastos, diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos e estresse oxidativo causado pelo aumento da concentração de ERO a nível celular (ADREES et al., 2015; KUMAR et al., 2021; SALEEM et al., 2020b).

Contudo, a diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos e estresse oxidativo está indiretamente relacionada com a “deficiência induzida” provocada pelo excesso de Cu sobre outros nutrientes (SALEEM et al., 2020b), conforme já discutido. Além disso, o excesso de Cu causa danos estruturais e afeta o funcionamento do aparato fotossintético. Os

danos estruturais estão relacionados à degradação da estrutura interna do cloroplasto a partir a degradação dos lipídios da membrana celular, o qual resulta em diminuição da assimilação fotossintética do carbono (CAMBROLLÉ et al., 2015). Ainda, existem evidências que o excesso de Cu afeta os dois fotossistemas, sendo que o fotossistema II tende a ser mais sensível à toxicidade de Cu (YRUELA, 2009).

A variável  $A/C_i$  está diretamente relacionada à taxa fotossintética líquida e concentração intercelular de  $CO_2$ , pois quanto maior tende ser a taxa fotossintética líquida e menor concentração intercelular de  $CO_2$ , maior será a eficiência de carboxilação. A diminuição das concentrações intercelulares de  $CO_2$  encontradas nas diferentes gramíneas podem ser justificadas pela maior capacidade de assimilação do carbono no processo fotossintético ou pela restrição da entrada do  $CO_2$  em função da diminuição da condutância estomática. Da mesma forma, a condutância estomática influencia sobre a taxa de transpiração e conseqüentemente, sobre a eficiência do uso da água. Além disso, a diminuição da taxa fotossintética na presença de excesso de Cu (Figuras 7A e 8A), pode ser justificada pela redução da condutância estomática (Figuras 7B e 8B), que acaba limitando a capacidade de trocas gasosas da folha. Em plantas cultivadas com excesso de Cu, Trentin et al. (2019) também encontraram diminuição na taxa fotossintética, porém, associaram esse efeito à menor concentração de clorofila nas folhas, pois a toxicidade de Cu também afeta algumas enzimas associadas a biossíntese de clorofila (ADREES et al., 2015; SALEEM et al., 2020b). Essa resposta corrobora com o presente estudo, pois a diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos limita a capacidade das folhas absorver energia luminosa e, conseqüentemente, a fotossíntese.

A diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos, como clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, é comum em plantas que crescem em ambientes com excesso de metais pesados (AMBROSINI et al., 2018; HAMMERSCHMITT et al., 2020, SCHWALBERT et al., 2021; TIECHER et al., 2016), bem como pode causar inibição da fotossíntese (DING et al., 2017). No presente estudo, as concentrações de clorofilas e carotenoides diminuíram bastante na presença das interações que continham excesso de Cu (Figura 9). Há evidências que a redução da biossíntese de clorofila em elevadas concentrações de Cu, está relacionada a danos estruturais provocados nos tilacoides dos cloroplastos ou à interferência na organização da molécula de clorofila (ADREES et al., 2015).

A redução da concentração de pigmentos pode estar relacionada com a variação da concentração de nutrientes nos tecidos das plantas. Isso se justifica pela interação entre Fe e Cu, por exemplo, onde a deficiência de Fe pode ser induzida pelo excesso de Cu e promover alterações na síntese de clorofila e carotenoides (YRUELA, 2009). Isso pode justificar as

respostas observadas na *A. strigosa* e *P. plicatulum* com interação de excesso de Cu, onde houve diminuição da concentração de Fe na parte aérea, associado à redução da concentração dos pigmentos fotossintéticos. A deficiência de Fe pode afetar as proteínas Fe-S, responsáveis pelo fluxo de elétrons da fotossíntese, impedindo o transporte de elétrons e potencializando a produção de ERO na célula (YRUELA, 2009). De forma semelhante, a interação com excesso de Cu promoveu diminuição da concentração de Zn nos tecidos de parte aérea de todas as espécies estudadas, ou seja, o excesso de Cu também promoveu “deficiência induzida” de Zn.

Em condição de excesso de metais, os pigmentos fotossintéticos, fotossíntese e produção de biomassa são variáveis que normalmente são afetadas pelo estresse oxidativo causado a nível celular pelo aumento da concentração de ERO (ADREES et al., 2015). O estresse oxidativo foi induzido principalmente em interações contendo excesso de Cu, enquanto as respostas antioxidantes de SOD e POD foram bastante variáveis entre as interações (Figura 10). Dessa forma, as respostas ao estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes também são dependentes das espécies de plantas (FEIGL et al., 2013; YRUELA et al., 2009). Assim, observou-se que nas folhas de *A. strigosa* e raízes de *P. plicatulum* houve aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em interações com alto Cu, enquanto maior peroxidação lipídica (medida pela concentração de MDA) foram observadas em folhas de *P. plicatulum* com interações contendo excesso de Cu e em *P. notatum* com a interação de excesso de Cu e Mn (Figura 10). Esses resultados demonstram a variabilidade de resposta entre as espécies, mas é importante destacar que houve maior peroxidação lipídica em folhas de *P. notatum* com a combinação do excesso de Cu e Mn, fato que demonstra alta sensibilidade dessa espécie.

A peroxidação lipídica, caracterizada pelo aumento da concentração de MDA, é um indicador do dano oxidativo nas células ocasionados por fatores estressantes e interfere sobre várias vias metabólicas e macromoléculas essenciais as células (JUANG et al., 2019), bem como sobre modificações na composição e organização das membranas dos tilacoides dos cloroplastos (TIECHER et al., 2017), o que pode interferir sobre proteínas e no funcionamento do aparato fotossintético. Além disso, o estresse por Cu induz a peroxidação lipídica e causa oxidação de vários componentes orgânicos, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, além de interferir sobre a fluidez das membranas nas células (MARQUES et al., 2018). Portanto, o dano celular ocasionado pelas ERO, como a peroxidação lipídica, pode justificar em parte as respostas fotossintéticas obtidas por algumas espécies no presente estudo. Por outro lado, o dano celular provocado pelas ERO é mais agravante quando a planta não consegue ativar o sistema antioxidante ou quando a concentração de ERO é superior a capacidade de desintoxicação pelas enzimas antioxidantes (SAVCHENKO e TIKHONOV, 2021).

Normalmente, o excesso de metais ativa genes defensivos que promovem aumento de enzimas antioxidantes, como POD e SOD, para remoção do excesso de ERO (KUMAR et al., 2021). A SOD dismuta os íons superóxido em oxigênio e  $H_2O_2$ , enquanto a POD promove a desintoxicação de  $H_2O_2$  em oxigênio e  $H_2O$  (SIDHU et al., 2020). Algumas inferências demonstram que a atividade da SOD e POD são aumentadas conforme o aumento crescente de Cu (SALEEM et al., 2020a). No presente estudo, as respostas antioxidantes enzimáticas foram variáveis entre as espécies, com destaque principalmente para alta atividade das enzimas nas raízes de algumas gramíneas e em interações com altas concentrações de Mn, sendo que a condição que apresentou maior concentração de  $H_2O_2$  ou peroxidação lipídica não apresentou, necessariamente, maiores atividades das enzimas antioxidantes (Figura 10). Isso ocorre em função do aumento das concentrações dos metais no meio de crescimento aumentar a produção de ERO e da atividade de enzimas antioxidantes das plantas até determinado nível, sendo que a partir disso a atividade pode ser diminuída em função da toxicidade causada pelos metais, principalmente em excesso de Cu (ADREES et al., 2015).

Com o excesso de Cu e Mn, combinado ou não, esperava-se obter altas atividades das enzimas antioxidantes SOD e POD. Entretanto, a atividade das enzimas nas raízes e folhas de gramíneas foram diminuídas para a maioria dos tratamentos contendo excesso de Cu. Respostas semelhantes a essas foram encontradas para outras espécies como *Boehmeria nivea*, *Colobanthus quitensis* e *Phaseolus vulgaris*, onde o aumento excessivo da concentração de Cu diminuiu significativamente a atividade das enzimas antioxidantes (CONTRERAS et al., 2018; REHMAN et al., 2019; YOUNIS, TOURKY; ELSHARKAMY, 2018).

A exposição ao excesso de metais pode resultar em alterações morfofisiológicas nas folhas (MARTINS et al., 2021). Portanto, o número de estômatos por área foliar pode ser alterado em função de condições estressantes, como a exposição à metais pesados, sendo que o aumento ou diminuição da densidade estomática são dependentes da espécie e também da concentração do metal (ANDRADE JUNIOR et al., 2019). Isso se confirma pela variabilidade de respostas encontradas nas gramíneas estudadas (Figura 11). A diminuição na densidade estomática nas folhas das plantas pode ser considerado um mecanismo de tolerância ao excesso de metais, a fim de reduzir a transpiração e, conseqüentemente, a absorção dos metais (ANDRADE JUNIOR et al., 2019). Entretanto, essa resposta não corrobora com os resultados encontrados com as gramíneas estudadas, pois a transpiração foliar (Figura 8E) foi severamente reduzida com a interação contendo excesso de Cu, enquanto a densidade estomática não foi diminuída nessas mesmas condições (Figura 11).

A densidade estomática também pode afetar diretamente a condutância estomática das plantas (MARTINS et al., 2021). Porém, no presente estudo, apenas a espécie de *P. notatum* apresentou respostas correlacionadas entre condutância (Figura 8B) e densidade estomática (Figura 11B), sendo que tratamentos com excesso de Cu promoveram maiores densidades estomáticas, mas por outro lado diminuiram significativamente a condutância estomática. Isso permite inferir que as interações com excesso de Cu não influenciaram negativamente a densidade estomática nas folhas, mas diminuiram a taxa de transpiração e condutância estomática de todas as gramíneas. No entanto, apesar da maior densidade estomática, as plantas podem responder diante de estresse por excesso de metais (especialmente contendo excesso de Cu) com o fechamento estomático, isso reduz a condutância estomática e transpiração excessiva. Resultados semelhantes também foram obtidos para *Biscutella auriculata* em resposta a toxicidade de Cu (PECO et al., 2020).

Além das alterações provocadas a nível morfológico, fisiológico, nutricional e bioquímico nas plantas, a biometria do sistema radicular de todas as espécies de plantas também foi afetada negativamente pelo excesso de metais, especialmente no excesso de Cu, em todas as variáveis avaliadas (Figura 12). Contudo, os resultados obtidos corroboram aos encontrados por outros pesquisadores, onde também houve redução do comprimento, área superficial e volume de raízes e aumento da espessura de raízes em função do aumento da concentração de Cu (BATOOL et al., 2015; FEIL et al., 2020; MARASTONI et al., 2019a). A diminuição do crescimento do sistema radicular em excesso de Cu está relacionada com a inibição do alongamento e divisão celular que ocorre no meristema apical da raiz (AMBROSINI et al., 2015) e essa inibição pode justificar a menor produção de massa seca da parte aérea (TIECHER et al., 2016) e alterações no estado nutricional das plantas.

O aumento da área superficial total e volume radicular estão associados à maior capacidade de absorção de nutrientes pela planta, sendo que a redução desses parâmetros resulta em diminuição da massa seca de raízes e de parte aérea (KUMAR et al., 2021). Por outro lado, o aumento do diâmetro médio de raízes, como observado nas gramíneas nativas (Figura 12D), pode ser uma estratégia de defesa da planta ao estresse por Cu, pois tem-se aumento da área do apoplasto e pode permitir maior retenção de metais nas raízes (MARASTONI et al., 2019a; TIECHER et al., 2017).

O presente estudo demonstrou que a exposição ao excesso de metais pesados, principalmente Cu, promoveram redução da produção de biomassa (Figuras 4 e 6), assim como nos parâmetros fotossintéticos (Figuras 7 e 8) e sobre as características biométricas do sistema radicular (Figura 12). Alguns desses efeitos também foram observados em outras espécies



cultivadas com altas concentrações do elemento (AMBROSINI et al., 2015; FEIL et al., 2020; MARASTONI et al., 2019a). Isso demonstra que as espécies apresentam comportamentos diferentes, confirmando que a toxicidade dos metais é dependente da espécie ou cultivar e também da concentração do elemento no meio (DE CONTI et al., 2018).

#### 4.7 CONCLUSÃO

As gramíneas de cobertura de solo possuem capacidade de apresentar altas concentrações de Cu e Mn nos seus tecidos, onde o Cu é armazenado em maior quantidade nas raízes, enquanto o Mn nas raízes para espécies de *A. strigosa* e *L. multiflorum* e na parte aérea para *P. notatum* e *P. plicatulum*. A combinação  $H^{Mn}H^{Cu}$  não aumentou a concentração de Mn na parte aérea das espécies quando comparado somente ao  $H^{Mn}L^{Cu}$ . Porém, o efeito combinado de  $H^{Mn}H^{Cu}$  aumentou a concentração de Cu nas raízes de todas as espécies e diminuiu a concentração na parte aérea de *P. notatum* e *P. plicatulum* em relação ao excesso somente de Cu. Além disso, o excesso dos metais provoca alterações sobre a absorção e concentração de macronutrientes e micronutrientes nos tecidos das plantas.

O excesso de Cu é potencialmente mais tóxico para as gramíneas do que o excesso de Mn, sendo que a combinação  $H^{Mn}H^{Cu}$  não intensifica o efeito da toxicidade sobre a produção de biomassa, taxa de crescimento, biometria do sistema radicular e densidade estomática quando comparado somente ao excesso de Cu ( $L^{Mn}H^{Cu}$ ). O excesso de Cu intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio e afeta a concentração de pigmentos fotossintéticos e atividade de enzimas antioxidantes, assim como o processo de fotossíntese. A  $H^{Mn}L^{Cu}$  afeta negativamente o processo de fixação de  $CO_2$  da fotossíntese apenas para a espécie *L. multiflorum* durante períodos mais longos de excesso do metal.

Portanto, o presente estudo fornece uma caracterização detalhada e possível predição de respostas fisiológicas e bioquímicas de gramíneas de cobertura de solo presentes em áreas de vinhedos do bioma Pampa sob combinações de excesso de Cu e Mn. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender de forma mais abrangente as respostas adotadas pelas plantas, assim como constatar se essas respostas se mantêm no cultivo em solo com excesso desses metais e a contribuição que as gramíneas de cobertura de solo podem proporcionar às videiras quando cultivadas em consórcio.

AGRADECIMENTOS: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### 4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADREES, M. et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 11, p. 8148-8162, 2015.

AMBROSINI, V. G. et al. High copper content in vineyard soils promotes modifications in photosynthetic parameters and morphological changes in the root system of 'Red Niagara' plantlets. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 89-98, 2018.

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

ANDRADE JÚNIOR, W. V. et al. Effect of cadmium on young plants of *Virola surinamensis*. **AoB Plants**, v. 11, n. 3, p. plz022, 2019.

ANSCHÜTZ, U.; BECKER, D.; SHABALA, S. Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 9, p. 670-687, 2014.

BALDI, E. et al. Soil-applied phosphorous is an effective tool to mitigate the toxicity of copper excess on grapevine grown in rhizobox. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 102-111, 2018.

BATOOL, R. et al. Physio-anatomical responses of plants to heavy metals. In: **Phytoremediation for green energy**. Springer, Dordrecht, 2015. p. 79-96.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUNETTO, G. et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016.

CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v. 120, p. 171-178, 2015.

CAMPOS, M. L. et al. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 15, p. 4347-4361, 2009.

CONTRERAS, R. A. et al. Copper stress induces antioxidant responses and accumulation of sugars and phytochelatins in Antarctic *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Biological research**, v. 51, 2018.

DE CONTI, L. et al. Growth and chemical changes in the rhizosphere of black oat (*Avena strigosa*) grown in soils contaminated with copper. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 163, p. 19-27, 2018.

DE CONTI, L. et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019.

DE CONTI, L. et al. Soil solution concentrations and chemical species of copper and zinc in a soil with a history of pig slurry application and plant cultivation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 216, p. 374-386, 2016.

DING, S. et al. Exogenous glutathione enhances cadmium accumulation and alleviates its toxicity in *Populus × canescens*. **Tree physiology**, v. 37, n. 12, p. 1697-1712, 2017.

EL-MOSHATY, F. I. B. et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, n. 2, p. 109-119, 1993.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos plantas e fertilizantes**. 2 ed., Brasília, 2009. 627 p.

FEIGL, G. et al. Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 94, p. 179-189, 2013.

FERNANDO, D. R.; LYNCH, J. P. Manganese phytotoxicity: new light on an old problem. **Annals of botany**, v. 116, n. 3, p. 313-319, 2015.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952, 2014.

GIROTTO, E. et al. Biochemical changes in black oat (*Avena strigosa* Schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 199-207, 2016.

GIROTTO, E. et al. Copper availability assessment of Cu-contaminated vineyard soils using black oat cultivation and chemical extractants. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 12, p. 9051-9063, 2014.

HAMMERSCHMITT, R. K. et al. Copper and zinc distribution and toxicity in 'Jade'/'Genovesa' young peach tree. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108763, 2020.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1132-1334, 1979.

HUANG, H. et al. Physiological responses of *Broussonetia papyrifera* to manganese stress, a candidate plant for phytoremediation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 181, p. 18-25, 2019.

JUANG, K. W. et al. Effects of copper on root morphology, cations accumulation, and oxidative stress of grapevine seedlings. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 102, n. 6, p. 873-879, 2019.

KOMÁREK, M. et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environment international**, v. 36, n. 1, p. 138-151, 2010.

KOPITTKE, P. M.; BLAMEY, F. P. C.; MENZIES, N. W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant and Soil**, v. 303, n. 1-2, p. 217-227, 2008.

KOPITTKE, P. M.; MENZIES, N. W. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, v. 279, n. 1, p. 287-296, 2006.

KUMAR, V. et al. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, p. 127810, 2021.

LANGE, B. et al. Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. **New Phytologist**, v. 213, n. 2, p. 537-551, 2017.

LEGUIZAMO, M. A. O.; GÓMEZ, W. D. F.; SARMIENTO, M. C. G. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands-a review. **Chemosphere**, v. 168, p. 1230-1247, 2017.

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, n. 8, p. 673-682, 2010.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.

LU, L. et al. Spatial imaging and speciation of Cu in rice (*Oryza sativa* L.) roots using synchrotron-based X-ray microfluorescence and X-ray absorption spectroscopy. **Chemosphere**, v. 175, p. 356-364, 2017.

MAGRI, E. et al. Manganese hyperaccumulation capacity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. and occurrence of interveinal chlorosis induced by transient toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 111010, 2020.

MARASTONI, L. et al. Synergism and antagonisms between nutrients induced by copper toxicity in grapevine rootstocks: Monocropping vs. intercropping. **Chemosphere**, v. 214, p. 563-578, 2019b.

MARASTONI, L. et al. The potential of two different *Avena sativa* L. cultivars to alleviate Cu toxicity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 182, p. 109430, 2019a.

MARQUES, D. M. et al. Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 5, p. 1-14, 2018.

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Third. Academic Press, London. 2012.

MARTINS, J. P. R. et al. Morphophysiological responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) to excess copper during in vitro culture. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 155, n. 3, p. 447-456, 2021.

MILLALEO, R. et al. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 4, p. 470-481, 2010.

MIOTTO, A. et al. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, n. 1, p. 593-610, 2014.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

PAN, G. et al. Integrative study of subcellular distribution, chemical forms, and physiological responses for understanding manganese tolerance in the herb *Macleaya cordata* (papaveraceae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 181, p. 455-462, 2019.

PECO, J. D. et al. Characterization of the biochemical basis for copper homeostasis and tolerance in *Biscutella auriculata* L. **Physiologia Plantarum**, 2020.

QUADROS, F. D.; TRINDADE, J. P. P.; BORBA, M. A abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. **Campos Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, cap. v. 15, p. 206-213, 2009.

REHMAN, M. et al. Morpho-physiological traits, antioxidant capacity and phytoextraction of copper by ramie (*Boehmeria nivea* L.) grown as fodder in copper-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5851-5861, 2019.

SALEEM, M. H. et al. Appraising growth, oxidative stress and copper phytoextraction potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) grown in soil differentially spiked with copper. **Journal of environmental management**, v. 257, p. 109994, 2020a.

- SALEEM, M. H. et al. Morpho-physiological traits, biochemical response and phytoextraction potential of short-term copper stress on kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seedlings. **PeerJ**, v. 8, p. e8321, 2020b.
- SANTOS, E. F. et al. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant physiology and biochemistry**, v. 113, p. 6-19, 2017.
- SAVCHENKO, T.; TIKHONOV, K. Alteração do metabolismo central da planta induzida pelo estresse oxidativo. **Vida**, v. 11, n. 4, pág. 304, 2021.
- SCHWALBERT, R. et al. Soil tillage affects soybean growth and promotes heavy metal accumulation in seeds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 216, p. 112191, 2021.
- SEGATTO, F. B. et al. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1597-1601, 2004.
- SHARMA, S.; NAGPAL, A. K.; KAUR, I. Heavy metal contamination in soil, food crops and associated health risks for residents of Ropar wetland, Punjab, India and its environs. **Food chemistry**, v. 255, p. 15-22, 2018.
- SIDHU, G. P. S. et al. Insights into the tolerance and phytoremediation potential of *Coronopus didymus* L. (Sm) grown under zinc stress. **Chemosphere**, v. 244, p. 125350, 2020.
- TANG, T.; TAO, F.; LI, W. Characterisation of manganese toxicity tolerance in *Arabidopsis paniculata*. **Plant Diversity**, 2021.
- TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
- TIECHER, T. L. et al. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 253-263, 2016.
- TIECHER, T. L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017.
- TRENTIN, E. et al. Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. **Chemosphere**, v. 226, p. 421-430, 2019.
- XIAO, Z. et al. Effects of exogenous manganese on its plant growth, subcellular distribution, chemical forms, physiological and biochemical traits in *Cleome viscosa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p. 110696, 2020.
- YOUNIS, M. E.; TOURKY, S. M. N.; ELSHARKAWY, S. E. A. Symptomatic parameters of oxidative stress and antioxidant defense system in *Phaseolus vulgaris* L. in response to copper or cadmium stress. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 207-214, 2018.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009.

ZHAO, S. et al. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass. **Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica**, v. 52, n. 2, 2010.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 527–533, 2004.

**5 ARTIGO 3 – FOTOSSÍNTESE, ESTADO NUTRICIONAL E CRESCIMENTO DE VIDEIRAS E GRAMÍNEAS NATIVAS DO BIOMA PAMPA CULTIVADAS EM CONSÓRCIO EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE, MANGANÊS E ZINCO**

Periódico: Environmental Pollution.



## FOTOSSÍNTESE, ESTADO NUTRICIONAL E CRESCIMENTO DE VIDEIRAS E GRAMÍNEAS NATIVAS DO BIOMA PAMPA CULTIVADAS EM CONSÓRCIO EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE, MANGANÊS E ZINCO

### 5.1 RESUMO

O consórcio de videiras com gramíneas nativas do bioma Pampa em solos com excesso metais pesados podem favorecer as respostas fisiológicas e reduzir o efeito de toxicidade em videiras. O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas e nutricionais de videiras cultivadas em consórcio com *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* em solo com excesso de metais pesados (Cu, Mn e Zn). O experimento foi conduzido em vasos em casa de vegetação sob delineamento inteiramente casualizado, bifatorial 2x3 e com quatro repetições, constituído por dois níveis de metais pesados (Cu, Mn e Zn) nos solos, denominados de baixo nível de metais (-Metais) e alto nível de metais (+Metais) e três sistemas de cultivo (videira em monocultivo, videira + *Paspalum notatum* e videira + *Paspalum plicatulum*). O cultivo ocorreu durante 190 dias. A produção de biomassa, concentração de nutrientes nos tecidos, fluorescência da cloforila *a*, trocas gasosas da folha e biometria do sistema radicular foram avaliados. Observou-se que o consórcio diminuiu o crescimento de plantas e a biometria do sistema radicular de videiras em relação ao monocultivo. Porém, o consórcio com *Paspalum notatum* foi eficiente para promover melhores respostas de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas nas folhas de videiras, independente dos níveis de metais pesados presentes no solo. Os diferentes tratamentos alteraram o estado nutricional, onde o consórcio de videiras com as gramíneas nativas diminuiu a concentração de Cu, Mn e Zn nos tecidos da videira. O solo com +Metais afetou negativamente as respostas fisiológicas de *Paspalum notatum* apresentando sintomas visuais de clorose foliar, o qual pode ser utilizada como planta indicadora de solo contaminado em áreas de vinhedos. Portanto, as gramíneas nativas do bioma Pampa apresentam potencial de fitoestabilização de metais pesados, assim beneficiando as videiras. Desse modo, recomenda-se manter as gramíneas nativas nas entrelinhas dos vinhedos.

**Palavras-chave:** Estresse. Fisiologia. Metais pesados. Toxidez.

### 5.2 ABSTRACT

The intercropping of vines with native grasses of the Pampa biome in soils with excess heavy metals can favor physiological responses and reduce the toxicity effect on vines. The objective of this work was to evaluate the physiological and nutritional responses of vines cultivated in intercropping with *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum* in soil with excess of heavy metals (Cu, Mn and Zn). The experiment was carried out in pots in a greenhouse under a completely randomized design, bifactorial 2x3 and with four replications, consisting of two levels of heavy metals (Cu, Mn, and Zn) in the soils, called low metal level (-Metals) and high level of metals (+Metals) and three cultivation systems (vine in monoculture, vine + *Paspalum notatum* and vine + *Paspalum plicatulum*). Cultivation took place for 190 days. Biomass production, tissue nutrient concentration, chlorophyll *a* fluorescence, leaf gas exchange and root system biometry were evaluated. It was observed that the intercropping decreased plant growth and the root system biometry of the vine in relation to the monoculture. However, the intercropping with *Paspalum notatum* was efficient to promote better responses of chlorophyll *a* fluorescence and gas exchange in vine leaves, regardless of the levels of heavy metals present in the soil. The different treatments altered the nutritional status, where the intercropping of

vines with native grasses decreased the concentration of Cu, Mn, and Zn in the vine tissues. The soil with +Metals negatively affected the physiological responses of *Paspalum notatum* presenting visual symptoms of the leaf chlorosis, which can be used as an indicator plant of contaminated soil in vineyard areas. Therefore, the native grasses of the Pampa biome have the potential for phytostabilization of heavy metals, thus benefiting the vines. Thus, it is recommended to keep the native grasses between the vineyards.

**Keywords:** Stress. Physiology. Heavy metals. Toxicity.

### 5.3 INTRODUÇÃO

A vitivinicultura é uma atividade agrícola que tem causado acúmulo de metais pesados no solo, principalmente em função de aplicações constantes de fungicidas para o controle de doenças fúngicas, o qual possuem cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) na sua composição (BALDI et al., 2018; CAMBROLLÉ et al., 2015; KOMÁREK et al., 2010). Portanto, em áreas de vinhedos, é comum encontrar solos com altas concentrações de Cu (BRUNETTO et al., 2016) e de outros metais pesados, como Zn e Mn (DE CONTI et al., 2019; GIROTTO et al., 2014), que podem afetar as respostas fisiológicas das plantas.

As altas concentrações de Cu, Mn e Zn podem resultar em toxicidade para as plantas. O excesso desses metais pode causar inibição da eficiência fotossintética, alterações na biometria do sistema radicular, desequilíbrio nutricional nos tecidos, clorose e necrose foliar e diminuição do crescimento das plantas (CAMBROLLÉ et al., 2015; MILLALEO et al., 2012; YRUELA, 2009; ZHAO et al., 2017). No caso de videiras, o acúmulo dos metais no solo é ainda mais prejudicial quando se faz a erradicação das plantas velhas e plantio de videiras jovens (BALDI et al., 2018; BRUNETTO et al., 2016; DE CONTI et al., 2019; MIOTTO et al., 2014).

Em estudo de videiras cultivadas com altas concentrações de Cu no solo, houve diminuição do crescimento e aumento significativo de Mn nos tecidos das raízes, caules e folhas de videiras, atingindo valores próximos aos níveis críticos de toxidez, o que tem chamado à atenção de pesquisadores (DE CONTI et al., 2019). Entretanto, o consórcio de videiras com *Axonopus affinis* e *Paspalum plicatulum* em condições moderadas de toxidez por Cu, demonstrou melhoria sobre o crescimento, biometria radicular e redução da biodisponibilidade de Cu, em relação ao monocultivo (DE CONTI et al., 2019).

Nas áreas de vinhedos do bioma Pampa são encontradas diversas espécies de gramíneas nativas, sendo que as espécies *Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum* e *Axonopus affinis* são as mais representativas nesses ambientes (QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009), e comumente manejadas como plantas de cobertura de solo nas entrelinhas dos vinhedos. Essas

gramíneas nativas crescem e se desenvolvem em solos naturalmente ácidos e com a presença de diversos metais pesados, como o Cu, Mn e Zn (BRUNETTO et al., 2014), assim podendo ser uma alternativa na fitoestabilização de metais, reduzindo a disponibilidade e favorecendo o crescimento de culturas cultivadas em consórcio (LEGUIZAMO; GÓMEZ; SARMIENTO, 2017). Portanto, a interação das espécies nos sistemas consorciados pode promover a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes e reduzir a disponibilidade de metais pesados (XIAO et al., 2020), podendo favorecer o crescimento da cultura de interesse.

O cultivo em consórcio pode ser uma alternativa para diminuir o potencial de toxicidade dos metais as videiras, a partir da complexação e estabilização do excesso do metal, limitando a absorção do mesmo pelas plantas, além do sinergismo que ocorre entre as plantas, podendo ambas se beneficiar (BRUNETTO et al., 2016; WAN et al., 2017; DE CONTI et al., 2019; HU et al., 2019; WAN et al., 2017; YAN et al., 2021). Portanto, o consórcio de videiras com gramíneas nativas do bioma Pampa em solos com excesso de Cu, Mn e Zn pode favorecer as respostas fisiológicas e diminuir o efeito de toxicidade nas videiras, assim como nas gramíneas. Portanto, a manutenção das gramíneas nativas nas entrelinhas de vinhedos passa a ser uma estratégia para fitoestabilização dos metais nos solos contaminados. A partir disso, foram estabelecidas como hipóteses: (I) Videiras consorciadas com gramíneas nativas de cobertura de solo apresentam maiores taxa fotossintética e, conseqüentemente, melhor crescimento e desenvolvimento em solo com excesso de Cu, Mn e Zn em relação ao monocultivo; (II) Videiras cultivadas em solo com excesso de Cu aumentam a absorção e concentração de Mn nos tecidos; e (III) Videiras cultivadas em consórcio com gramíneas apresentam menor variação na biometria do sistema radicular e alterações no estado nutricional das plantas. O estudo objetivou avaliar as respostas fisiológicas e nutricionais de videiras cultivadas em consórcio com *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* em solo com excesso de metais pesados (Cu, Mn e Zn).

## 5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.4.1 Solo

O solo utilizado no estudo foi coletado na camada de 0-10 cm em dois vinhedos, localizados no município de Santana do Livramento, estado do Rio Grande do Sul, região Sul do Brasil. O solo foi seco ao ar, homogeneizado e passado em peneira com malha de 2 mm. Os solos coletados foram provenientes de áreas de vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas que contém na sua composição metais pesados, incluindo Cu, Mn e Zn. Para isso,

nesse estudo os solos foram classificados em dois níveis de metais pesados, constituindo de baixo nível de metais (-Metais) e alto nível de metais (+Metais), sendo as características químicas de cada solo apresentadas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Características químicas dos solos coletados na camada de 0-10 cm com dois níveis de metais pesados (-Metais e +Metais).

Características	-Metais	+Metais
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	80,0	160,0
Matéria orgânica (g kg <sup>-1</sup> )	25	31
pH água (1:1)	5,8	5,7
Al trocável (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,0	0,0
Ca trocável (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	5,1	5,7
Mg trocável (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,4	2,2
P Mehlich-1 (mg dm <sup>-3</sup> )	46,9	48,5
K Mehlich-1 (mg dm <sup>-3</sup> )	108	208
S (mg dm <sup>-3</sup> )	25,6	19,7
Cu Mehlich-1 (mg dm <sup>-3</sup> )	43,48	158,78
Mn Mehlich-1 (mg dm <sup>-3</sup> )	28,99	40,02
Zn Mehlich-1 (mg dm <sup>-3</sup> )	39,11	76,55
Fe Mehlich-1 (mg dm <sup>-3</sup> )	215,46	226,74
B (mg dm <sup>-3</sup> )	2,22	4,07
CTC efetiva (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	6,8	8,4
CTC pH 7,0 (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	8,5	10,6
Saturação de bases (%)	80,2	79,2

#### 5.4.2 Descrição do experimento

O estudo foi realizado em casa de vegetação localizada na área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, região Sul do Brasil (29° 43' S, 53° 42' O e 103 m de altitude). O experimento foi conduzido de 27 de abril de 2021 até 06 de novembro 2021, em delineamento experimental inteiramente casualizado, bifatorial 2x3, com quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. A unidade experimental consistiu em um recipiente contendo 3 kg de solo seco e seu respectivo sistema de cultivo. Dois níveis de metais pesados, denominados como baixo nível de metais (-Metais) e alto nível de metais (+Metais) e três sistemas de cultivo, sendo videira em monocultivo (videira), videira consorciada com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e videira consorciada com *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*) foram utilizados. O termo metais nos tratamentos se refere à concentração de Cu, Mn e Zn presente nos solos.

As videiras (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, enxertadas sobre o porta-enxerto SO4) de aproximadamente 30 cm de altura, foram transplantadas aos 27 dias do mês de abril de 2021, adicionando-se uma planta por vaso. Nos tratamentos em consórcio, quatro gramíneas

nativas de cobertura de solo foram transplantadas em cada vaso no mesmo momento do transplante das videiras. Essas gramíneas nativas (*Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*) foram coletadas de áreas de pastagem natural, multiplicadas vegetativamente e cultivadas em areia em casa de vegetação até a realização do experimento. Para isso, as gramíneas nativas foram padronizadas em relação ao tamanho de raiz e número de folhas expandidas, sendo quatro a cinco folhas para a espécie de *P. notatum* e três folhas para *P. plicatulum*.

Após o transplante, a umidade do solo foi restaurada com água destilada para 70% da capacidade máxima de retenção de água no solo e mantida em torno de 60% durante todo o período experimental, pelo método de pesagem. Além disso, durante esse período, a temperatura do ar foi mantida em  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar aproximadamente 70% e sem interferência sobre o fotoperíodo (condições naturais).

#### **5.4.3 Tratos culturais realizados durante o período experimental**

Aos 20 dias de agosto de 2021 realizou-se a poda das videiras e das gramíneas de cobertura. A poda da videira foi realizada com corte em bisel 12 cm acima do local da enxertia, mantendo-se aproximadamente seis a sete gemas visíveis em cada planta. A poda das gramíneas nativas nos sistemas em consórcio foi cortada simulando uma roçada, prática comum as áreas de vinhedos. Para isso, a parte aérea de *P. notatum* e *P. plicatulum* foram podadas à quatro e nove centímetros de altura do solo, respectivamente, e posteriormente o material vegetal foram picados em aproximadamente três centímetros de comprimento e depositadas sobre a superfície do solo.

As plantas também receberam 25 mL de solução nutritiva a cada dez dias composta por: 105,07 mg L<sup>-1</sup> N; 15,50 mg L<sup>-1</sup> P; 32,11 mg L<sup>-1</sup> S; 80,22 mg L<sup>-1</sup> Ca; 24,32 mg L<sup>-1</sup> Mg; 117,33 mg L<sup>-1</sup> K; 0,32 mg L<sup>-1</sup> Cl; 0,25 mg L<sup>-1</sup> B; 0,005 mg L<sup>-1</sup> Mo; 0,005 mg L<sup>-1</sup> Ni; 0,03 mg L<sup>-1</sup> Zn; 0,01 mg L<sup>-1</sup> Cu; 0,25 mg L<sup>-1</sup> Mn e 0,349 mg L<sup>-1</sup> Fe até o início da brotação das videiras.

Durante o período de condução também foi necessário realizar aplicação de fungicidas para o controle de doenças, especialmente em plantas de *P. plicatulum*. Para isso, foi realizado aplicação foliar de fungicida sistêmico Cerconil<sup>®</sup> (Tiofanato-metilico + Clorotalonil) na dose de 200 g p.c./100 L de água destilada. Nas videiras, foi realizado aplicação foliar do fungicida sistêmico Ridomil Gold MZ<sup>®</sup> (Metalaxil-M + Mancozebe) na dose de 250 g p.c./100 L de água destilada.

#### 5.4.4 Produção de biomassa

Após 190 dias do transplante, plantas de videira de cada repetição foram coletadas para determinação da massa seca de raízes, caule e folhas e as gramíneas para determinação de massa seca de raízes, parte aérea e total. As raízes das plantas foram lavadas em água destilada para retirada de solo e secas em papel absorvente antes da avaliação. Os diferentes órgãos foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada de ar à  $\pm 65^{\circ}\text{C}$  até atingir massa constante. A determinação da massa seca foi realizada em balança de precisão (Shimadzu, AY220).

#### 5.4.5 Concentrações de nutrientes

As raízes, caule e folhas das plantas foram moídas em moinho tipo Willey (Tecnal, TE-680). Os resíduos foram passados em peneira de malha de 2 mm. Amostras de 0,250 g foram submetidas à digestão nitroperclórica (3 mL de ácido nítrico [ $\text{HNO}_3$ ] 65% P.A. e 1 mL de ácido perclórico [ $\text{HClO}_4$ ] 70% P.A.) (EMBRAPA, 2009). A concentração total de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) foram analisadas em espectrômetro de absorção atômica (AAS, Thermo Scientific, iCE 3000 series) (Tedesco et al., 1995). O fósforo (P) foi analisado em espectrofotômetro (Tecnal, V-5000), conforme metodologia de Murphy e Riley (1962). Para determinação do nitrogênio (N), 0,2 g de material vegetal foram pesados e adicionados em tubo de digestão com 0,2 g de mistura catalítica (100 g de  $\text{NaSO}_4$  e 10 g de  $\text{CuSO}_4$ ). Após, foram adicionadas 1 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e 2 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), colocados no bloco de digestão a  $150^{\circ}\text{C}$  e monitorado durante 30 minutos. As temperaturas foram alteradas para 200, 250, 300 e  $350^{\circ}\text{C}$  a cada 30 minutos. Quando a temperatura atingiu  $350^{\circ}\text{C}$ , os tubos permaneceram por mais uma hora no bloco digestor. Após esse período os tubos foram resfriados e adicionados 20 mL de água destilada para destilação. A destilação do N pelo método de Kjeldahl ocorreu a partir da adição de 10 mL de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH} - 10 \text{ mol L}^{-1}$ ) no tubo e ácido bórico (5 mL) como indicador. A quantificação do nitrogênio total foi realizada por meio de titulação volumétrica, onde a solução indicadora contendo nitrogênio total coletado foi titulada com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4 - 0,025 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 5.4.6 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi determinada a partir de um fluorômetro portátil de clorofila (Chlorophyl Fluorometer Walz, Mod. Junior-Pam). As leituras foram realizadas aos 189 dias após a instalação do experimento, realizando-se a leitura na terceira folha totalmente

expandida do ápice em direção a base. Para isso, as leituras foram realizadas em uma manhã de sol, sendo que a folha onde se realizou a leitura foi previamente adaptada ao escuro por um período de 30 minutos (SOUZA et al., 2013). Posteriormente a esse procedimento, foram determinadas a fluorescência inicial da clorofila *a* ( $F_o$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), taxa de transporte de elétrons (ETR<sub>m</sub>) e rendimento quântico potencial do fotossistema II.

#### 5.4.7 Trocas gasosas da folha com o ambiente

As trocas gasosas da folha com o ambiente foram realizadas a partir de um analisador de gás por radiação infravermelho (Infrared Gas Analyser [IRGA], Mod. LICOR<sup>®</sup> 6400 XT). As leituras foram realizadas aos 181 dias após a instalação do experimento, entre 8h e 10h, com concentração de  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  e densidade de fluxo de fótons de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para isso, a terceira folha expandida do ápice em direção a base, de uma planta de cada repetição (videira e gramínea) foi selecionada para realizar a leitura. Nesta avaliação foram determinadas as variáveis: taxa fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $G_s$ ), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco ( $A/C_i$ ), taxa de transpiração ( $E$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e eficiência do uso da água ( $EUA$ ). A  $A/C_i$  foi determinada a partir da relação entre a taxa fotossintética líquida ( $A$ ) e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), o qual representa a quantidade de  $\text{CO}_2$  fixado pela fotossíntese. A  $EUA$  foi determinada pela razão entre a taxa fotossintética líquida ( $A$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ).

#### 5.4.8 Biometria do sistema radicular

A biometria do sistema radicular foi determinada utilizando o software WinRhizo Pro 2013, acoplado a um scanner (EPSON Expression 11000). Para isso, as raízes foram suspensas em água dentro de uma bandeja de acrílico e as imagens obtidas em resolução de 600 dpi. A partir deste equipamento foi possível determinar parâmetros biométricos do sistema radicular de videiras e das gramíneas, como: comprimento total, área superficial, diâmetro médio e volume radicular de videiras e gramíneas.

#### 5.4.9 Análise estatística

Os dados do experimento foram submetidos à teste de normalidade dos erros com o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância, e quando atendidos os pressupostos estatísticos foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Quando significativos, foi realizada comparação múltipla de médias pelo teste de Scott e Knott, com 5% de probabilidade de erro, utilizando programa estatístico R, pacote “ExpDes.pt” (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014).

## 5.5 RESULTADOS

### 5.5.1 Resumo da análise de variância

Pela análise de variância, as variáveis de número de folhas, altura de plantas, fluorescência inicial e máxima da clorofila *a*, rendimento quântico do fotossistema II, taxa fotossintética líquida, eficiência de carboxilação instantânea da rubisco, condutância estomática, taxa de transpiração, eficiência do uso da água, concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, comprimento total de raiz, área superficial total, volume radicular e diâmetro médio de raízes de videiras apresentaram diferenças significativas apenas entre o sistema de cultivo, pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Para análise da massa seca de raízes e de folhas das videiras, houve interação significativa entre os fatores níveis de metais pesados x sistema de cultivo ( $p < 0,05$ ). As variáveis massa seca de caule e taxa de transporte de elétrons máxima da fluorescência não apresentaram diferenças significativas nas videiras. Com relação à concentração de nutrientes nos tecidos, para N, P, K, Mn, Cu em raízes, caule e folhas, Ca e Mg nas raízes e Fe e Zn nas folhas das videiras houve interação significativa entre os fatores níveis de metais pesados x sistema de cultivo ( $p < 0,05$ ). Para Ca nas folhas e Zn nas raízes, houve diferença significativas entre sistema de cultivo e níveis de metais pesados separadamente para cada fator. Para Mg nas folhas e Fe nas raízes houve diferença significativa apenas para o fator níveis de metais pesados, enquanto para os demais não houve diferenças significativas.

Para as gramíneas de cobertura de solo nativas do bioma Pampa cultivadas em consórcio com as videiras, houve interação significativa entre os fatores níveis de metais pesados x espécie de gramínea para as variáveis massa seca de raízes, parte aérea e total, rendimento quântico do fotossistema II, taxa de transporte de elétrons máxima da fluorescência, taxa fotossintética líquida, concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, condutância estomática, taxa de transpiração, comprimento total e área superficial total de raízes e volume radicular, pelo teste F ( $p < 0,05$ ). As variáveis fluorescência inicial e máxima da clorofila *a* apresentou diferença significativa apenas entre o fator espécie de gramínea, enquanto o diâmetro médio de raízes entre níveis de metais pesados. Para eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação instantânea da rubisco houve diferença significativa entre os fatores níveis de metais pesados e espécie de gramíneas, separadamente. Para a concentração de nutrientes nos tecidos, N, P, K, Ca, Fe, Cu e Zn nas folhas e Mn, Fe e Cu nas raízes apresentaram interação significativa entre os fatores níveis de metais pesados x sistema de cultivo. Contudo, a concentração de K nas raízes apresentou diferença somente em relação aos níveis de metais pesados, enquanto Ca e Mg nas raízes somente em relação a espécie de gramínea. Para Mg e Mn na parte aérea e Zn



nas raízes, houve diferença significativas entre os fatores espécie de gramínea e níveis de metais pesados separadamente, pelo teste F, a 5% de probabilidade de erro.

### **5.5.2 Respostas fisiológicas de videiras cultivadas em consórcio com gramíneas nativas em solo com excesso de cobre, manganês e zinco**

As plantas de videiras cultivadas em monocultivo apresentaram maior número de folhas e altura de plantas em relação aos sistemas de cultivo em consórcio com gramíneas nativas (Figura 1A e 1B, respectivamente). Para a produção de biomassa nas videiras, independente dos níveis de metais no solo, houve aumento da massa seca de folhas em videiras cultivadas em monocultivo (Figura 1C). As massas secas de folhas e de raízes diminuíram no consórcio de videira + *P. plicatulum* em solo com baixo nível de metais (-Metais), quando comparadas aos demais sistemas de cultivo. Entretanto, no solo com excesso de metais (+Metais), houve aumento da produção de massa seca de folhas de videiras no consórcio de videiras + *P. plicatulum*, e diminuição da massa seca de raízes no consórcio de videiras + *P. notatum* (Figura 1C).

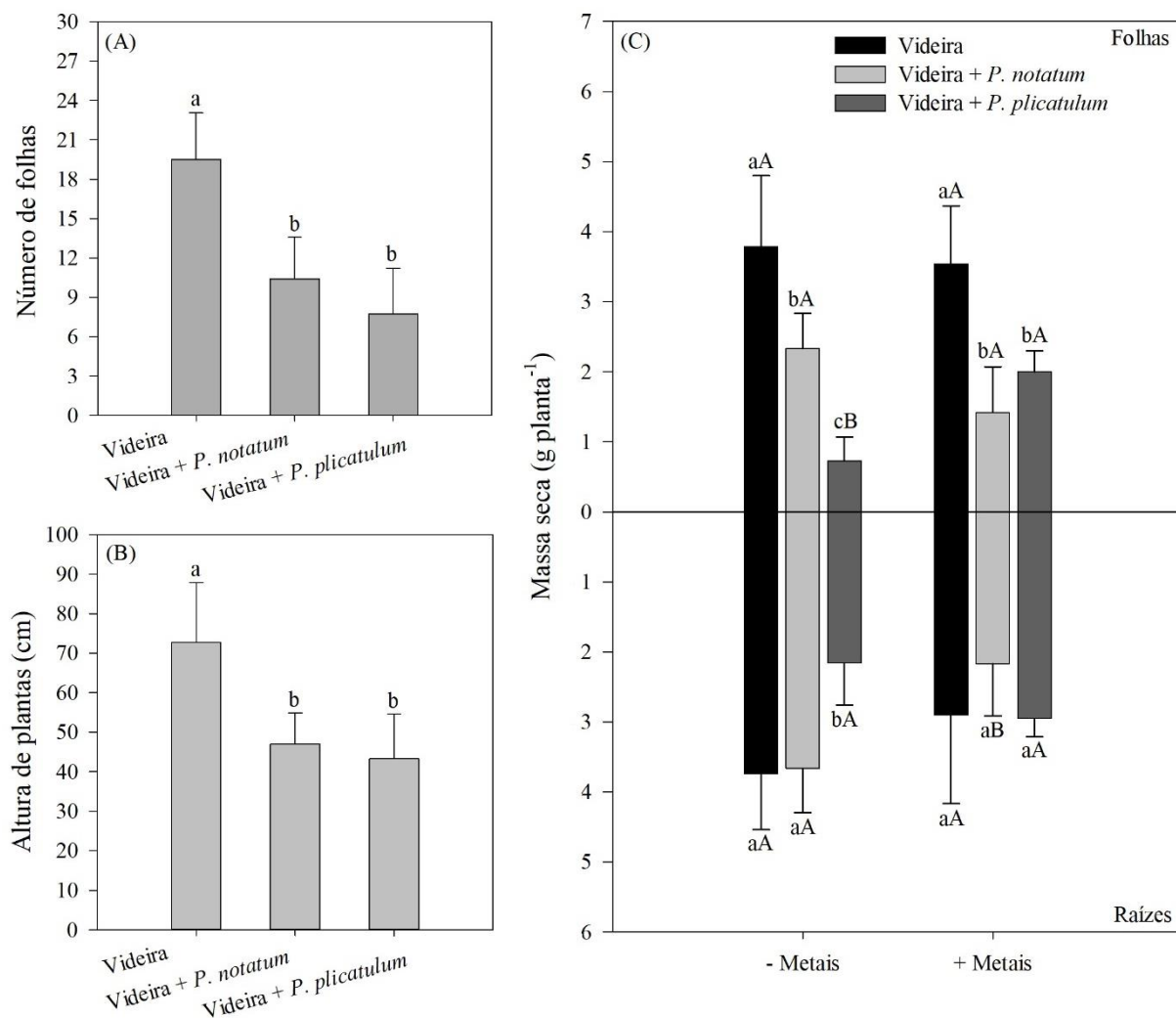


Figura 1. Número de folhas (A), altura de plantas (B) e massa seca de raízes e folhas de videiras (C) cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metais e +Metais. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre sistemas de cultivo dentro de cada nível de metais e maiúscula entre nível de metais dentro de cada sistema de cultivo não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

As concentrações de N diminuíram de forma expressiva nas raízes, caule e folhas de videiras no consórcio de videiras + *P. notatum* em solo com -Metais, enquanto as menores concentrações de N em solo com +Metais foram observadas nas raízes e folhas no consórcio de videiras + *P. plicatulum* (Tabela 2). Além disso, é importante destacar que as concentrações de N aumentaram nas raízes, caule e folhas de videiras no consórcio de videiras + *P. notatum* no solo com +Metais, quando comparado ao -Metais. Por outro lado, a concentração de N aumentou no caule e folhas no consórcio de videira + *P. plicatulum* no solo com -Metais (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentrações de nutrientes em raízes, caule e folhas de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), cultivadas em solos com -Metais e +Metais.

Nutrientes	Níveis de metais pesados	Sistemas de cultivo		
		Videira	Videira + <i>P. notatum</i>	Videira + <i>P. plicatulum</i>
<b>Raízes</b>				
N (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	16,24 aA	9,05 bB	15,50 aA
	+ Metais	15,49 aA	17,31 aA	12,77 bA
P (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	1,84 aA	1,36 bA	1,38 bA
	+ Metais	1,42 aB	1,49 aA	1,24 aA
K (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	2,58 aA	1,50 bB	1,32 bB
	+ Metais	2,82 aA	2,64 aA	1,85 bA
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	11,62 aA	6,37 cB	8,18 bA
	+ Metais	9,74 aB	9,25 aA	7,74 bA
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	2,57 aA	1,27 bB	1,33 bB
	+ Metais	2,19 aB	1,95 bA	1,80 bA
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	99,72 aB	39,99 cB	61,67 bB
	+ Metais	249,79 aA	193,37 bA	166,27 bA
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	75,33 aA	78,94 aA	64,37 aA
	+ Metais	79,48 aA	56,67 bB	69,98 aA
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	114,94 a B	67,97 b B	74,56 b B
	+ Metais	144,85 a A	125,22 b A	131,13 b A
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	517,44 B	342,59 B	531,65 B
	+ Metais	851,54 A	806,94 A	994,70 A
<b>Caule</b>				
N (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	5,97 bA	4,99 bB	7,13 aA
	+ Metais	6,66 aA	7,04 aA	5,65 aB
P (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	1,04 aA	1,52 aB	1,84 aA
	+ Metais	1,66 bA	2,36 aA	1,42 bA
K (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	6,03 aA	3,08 bB	3,52 bA
	+ Metais	6,02 aA	5,24 aA	3,96 bA
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	5,45	4,91	5,16
	+ Metais	5,22	5,87	5,27
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	1,69	1,64	1,61
	+ Metais	1,71	1,83	1,65
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	9,72 aB	7,45 aB	9,26 aA
	+ Metais	12,44 aA	13,35 aA	10,67 aA

Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	48,77 cA	72,26 aA	59,04 bA
	+ Metais	50,23 bA	60,11 aB	58,33 aA
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	32,50	30,20	27,14
	+ Metais	37,74	39,64	31,50
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	64,57	44,52	50,92
	+ Metais	61,30	72,43	62,18
<b>Folhas</b>				
N (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	27,46 aA	14,45 cB	21,72 bA
	+ Metais	27,70 aA	27,53 aA	17,67 bB
P (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	2,93 aA	1,55 bB	1,90 bA
	+ Metais	2,39 aA	2,68 aA	1,83 bA
K (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	7,83 aB	2,60 cB	5,54 bA
	+ Metais	11,18 aA	8,27 bA	5,10 cA
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	12,22 a A	10,94 b A	10,55 b A
	+ Metais	8,44 a B	7,58 b B	6,96 b B
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	- Metais	3,67 A	4,00 A	4,30 A
	+ Metais	3,49 B	3,14 B	3,49 B
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	4,41 aB	2,71 aB	3,14 aA
	+ Metais	6,34 aA	6,93 aA	3,60 bA
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	163,05 bA	257,69 aA	191,46 bA
	+ Metais	165,66 aA	75,03 bB	123,91 aB
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	22, 68 aB	25,63 aA	28,29 aA
	+ Metais	33,20 aA	23,34 bA	22,12 bA
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	- Metais	69,22 aA	41,44 bB	54,72 bA
	+ Metais	62,20 aA	70,93 aA	57,14 aA

Os valores foram obtidos a partir das médias de quatro repetições referente a cada tratamento. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre sistema de cultivo dentro de cada nível de metais (linha) e maiúscula entre nível de metais dentro de cada sistema de cultivo (coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Médias sem letras não apresentaram diferença significativa entre os fatores.

A concentração de P aumentou nas raízes e folhas de videiras cultivadas em monocultivo no solo com -Metais. Entretanto, no solo com +Metais houve maior concentração no caule para o consórcio de videiras + *P. notatum* e diminuição em folhas de videiras no consórcio de videiras + *P. plicatulum*. A concentração de P aumentou no caule e folhas no consórcio de videiras + *P. notatum* no solo com +Metais e nas raízes de videiras em monocultivo com -Metais (Tabela 2).

A concentração de K diminuiu nas raízes e caule de videiras no consórcio de videiras + *P. notatum* e videiras + *P. plicatulum* em solo com -Metais e em videiras + *P. plicatulum* com

+Metais. Por outro lado, a concentração de K aumentou nas folhas de videiras em condições de monocultivo e videira + *P. notatum* em solo com +Metais, mas foi significativamente diminuída no consórcio de videira + *P. notatum* com -Metais e videira + *P. plicatum* com +Metais (Tabela 2). A concentração de Ca diminuiu nas raízes de videiras em monocultivo e aumentou no consórcio de videira + *P. notatum* no solo com +Metais, quando comparado ao solo com -Metais. Entretanto, a concentração de Ca nas raízes de videiras diminuiu no consórcio de videira + *P. notatum* para o solo com -Metais e em videira + *P. plicatum* para o solo com +Metais. As maiores concentrações de Ca nas folhas das videiras foram observadas em monocultivo e em solo com -Metais. De maneira semelhante, a concentração de Mg aumentou nas raízes de videiras em monocultivo, enquanto os sistemas de cultivo em consórcio com gramíneas apresentaram aumento da concentração de Mg em solo com +Metais, quando comparado ao -Metais. A concentração de Mg aumentou nas folhas de videira em solo com -Metais.

As concentrações de Cu aumentaram nas raízes, caule e folhas de videiras cultivadas no solo com +Metais, exceto em folhas na condição de consórcio de videiras + *P. plicatum*. A concentração de Cu diminuiu nas raízes de videiras consorciadas com as gramíneas, enquanto nas folhas a concentração de Cu diminuiu somente no consórcio com *P. plicatum* quando cultivado em solo com excesso de metais (+Metais). As concentrações de Mn diminuíram nas raízes de videira no consórcio de videira + *P. notatum* em solo com +Metais, enquanto menores valores no caule foram observados nas videiras em monocultivo. Nos sistemas de cultivo em consórcio, concentração de Mn aumentou nas folhas de videiras em solo com -Metais, quando comparado ao +Metais. Contudo, o consórcio com *P. notatum* proporcionou aumento da concentração de Mn nas folhas de videiras em solo com -Metais, enquanto em +Metais foram observados valores significativamente menores (Tabela 2). A concentração de Zn nas raízes e folhas de videiras em monocultivo aumentaram em solo com +Metais. Da mesma forma, a concentração de Fe aumentou nas raízes de videiras em todos os sistemas de cultivo no solo com +Metais. A concentração de Fe diminuiu nas folhas de videiras no consórcio de videira + *P. notatum* em solo com -Metais, enquanto nesse mesmo solo houve aumento da concentração de Fe nas folhas de videiras em monocultivo.

Para fluorescência da clorofila *a* em folhas de videira, houve maior taxa de fluorescência inicial e máxima no consórcio de videiras + *P. notatum* (Figura 2A e 2B, respectivamente). Entretanto, para rendimento quântico potencial do fotossistema II, esse consórcio apresentou maiores valores, não diferindo significativamente das videiras cultivadas em monocultivo. Menor rendimento quântico foi observado no consórcio de videira + *P. plicatum* (Figura 2C).

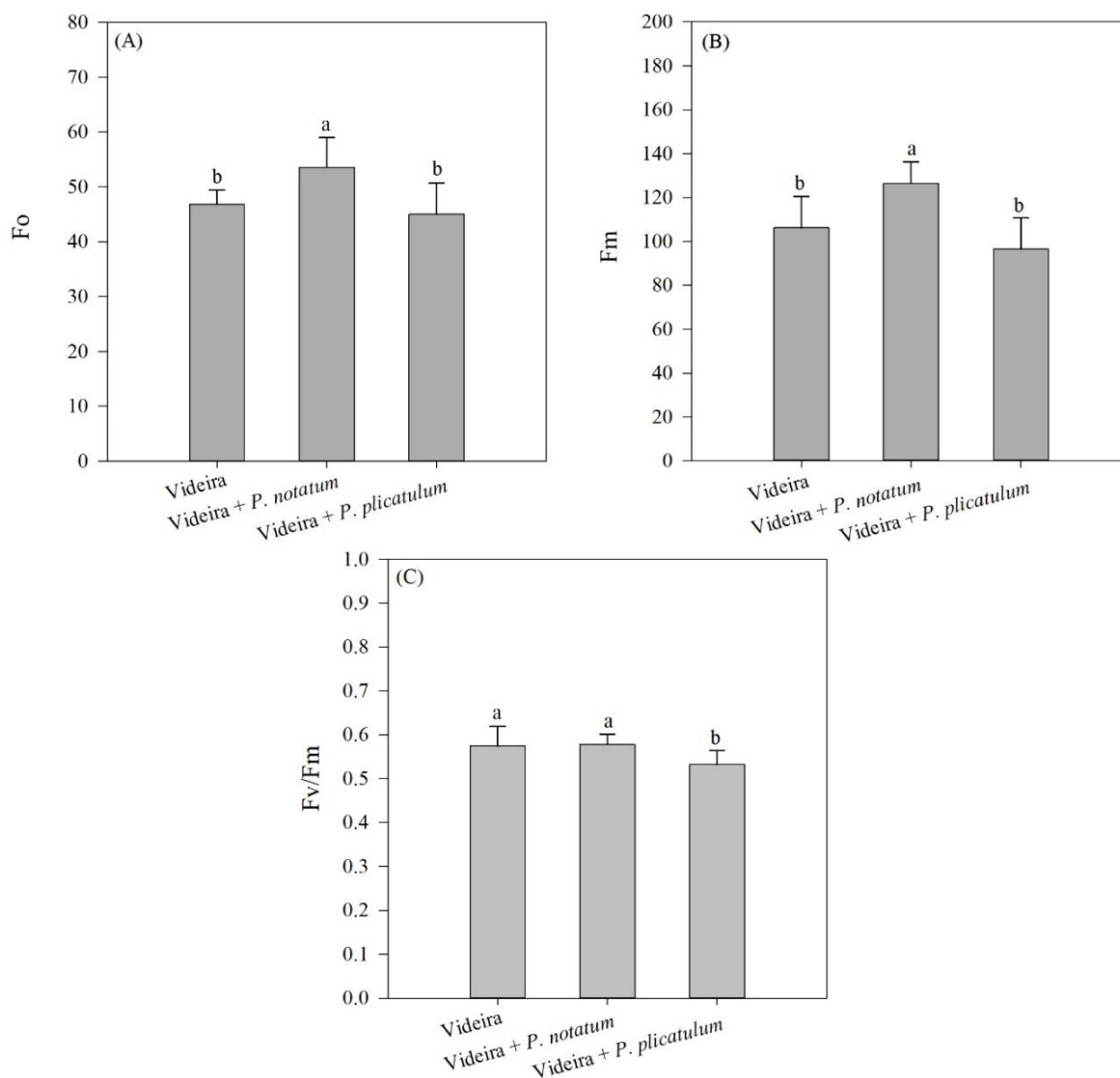


Figura 2. Fluorescência inicial da clorofila *a* -  $F_o$  (A), Fluorescência máxima -  $F_m$  (B) e rendimento quântico potencial do fotossistema II (C) de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metals e +Metals. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os sistemas de cultivo não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

As trocas gasosas das folhas de videiras com o ambiente apresentaram diferenças somente em relação aos sistemas de cultivo. Dessa forma, o sistema de cultivo em consórcio de videira + *P. notatum* aumentou a taxa fotossintética líquida e eficiência de carboxilação instantânea pela rubisco nas folhas das videiras (Figura 3A e 3B, respectivamente). Por outro lado, a condutância estomática e a taxa de transpiração das folhas de videira foram diminuídas no consórcio de videira + *P. plicatulum* (Figura 3C e 3D, respectivamente). Além disso, as videiras em monocultivo foram menos eficientes no uso da água e apresentaram maior

concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, em relação ao consórcio com as gramíneas nativas (Figura 3E e 3F, respectivamente).

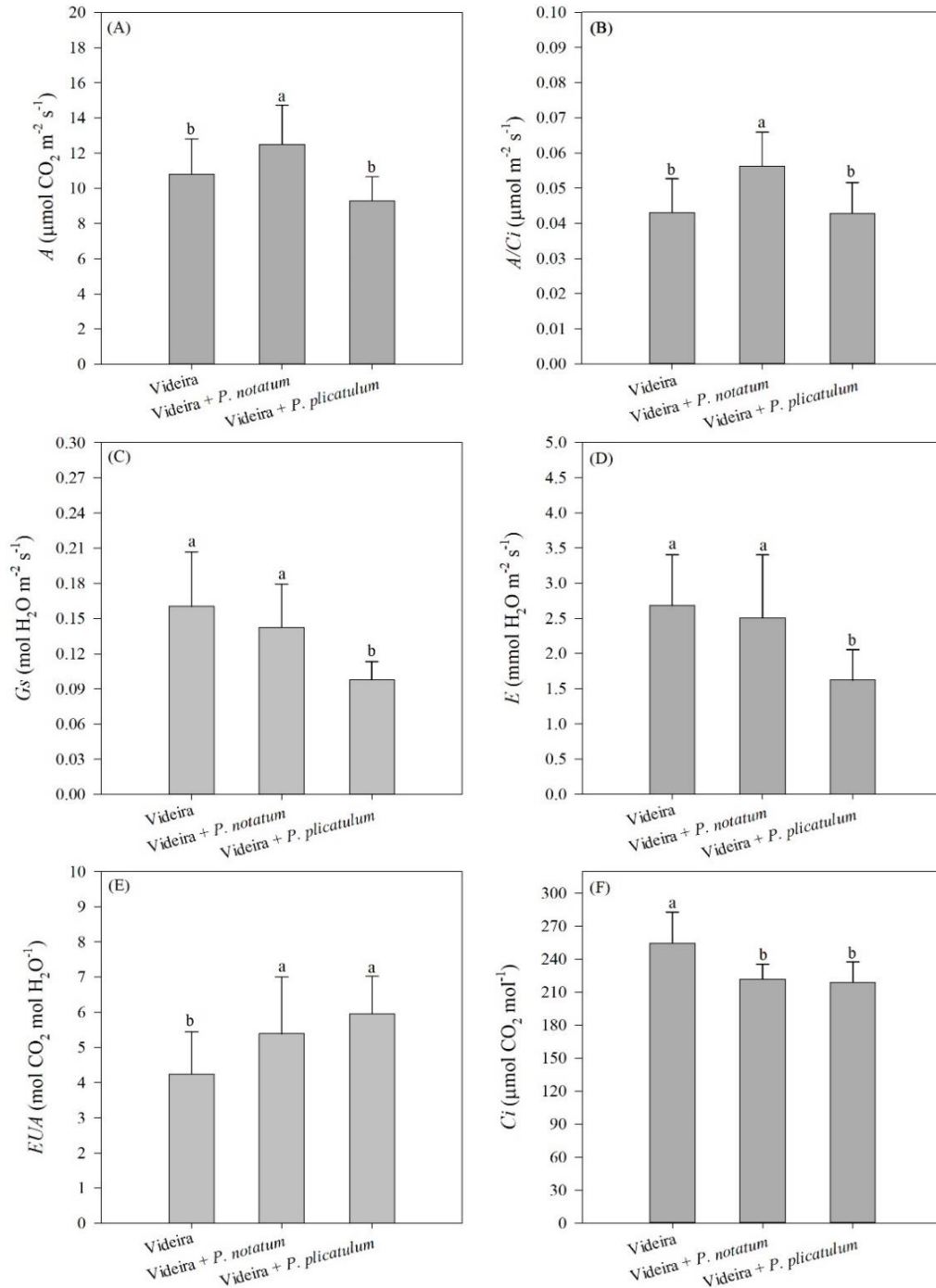


Figura 3. Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (B), condutância estomática -  $G_s$  (C), taxa de transpiração -  $E$  (D), eficiência do uso da água -  $EUA$  (E) e concentração intercelular de CO<sub>2</sub> -  $C_i$  (F) de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e em consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metais e +Metais. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os sistemas de cultivo não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

Com relação a biometria do sistema radicular, as videiras cultivadas em monocultivo apresentaram maior comprimento total, área superficial e volume radicular em relação aos sistemas de cultivo em consórcio (Figura 4A, 4B e 4C, respectivamente). Contudo, o diâmetro médio de raízes aumentou nas videiras em monocultivo e em consórcio videira + *P. notatum* (Figura 4D).

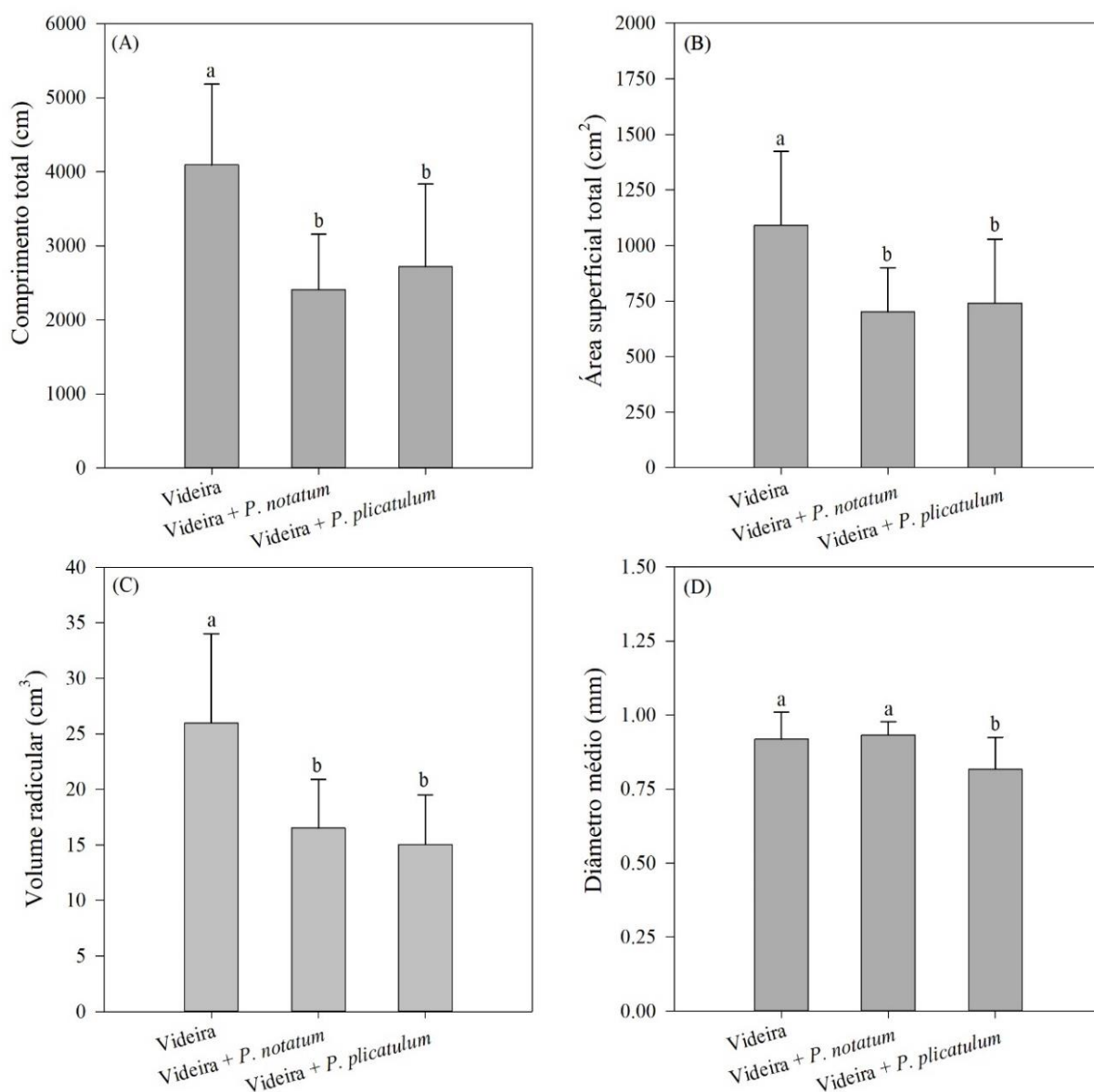


Figura 4. Comprimento total (A), área superficial total (B), volume radicular (C) e diâmetro médio (D) de raízes de videiras cultivadas em monocultivo (videira) e consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) e *Paspalum plicatulum* (videira + *P. plicatulum*), em solos com -Metais e +Metais. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os sistemas de cultivo não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.



### 5.5.3 Respostas fisiológicas de gramíneas nativas cultivadas no consórcio com videiras em solo com excesso de cobre, manganês e zinco.

As gramíneas nativas de cobertura de solo cultivadas em consórcio com videiras apresentaram diferentes respostas em relação as diferentes concentrações de metais (Cu, Mn e Zn) no solo. A massa seca de raízes, parte aérea e total de *P. notatum* diminuiu no cultivo em solo com +Metais (Figuras 5A e 5B, respectivamente). Contudo, na espécie *P. plicatulum* houve diferença significativa apenas para a massa seca de parte aérea, que diminuiu no solo com +Metais (Figura 5A). Em relação as espécies de gramíneas, *P. notatum* apresentou maior massa seca de parte aérea em solo com baixo nível de metais (-Metais) e menor massa seca de raízes em solo com alto nível de metais (+Metais), quando comparado ao *P. plicatulum* (Figura 5A). Esses resultados se refletiram sobre a massa seca total das plantas.

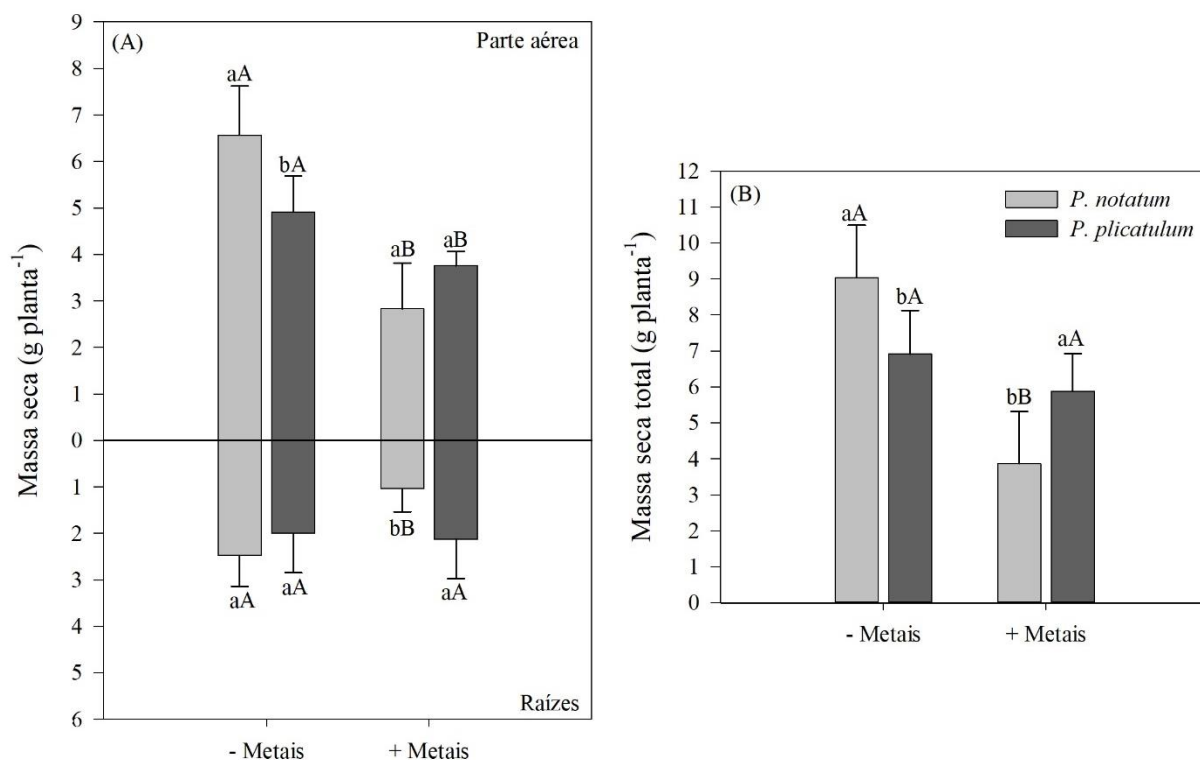


Figura 5. Massa seca de raízes e parte aérea (A) e massa seca total (B) de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metais e +Metais. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre espécie de gramínea dentro de cada nível de metais e maiúscula entre nível de metais dentro de cada espécie de gramínea não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

As maiores concentrações de N, P e K na parte aérea de *P. notatum* foram observadas no cultivo em solo com +Metais (Tabela 3). Contudo, a concentração de K aumentou nas raízes

das gramíneas no solo com +Metais. A concentração de Ca na parte aérea de *P. plicatulum* e de Mg na parte aérea das duas gramíneas diminuíram no solo com +Metais (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentrações de nutrientes em raízes e parte aérea de gramíneas nativas (*P. notatum* e *P. plicatulum*) consorciadas com videiras em resposta a solos com -Metais e +Metais.

Nutrientes	Níveis de metais pesados	<i>P. notatum</i>		<i>P. plicatulum</i>	
		Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
g kg <sup>-1</sup>					
N	- Metais	7,47	7,44 bB	9,14	10,30 aA
	+ Metais	9,47	14,8 aA	9,36	8,58 bA
P	- Metais	1,24	1,65 bB	1,24	2,05 aA
	+ Metais	1,38	2,35 aA	1,48	1,88 bA
K	- Metais	5,60 B	7,46 aB	5,95 B	10,00 aB
	+ Metais	13,90 A	22,18 aA	13,02 A	16,40 bA
Ca	- Metais	3,70 b	3,84 bA	4,15 a	6,63 aA
	+ Metais	3,02 b	3,31 bA	4,04 a	4,33 aB
Mg	- Metais	1,83 b	3,27 b A	2,01 a	4,12 a A
	+ Metais	1,59 b	2,94 b B	2,09 a	3,40 a B
mg kg <sup>-1</sup>					
Cu	- Metais	111,39 aB	11,16 aB	141,26 aB	11,69 aA
	+ Metais	180,63 bA	27,85 aA	309,95 aA	15,50 bA
Mn	- Metais	140,02 aA	106,13 b A	144,22 aA	217,11 a A
	+ Metais	47,58 bB	44,41 b B	114,81 aA	184,88 a B
Zn	- Metais	79,16 b B	123,42 aB	117,00 a B	70,41 bB
	+ Metais	109,63 b A	226,24 aA	158,81 a A	134,65 bA
Fe	- Metais	1790,85 aA	179,85 aB	1816,03 aB	117,82 aB
	+ Metais	1608,41 bA	363,52 aA	2951,46 aA	199,05 bA

Os valores foram obtidos a partir das médias de quatro repetições referente a cada tratamento. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre espécie dentro de cada órgão da planta e nível de metais (linha) e maiúscula entre nível de metais dentro de cada espécie (coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Médias sem letras não apresentaram diferença significativa entre os fatores.

As maiores concentrações de Cu foram observadas nas raízes e parte aérea de *P. notatum* e nas raízes de *P. plicatulum* no solo com +Metais. O cultivo no solo com +Metais também proporcionou diminuição da concentração de Mn nas raízes e parte aérea das gramíneas, exceto em raízes de *P. plicatulum*, onde não houve diferença significativa (Tabela 3). Entretanto, as concentrações de Zn e Fe aumentaram nas raízes e parte aérea das gramíneas no solo com

+Metais, com exceção das raízes de *P. notatum* onde não houve diferença significativa em relação aos níveis de metais pesados.

A fluorescência inicial e máxima da clorofila *a* em folhas de gramíneas diferiu apenas entre as espécies de gramínea, sendo que *P. notatum* apresentou maiores valores (Figura 6A e 6B). O rendimento quântico potencial do fotossistema II e a taxa de transporte de elétrons diminuíram em folhas de *P. notatum* no solo com +Metais (Figura 6C e 6D).

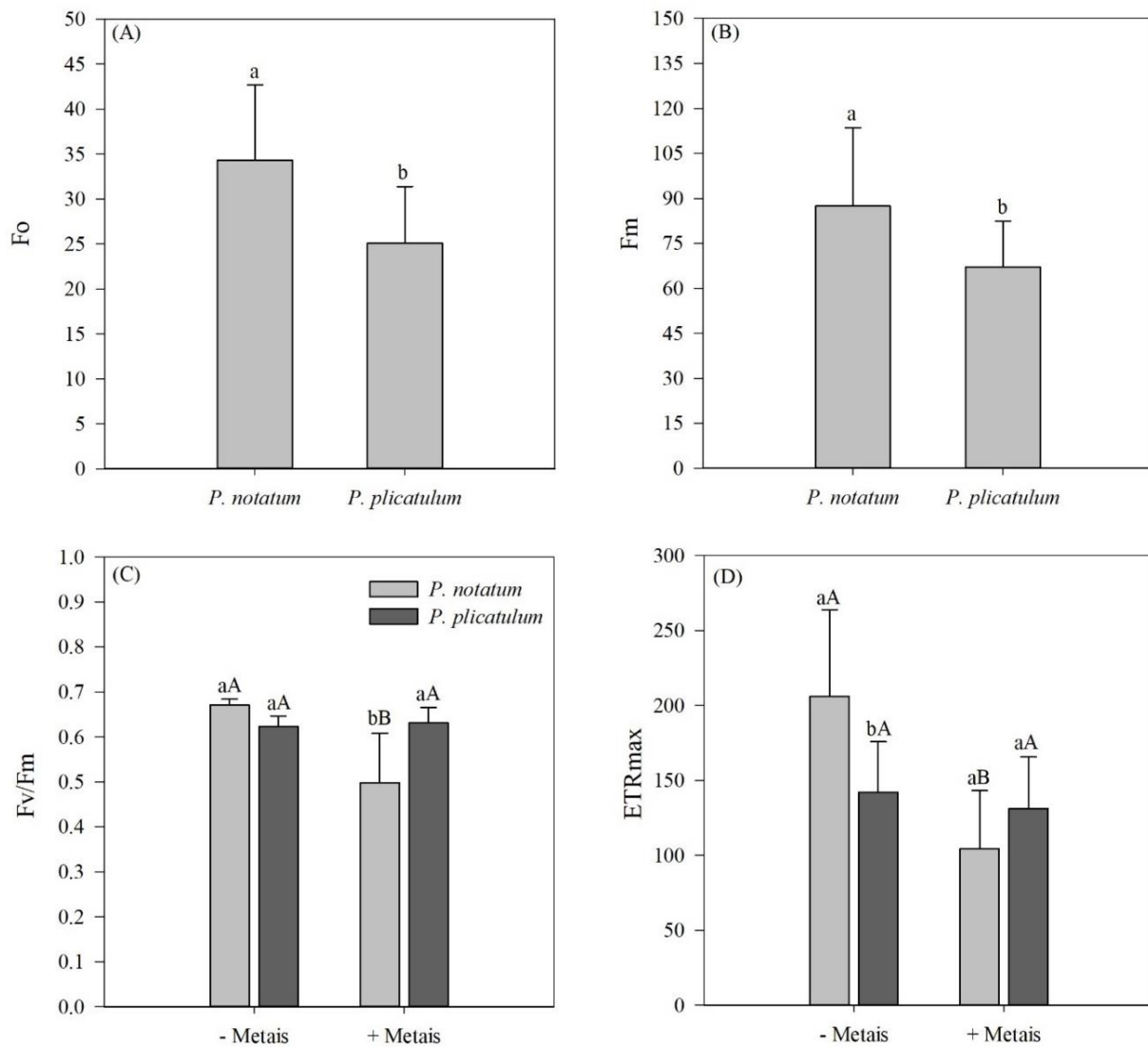


Figura 6. Fluorescência inicial da clorofila *a* -  $F_o$  (A), Fluorescência máxima -  $F_m$  (B), rendimento quântico potencial do fotossistema II -  $F_v/F_m$  (C) e taxa de transporte relativa de elétrons máxima -  $ETR_{max}$  (D) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metais e +Metais. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre espécie de gramínea dentro de cada nível de metais e maiúscula entre nível de metais dentro de cada espécie de gramínea não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

As diferentes concentrações dos metais no solo influenciaram as trocas gasosas das folhas de gramíneas cultivadas em consórcio com as videiras. A taxa fotossintética líquida diminuiu em *P. notatum* no solo com +Metais (Figura 7A), proporcionando aumento da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> nas folhas dessa espécie (Figura 7B). Da mesma forma, a condutância estomática e taxa de transpiração nas folhas de *P. notatum* foram diminuídas no solo com +Metais (Figura 7C e 7D, respectivamente). Além disso, a taxa de transpiração aumentou nas folhas de *P. notatum* no solo com -Metais, enquanto para a espécie de *P. plicatulum* houve aumento da condutância estomática e taxa de transpiração no solo com +Metais. Com relação a eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação instantânea da rubisco, houve aumento em *P. plicatulum* e no solo com menores níveis de metais pesados (-Metais) (Figura 7E e 7F).

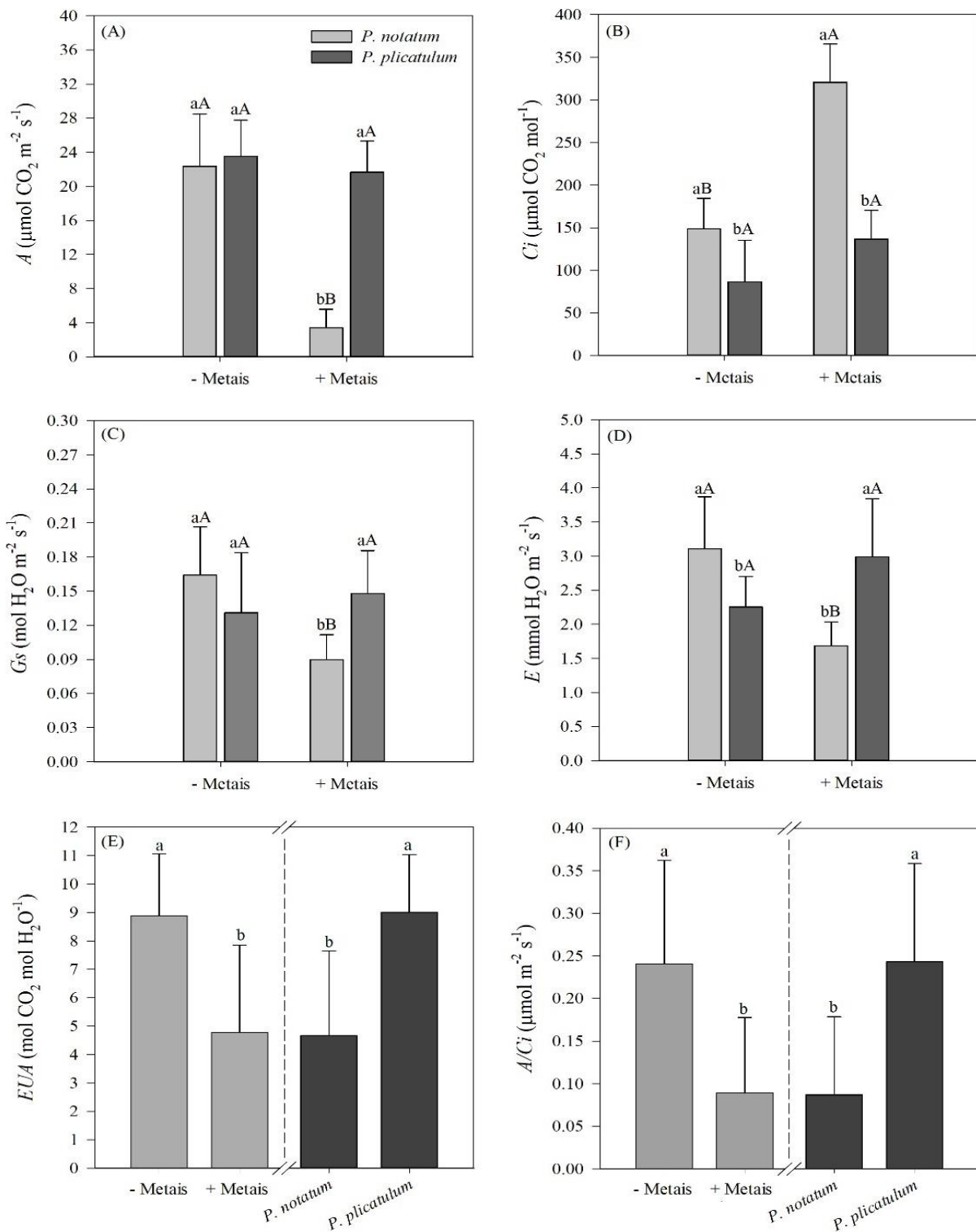


Figura 7. Taxa fotossintética líquida -  $A$  (A), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (B), condutância estomática -  $G_s$  (C), taxa de transpiração -  $E$  (D), eficiência do uso da água -  $EUA$  (E) e eficiência de carboxilação instantânea da rubisco -  $A/C_i$  (F) de folhas de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metals e +Metals. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre espécie de gramínea dentro de cada nível de metais e maiúscula entre nível de metais dentro de cada espécie de gramínea não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

Com relação ao comprimento total das raízes, área superficial das raízes e volume radicular, houve diminuição em *P. notatum* quando cultivado com videiras em solo com +Metais (Figura 8A, 8B e 8C, respectivamente). Para diâmetro médio radicular, houve diferença apenas em relação aos níveis de metais, sendo que o solo com -Metais aumentou o diâmetro médio (Figura 8D).

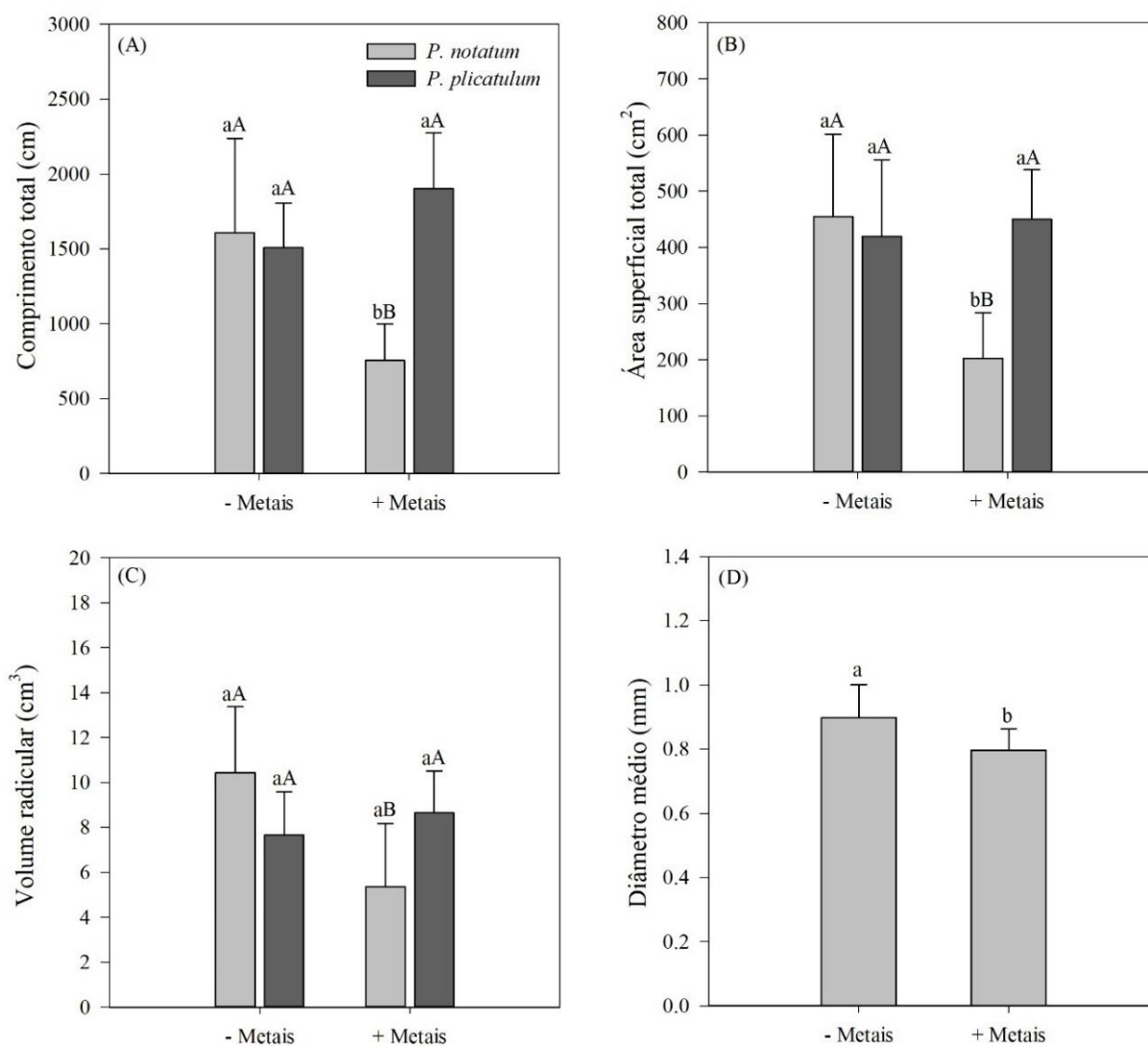


Figura 8. Comprimento total de raízes (A), área superficial total de raízes (B), volume radicular (C) e diâmetro médio radicular (D) de gramíneas de cobertura de solo (*P. notatum* e *P. plicatulum*), cultivadas em consórcio com videiras em solos com -Metais e +Metais. \*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre espécie de gramínea dentro de cada nível de metais e maiúscula entre nível de metais dentro de cada espécie de gramínea não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

## 5.6 DISCUSSÃO

### 5.6.1 Respostas fisiológicas de videiras cultivadas em consórcio com gramíneas nativas em solo com excesso de cobre, manganês e zinco

O consórcio de videiras com as gramíneas nativas do bioma Pampa do sul do Brasil causou a diminuição do número de folhas, altura de plantas e massa seca de folhas das videiras, independente dos dois níveis de metais estudados. Além disso, a massa seca de raízes de videiras também foram diminuídas em consórcio com *P. plicatulum* em solo com baixo nível de metais (-Metais). Segundo Tang et al. (2020) as diferenças em respostas de crescimento podem ser em função das diferentes espécies de plantas utilizadas no consórcio. Isso se confirma diante dos resultados do tratamento com baixos níveis de metais pesados (-Metais), em que a massa seca de raízes e de folhas de videiras foram diminuídas quando consorciadas com *P. plicatulum*, em comparação ao monocultivo. Resultados semelhantes também foram encontrados em outras espécies de plantas e tipos de cultivo, onde o consórcio de *Brassica chinensis* com plantas acumuladoras de Cd também diminuiu o crescimento da cultura principal em relação ao monocultivo (TANG et al., 2020).

O consórcio de videiras com as gramíneas de cobertura de solo diminuiu a produção de biomassa das videiras (especialmente a massa seca de folhas) em relação ao monocultivo. De forma diferente, De Conti et al. (2019) observaram que o efeito de toxicidade do excesso de Cu em videiras jovens foi mitigado pelo consórcio de duas espécies de gramíneas nativas *Axonopus affinis* e *Paspalum plicatulum*, em níveis baixos e moderados de contaminação por Cu. Contudo, solos com elevada concentração de Cu tendem diminuir drasticamente a produção de massa seca de folhas e de caule, quando comparados com solos sem excesso do metal (DE CONTI et al., 2019), assim como a interação de altas concentrações de Cu e Zn podem reduzir a massa seca de raízes e parte aérea de videiras (TIECHER et al., 2017). Porém, esse resultado difere do presente estudo, pois apenas a massa seca de raízes de videiras em consórcio com *P. notatum* diminuiu no solo com +Metais, enquanto as demais variáveis de biomassa não foram afetadas pelo excesso dos metais.

A diminuição no crescimento das videiras cultivadas em consórcio se justifica pela competição por água e nutrientes entre as espécies. Isto se confirma no presente estudo pela variação da concentração de nutrientes encontradas nas raízes e folhas, principalmente para N, P, K, Ca e Mg, em que as videiras em monocultivo apresentaram tendência de maior concentração desses macronutrientes em relação aos sistemas de cultivo em consórcio.

As concentrações de nutrientes nas videiras e gramíneas de cobertura de solo indicam que as gramíneas perenes, como as gramíneas nativas testadas, competem com maior intensidade por N do que outras espécies de cobertura de solo não permanentes (cultivadas), provocando redução da concentração do elemento nos órgãos da videira (GUERRA e STEENWERTH, 2012). Portanto, isso sugere que o cultivo com gramíneas de cobertura de solo influencia sobre a nutrição e crescimento das videiras jovens, e que a redução do crescimento encontrado nos sistemas de cultivo em consórcio no presente estudo ocorreu principalmente pela competição por N.

Em estudo avaliando os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de videiras em consórcio com *Medicago sativa* (leguminosa) em dois tipos de solo, Jeder et al. (2021) observaram que as videiras cultivadas em consórcio apresentaram maior incremento da biomassa em comparação ao monocultivo. Nesse caso, o aumento da biomassa de videiras está diretamente relacionado à maior disponibilidade de N a partir da fixação biológica das leguminosas, que podem beneficiar o crescimento das videiras (JEDER et al., 2021; WHITE et al., 2013), diferentemente de espécies não leguminosas, como as gramíneas usadas no presente trabalho.

Normalmente, o excesso de Cu reduz a concentração de Ca e Mg nos tecidos, enquanto o K pode permanecer inalterado nos diferentes tecidos (JUANG et al., 2019), corroborando e justificando os resultados encontrados no presente estudo. A redução da absorção e concentração de nutrientes como Ca e Mg nas raízes e folhas de videiras, indica que o excesso de metais prejudica o processo de absorção de nutrientes, resultando em alterações no estado nutricional das plantas (AMBROSINI et al., 2018).

A menor absorção de nutrientes é um sintoma típico em relação a toxicidade dos metais nas plantas, em função de afetar negativamente a permeabilidade das membranas e atividade dos transportadores, o qual pode ser responsável pelo desequilíbrio da concentração dos nutrientes nos tecidos das plantas (CAMBROLLÉ et al., 2015; TIECHER et al., 2017). Da mesma forma, em estudos com excesso de Cu no solo, houve diminuição da concentração de Ca e Mg nos tecidos vegetais de videiras jovens da variedade ‘Sangiovese’ (TOSELLI et al., 2009) e ‘Niágara Rosada’ (OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto, é importante destacar que no presente estudo, a concentração de macronutrientes também diminuiu nas videiras cultivadas em consórcio com gramíneas nativas, o qual contribuíram para a diminuição do crescimento em relação as videiras em monocultivo.

Como esperado, a concentração de Cu e Zn aumentaram nos tecidos em função da variação da concentração dos metais pesados no solo, sendo as raízes o órgão de maior concentração e com baixa translocação para a parte aérea. Essa resposta pode ser considerada



como uma estratégia de tolerância a fim de evitar translocação do metal para as folhas, onde poderia resultar em maiores danos aos processos fisiológicos (GIROTTTO et al., 2016; JUANG et al., 2012). Resultados semelhantes também foram encontrados por De Conti et al. (2019) e Tiecher et al. (2017). Entretanto, é importante destacar que o consórcio com as gramíneas nativas possibilitou menor acúmulo do Cu e Zn nos tecidos da videira, principalmente nas raízes.

Nos sistemas de consórcio, a concentração de Mn diminuiu nas folhas de videiras no solo com +Metais, resposta que contrasta com aquelas de De Conti et al. (2019). Outra resposta que chamou a atenção, relaciona-se a maior concentração de Zn e Fe observadas principalmente nas raízes de videiras em solo com +Metais. Por outro lado, o consórcio das videiras com gramíneas nativas resultou em diminuição da concentração de Zn nos tecidos em relação ao monocultivo. A maior concentração de Zn nas raízes de videiras cultivadas em solo com +Metais está relacionada com a maior concentração do elemento no solo, visto que a concentração era quase o dobro do que no solo com -Metais.

Os efeitos do consórcio com plantas de cobertura de solo são atribuídos à interação mútua entre as espécies em determinado espaço no solo (DE CONTI et al., 2019). As raízes das plantas podem exsudar compostos orgânicos solúveis (ácidos orgânicos e compostos fenólicos) que podem complexar os metais no solo, assim reduzindo sua biodisponibilidade e conseqüentemente seu potencial de causar toxidez (KIM et al., 2010; NIAN et al., 2002), mas com absorção equilibrada dos nutrientes. A presença de raízes de diferentes espécies de plantas em um mesmo volume de solo pode resultar em competição por água e nutrientes pelas espécies, sendo que ambas as condições devem ser satisfeitas, a fim de limitar a disponibilidade de metais pesados na rizosfera (DE CONTI et al., 2018; DE CONTI et al., 2019). Contudo, essa competição se confirma também pelos resultados obtidos com a biometria do sistema radicular (Figura 4).

As variáveis da biometria do sistema radicular também foram diminuídas nos sistemas de cultivo em consórcio. Essa redução se justifica pela competição entre raízes de videiras com raízes de gramíneas nativas, visto que ambas ficaram limitadas em função do tamanho do recipiente de cultivo das plantas. Em cultivos com condições adversas, como o excesso de metais pesados, o crescimento radicular pode ser inibido, reduzindo a capacidade de absorção de água e nutrientes (KARLIDAG et al., 2010). Porém, no presente estudo, a biometria do sistema radicular de videiras não apresentou diferença significativa em relação às concentrações dos metais presentes no solo.

Em videiras, o excesso de Cu pode causar danos as membranas celulares e proporcionar alterações morfológicas nas raízes, como escurecimento, alongamento atrofiado, aumento do diâmetro e menor formação de pelos nos sistemas radiculares, afetando ainda mais a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento das videiras (AMBROSINI et al., 2018; JUANG et al., 2019; TIECHER et al., 2018). Dessa forma, escurecimento de raiz também foram observadas em nosso estudo, especialmente em solos com +Metais, o qual pode ter auxiliado sobre a limitação do crescimento das videiras.

Em condições de estresse por metais pesados, como Cu, a estrutura e composição das membranas dos tilacoides do cloroplasto podem ser afetadas e causar redução da taxa fotossintética líquida e atividade da rubisco (MIR, PICHTEL, HAYAT, 2021). Com isso, pode haver menor dissipação de energia da fotoquímica e maior dissipação na forma de fluorescência de clorofila *a*, influenciando negativamente sobre o desempenho funcional do fotossistema II (AMBROSINI et al., 2018; TIECHER et al., 2017). No presente estudo, o consórcio de videiras com gramíneas nativas não apresentou diferenças de fotossíntese em relação aos dois níveis de metais presentes no solo. O aumento da fluorescência inicial e máxima nas folhas de videiras consorciadas com *P. notatum* pode estar associado à redução do funcionamento do aparato fotossintético, podendo resultar no aumento da fotoinibição do fotossistema II (CAMBROLLÉ et al., 2015). Entretanto, folhas de videiras consorciadas com *P. notatum* apresentaram maior rendimento quântico potencial do fotossistema II, juntamente com videiras em monocultivo, e maiores valores de taxa fotossintética líquida e eficiência de carboxilação instantânea da rubisco. Assim, entende-se que o cultivo de videiras com *P. notatum* proporcionou melhores respostas de fotossíntese em relação ao monocultivo, e que a redução do crescimento se deve pela competição com as gramíneas nativas por água e nutrientes. De maneira semelhante, videiras consorciadas com *Medicago sativa* apresentaram maior taxa fotossintética líquida em relação a videiras em monocultivo (JEDER et al., 2021).

Ainda com relação a fotossíntese, é importante salientar que a taxa de transpiração e a condutância estomática foram reduzidas no consórcio com *P. plicatulum*, ou seja, houve redução da capacidade da planta realizar trocas gasosas, que justifica a diminuição da taxa fotossintética líquida. Além disso, a redução da concentração de K nas folhas possivelmente contribuiu para essas respostas de redução da capacidade de trocas gasosas pelos estômatos. Por outro lado, a concentração de CO<sub>2</sub> intercelular aumentou significativamente em folhas de videiras em monocultivo. Isso demonstra que a planta não foi eficiente no processo de fixação do carbono e também justifica a redução da taxa fotossintética líquida em relação ao consórcio com *P. notatum*.

Os resultados benéficos do consórcio de *P. notatum* sobre os parâmetros fotossintéticos das videiras, confirmam o efeito benéfico do consórcio de plantas em solos contaminados com metais pesados (CONTRERAS et al., 2019; DE CONTI et al., 2019; JEDER et al., 2021). Mas, levando-se em consideração fitoremediação de solos contaminados por metais pesados, é necessária a integração de diversas estratégias de manejo a fim de garantir o adequado crescimento e desenvolvimento das videiras (OUSTRIERE et al., 2016). Nesse estudo, foi possível observar que o consórcio com *P. notatum* favoreceu o processo de fotossíntese de videiras, mas promoveu redução do crescimento em função de competição entre plantas devido ao pequeno volume de solo usado no experimento. Entretanto, as espécies de plantas em consórcio se apresentam como potenciais fitoestabilizadoras de metais para o cultivo da videira, assim como já confirmado com outras espécies de plantas cultivadas em consórcio com videiras (DE CONTI et al., 2019; JEDER et al., 2021).

### **5.6.2 Respostas fisiológicas de gramíneas nativas cultivadas em consórcio com videiras em solo com excesso de cobre, manganês e zinco.**

As gramíneas de cobertura de solo nativas do bioma Pampa apresentaram diferentes respostas em relação aos dois níveis de metais pesados estudados. De maneira geral, mesmo melhorando as respostas relacionadas à fotossíntese de videiras, a espécie de *P. notatum* se mostrou mais sensível ao excesso dos metais Cu, Mn e Zn. Por outro lado, *P. plicatulum* apresentou poucas alterações com a variação da concentração dos metais no solo. Em *P. notatum* foi possível observar clorose foliar intensa em solo com excesso de Cu, Mn e Zn (+Metais). Dessa forma, essa gramínea pode funcionar como uma planta indicadora do excesso de Cu nas áreas de vinhedos. A clorose foliar causada pelo excesso de Cu normalmente provoca deficiência induzida de alguns nutrientes, como Fe (MARASTONI et al., 2019; SALEEM et al., 2020). Porém, a clorose observada no *P. notatum* com +Metais talvez não tenha sido provocada exclusivamente pela deficiência de Fe, pois a concentração de Fe aumentou nas folhas no cultivo em solo com +Metais. Acredita-se que a clorose possa estar relacionada à diminuição da concentração de Mg nas folhas de plantas em +Metais, visto que é um nutriente constituinte da molécula de clorofila que pode ser substituído por um metal e alterar suas funções (YRUELA, 2009).

Como esperado, a concentração de Cu aumentou nas raízes e parte aérea das duas espécies de gramíneas, com maior concentração nas raízes (Tabela 3). Porém, o excesso dos metais resultou apenas em diminuição da concentração de Mg na parte aérea e Mn nas raízes e parte aérea de *P. notatum*, enquanto diminuiu Ca, Mg e Mn na parte aérea de *P. plicatulum*.

Para Ca e Mg esses resultados estão de acordo com demais estudos com excesso de Cu (JUANG et al., 2019). Entretanto, havia a hipótese de que a maior concentração de Cu no solo resultaria em maior concentração de Mn nos tecidos, assim como observado por De Conti et al. (2019) e Trentin et al. (2019). No presente trabalho o excesso de Cu, associado ao excesso de Zn e Mn no solo, diminuiu a concentração de Mn nos tecidos das plantas, tanto das gramíneas como nas videiras. Por outro lado, o que chamou a atenção foi o aumento da concentração de Zn nas raízes e na parte aérea das gramíneas, em ambas as espécies.

De forma semelhante, Schwalbert et al. (2022) observaram que houve aumento da concentração de Cu nas raízes de *P. notatum* e *P. plicatulum* conforme o aumento da concentração de Zn no solo. Embora a concentração de Zn aumentou no solo +Metais, os altos níveis do elemento concentrado nas raízes e parte aérea de gramíneas demonstram existir interação entre Cu e Zn e destacam sinal de alerta para os cultivos em solos com excesso desses elementos. Além disso, mesmo com altas concentrações dos metais nos tecidos (Tabela 3), as gramíneas demonstraram tolerância, principalmente *P. plicatulum*, e de certa forma evitaram o acúmulo excessivo de Zn no tecido foliar das videiras cultivadas em consórcio (Tabela 2).

O excesso de Cu e Zn podem causar toxicidade e inibir o crescimento e desenvolvimento das plantas a partir de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas (MIR; PICHTEL; HAYAT, 2021; SCHWALBERT et al., 2022). Essas alterações em altas concentrações de Cu impedem o crescimento radicular e afetam a fotossíntese, resultando em redução da biomassa e aparecimento de clorose foliar (MIR; PICHTEL; HAYAT, 2021; YANG et al., 2015). No presente estudo, todas essas respostas fisiológicas foram confirmadas para *P. notatum* cultivada em solo com +Metais. Porém, é importante destacar que as videiras cultivadas em consórcio foram favorecidas no processo de fotossíntese. O *P. plicatulum* se mostrou mais tolerante ao excesso dos metais em relação ao *P. notatum*, apresentando diminuição apenas na massa seca de parte aérea. Entretanto, isso não resultou em melhoria das características fisiológicas das videiras, o qual pode estar relacionado à fatores de competição entre as plantas.

A toxicidade causada pelo excesso de metais danifica a estrutura do cloroplasto, prejudicando a estrutura e composição da membrana do tilacoide que pode inibir a cadeia transportadora de elétrons e diminuir a atividade do fotossistema II, além de limitar a atividade da rubisco e, conseqüentemente, diminuir a fotossíntese líquida da planta (MIR; PICHTEL; HAYAT, 2021; SCHWALBERT et al., 2022). Diante das alterações fisiológicas provocadas também na composição dos pigmentos fotossintéticos do cloroplasto, a clorose foliar é um sintoma típico que ocorre em função da toxicidade por Cu (RECKOVA et al., 2019), assim

como observado em *P. notatum*. Essa espécie apresentou diminuição da taxa de transporte de elétrons, rendimento quântico do fotossistema II e taxa de fotossíntese líquida, bem como clorose foliar quando cultivada em solo com +Metais.

O fotossistema II é altamente sensível ao excesso de Cu. Portanto, pode-se sugerir que o excesso de Cu, Mn e Zn foram prejudiciais para *P. notatum* por inibir a síntese de clorofila, afetar a eficiência do fotossistema II, limitar as trocas gasosas da folha com o ambiente e, conseqüentemente reduzir a fotossíntese das plantas. Esses atributos também confirmam e justificam a diminuição da biomassa por essa gramínea quando cultivada em consórcio com videiras em solo com +Metais. Contudo, a redução da produção de fotoassimilados nas folhas também pode auxiliar na redução do crescimento radicular das plantas, visto que o excesso de metais, normalmente provocam modificações ao sistema radicular das plantas. Dessa forma, a biometria de raízes de *P. notatum* foi afetada negativamente pelo excesso dos metais, que resultou em redução do comprimento total, área superficial e volume de raízes. Portanto, esses resultados se justificam em função do excesso de metais causar inibição da divisão celular e da formação de pelos radiculares e conseqüentemente, diminuir o crescimento radicular (MARQUES et al., 2018).

O uso de plantas de cobertura de solo vem se tornando uma prática comum de manejo de solo entre as fileiras dos vinhedos devido a inúmeros benefícios como proteção do solo à erosão, regulação do crescimento de videiras, melhoria da fertilidade do solo, melhoraria na capacidade de retenção de água, diversidade biológica do solo, controle e supressão de plantas daninhas (GUERRA e STEENWERTH, 2012). Portanto, mesmo que o consórcio com gramíneas possa reduzir o crescimento das videiras, o consórcio especialmente com *P. notatum* melhorou as respostas fotossintéticas das videiras, que podem ser observadas pela diminuição da concentração de alguns nutrientes potencialmente tóxicos.

Diante dos inúmeros benefícios proporcionados pelo uso de gramíneas de cobertura de solo, recomenda-se a manutenção dessas espécies no interior dos vinhedos tanto em áreas com baixa ou alta concentração de metais, pois além de favorecer algumas respostas fisiológicas nos cultivos com videiras, é importante a preservação e manutenção das espécies de gramíneas nativas que caracterizam o bioma Pampa. Além disso, a clorose observada na espécie de *P. notatum* em solo com +Metais pode se tornar um indicativo de suposta presença de excesso de metais no ambiente ocupado pela planta, facilitando a identificação dos solos contaminados.

## 5.7 CONCLUSÃO

O consórcio de videiras jovens com *Paspalum notatum* foi eficiente para promover melhores respostas de fotossíntese nas plantas de videiras independente da concentração dos metais Cu, Mn e Zn. Porém, o consórcio de videiras com gramíneas nativas de cobertura de solo promoveu diminuição do crescimento e biometria do sistema radicular das videiras devido a competição por água e nutrientes entre as plantas. O excesso de Cu, Mn e Zn no solo promoveram maior concentração de Cu nos tecidos das videiras, mas isso foi diminuído quando consorciado com gramíneas nativas. O excesso de Cu diminuiu a absorção e concentração de Mn nos tecidos, mas por outro lado aumentou consideravelmente as concentrações de Zn.

Os efeitos fitotóxicos do excesso de Cu, Mn e Zn foram marcadamente evidenciados visualmente pela clorose foliar nas plantas de *Paspalum notatum*, que também apresentou diminuição do crescimento, fotossíntese e biometria do sistema radicular. Apesar disso, houve benefício da fotossíntese das videiras no cultivo em consórcio com *Paspalum notatum*. Além disso, essa gramínea pode funcionar como uma “planta indicadora” de solo contaminado nas áreas de vinhedos. O *Paspalum plicatulum* se mostrou mais tolerante ao excesso dos metais, com redução apenas da massa seca de parte aérea.

As gramíneas nativas do bioma Pampa presentes em áreas de vinhedos apresentam potencial de fitoestabilização de metais pesados, assim beneficiando as videiras. Desse modo, recomenda-se manter as gramíneas nativas nas entrelinhas dos vinhedos. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar o potencial de fitoestabilização e/ou fitorremediação das gramíneas nativas em vinhedos e pomares em geral, bem como avaliar respostas fisiológicas de diferentes variedades de plantas em experimentos usando recipientes com maior quantidade de solo e a interação entre os metais pesados presentes em excesso nos solos.

**AGRADECIMENTOS:** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSINI, V. G. et al. High copper content in vineyard soils promotes modifications in photosynthetic parameters and morphological changes in the root system of ‘Red Niagara’ plantlets. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 89-98, 2018.

- BALDI, E. et al. Soil-applied phosphorous is an effective tool to mitigate the toxicity of copper excess on grapevine grown in rhizobox. **Scientia horticulturae**, v. 227, p. 102-111, 2018.
- BRUNETTO, G. et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016.
- BRUNETTO, G. et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 5, p. 609-624, 2014.
- CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v. 120, p. 171-178, 2015.
- CONTRERAS, F. et al. Prospecting intercropping between subterranean clover and grapevine as potential strategy for improving grapevine performance. **Current Plant Biology**, v. 19, p. 100110, 2019.
- DE CONTI, L. et al. Growth and chemical changes in the rhizosphere of black oat (*Avena strigosa*) grown in soils contaminated with copper. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 163, p. 19-27, 2018.
- DE CONTI, L. et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos plantas e fertilizantes**. 2 ed., Brasília, 2009. 627 p.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952, 2014.
- GIROTTI, E. et al. Biochemical changes in black oat (*Avena strigosa* Schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 199-207, 2016.
- GIROTTI, E. et al. Copper availability assessment of Cu-contaminated vineyard soils using black oat cultivation and chemical extractants. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 12, p. 9051-9063, 2014.
- GUERRA, B.; STEENWERTH, K. Influence of floor management technique on grapevine growth, disease pressure, and juice and wine composition: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 63, n. 2, p. 149-164, 2012.
- HU, R. et al. Intercropping with hyperaccumulator plants decreases the cadmium accumulation in grape seedlings. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science**, v. 69, n. 4, p. 304-310, 2019.
- JEDER, S. et al. Effect of intercropping alfalfa on physiological and biochemical parameters of young grapevine plants cultivated on agricultural and contaminated soils. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 49, n. 1, p. 12017-12017, 2021.

- JUANG, K. W. et al. Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 4, p. 1315-1322, 2012.
- JUANG, K. W. et al. Effects of copper on root morphology, cations accumulation, and oxidative stress of grapevine seedlings. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 102, n. 6, p. 873-879, 2019.
- KARLIDAG, H. et al. Effects of plant growth promoting bacteria on yield, growth, leaf water content, membrane permeability, and ionic composition of strawberry under saline conditions. **Journal of plant nutrition**, v. 34, n. 1, p. 34-45, 2010.
- KIM, K. R. et al. Influence of plant roots on rhizosphere soil solution composition of long-term contaminated soils. **Geoderma**, v. 155, n. 1-2, p. 86-92, 2010.
- KOMÁREK, M. et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environment international**, v. 36, n. 1, p. 138-151, 2010.
- LEGUIZAMO, M. A. O.; GÓMEZ, W. D. F.; SARMIENTO, M. C. G. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands - a review. **Chemosphere**, v. 168, p. 1230-1247, 2017.
- MARASTONI, L. et al. The potential of two different *Avena sativa* L. cultivars to alleviate Cu toxicity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 182, p. 109430, 2019.
- MARQUES, D. M. et al. Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 5, p. 1-14, 2018.
- MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Third. Academic Press, London. 2012.
- MILLALEO, R. et al. Excess manganese differentially inhibits photosystem I versus II in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 1, p. 343-354, 2012.
- MIOTTO, A. et al. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, n. 1-2, p. 593-610, 2014.
- MIR, A. R.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. **BioMetals**, p. 1-23, 2021.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.
- NIAN, H. et al. A comparative study on the aluminium-and copper-induced organic acid exudation from wheat roots. **Physiologia Plantarum**, v. 116, n. 3, p. 328-335, 2002.
- OLIVEIRA, P. D. et al. Uso de calcário na amenização da toxidez de cobre em videiras jovens. **Científica**, v. 43, n. 4, p. 427-435, 2015.



OUSTRIERE, N. et al. Influence of biochars, compost and iron grit, alone and in combination, on copper solubility and phytotoxicity in a Cu-contaminated soil from a wood preservation site. **Science of the Total Environment**, v. 566, p. 816-825, 2016.

QUADROS, F. D.; TRINDADE, J. P. P.; BORBA, M. A abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. **Campos Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, cap. v. 15, p. 206-213, 2009.

RECKOVA, S. et al. Influence of copper on hormone content and selected morphological, physiological and biochemical parameters of hydroponically grown *Zea mays* plants. **Plant Growth Regulation**, v. 89, n. 2, p. 191-201, 2019.

SALEEM, M. H. et al. Morpho-physiological traits, biochemical response and phytoextraction potential of short-term copper stress on kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seedlings. **PeerJ**, v. 8, p. e8321, 2020.

SCHWALBERT, R. et al. How do native grasses from South America handle zinc excess in the soil? A physiological approach. **Environmental and Experimental Botany**, p. 104779, 2022.

SOUZA, T. C. et al. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 2, p. 515-527, 2013.

TANG, Y. et al. Effects of intercropping accumulator plants and applying their straw on the growth and cadmium accumulation of *Brassica chinensis* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 39094-39104, 2020.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TIECHER, T. L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017.

TIECHER, T. L. et al. The interaction of high copper and zinc doses in acid soil changes the physiological state and development of the root system in young grapevines (*Vitis vinifera*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 985-994, 2018.

TOSELLI, M. et al. Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, n. 1, p. 85-92, 2009.

TRENTIN, E. et al. Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. **Chemosphere**, v. 226, p. 421-430, 2019.

- WAN, X. et al. Intercropped *Pteris vittata* L. and *Morus alba* L. presents a safe utilization mode for arsenic-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1467-1475, 2017.
- WHITE, P. J. et al. Matching roots to their environment. **Annals of botany**, v. 112, n. 2, p. 207-222, 2013.
- XIAO, Z. et al. Cadmium accumulation in oilseed rape is promoted by intercropping with faba bean and ryegrass. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111162, 2020.
- YAN, Y. et al. Potential evaluation of different intercropping remediation modes based on remediation efficiency and economic benefits-a case study of arsenic-contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, p. 1-9, 2021.
- YANG, J. et al. Overexpression of the *Tamarix hispida* ThMT 3 gene increases copper tolerance and adventitious root induction in *Salix matsudana* Koidz. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 121, n. 2, p. 469-479, 2015.
- YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009.
- ZHAO, J. et al. Manganese toxicity inhibited root growth by disrupting auxin biosynthesis and transport in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 272, 2017.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

A contaminação dos solos de vinhedos com metais pesados como Cu, Mn e Zn é promovido principalmente pelas aplicações sucessivas de fungicidas, para controle de várias doenças fúngicas. Desse modo, esses elementos podem escoar das folhas, se acumulam no solo e ao serem absorvidos pelas plantas podem ocasionar diversos distúrbios fisiológicos, tanto em videiras como em gramíneas nativas e exóticas que coabitam essas áreas de vinhedos e são comumente manejadas como plantas de cobertura de solo. No presente trabalho foram simuladas condições de excesso de Mn e a interação do excesso de Cu e Mn sobre as respostas fisiológicas de gramíneas de cobertura de solo nativas (*Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*) e exóticas (*Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*) em cultivo em solução nutritiva. Posteriormente, as gramíneas nativas foram cultivadas em consórcio com videiras jovens (cv. Cabernet Sauvignon enxertadas em SO4) em solo coletado de áreas de vinhedos com excesso de metais como Cu, Mn e Zn e denominados de baixo nível de metais (-Metais) e alto nível de metais (+Metais) no estudo.

No estudo com excesso de Mn (Artigo I), as gramíneas demonstraram elevado potencial de tolerância e capacidade de apresentar elevadas concentrações de Mn nos tecidos, principalmente na parte aérea. A espécie de *Paspalum plicatulum*, por exemplo, apresentou concentração média de 3.157 mg de Mn kg<sup>-1</sup> de massa seca na parte aérea, valor quase oito vezes maior do que é considerado como nível crítico (400 mg kg<sup>-1</sup>) para a maioria das espécies cultivadas. Contudo, mesmo com elevada concentração de Mn nos tecidos, o crescimento da maioria das gramíneas foi semelhante ao controle, ou seja, as plantas apresentam mecanismos de manter o Mn em locais que diminuem a toxicidade para as células. Esses mecanismos envolvem a compartimentalização subcelular do Mn em organelas menos ativas, como parede celular e vacúolos, onde mais de 80% de todo Mn absorvido ficou concentrado nessas organelas. Além disso, com o excesso de Mn, a principal organela de acúmulo para *Avena strigosa* foi o vacúolo, enquanto para as demais gramíneas estudadas foram as paredes celulares.

A espécie de *Lolium multiflorum* se mostrou mais sensível ao excesso de Mn, pois suas respostas fisiológicas foram afetadas mais negativamente. Além disso, foi a única espécie que apresentou sintomas de toxicidade por Mn, caracterizado por manchas necróticas marrons em folhas velhas, bem como diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos. Contudo, as respostas fisiológicas, bioquímicas e nutricionais melhoraram para a maioria das gramíneas na presença de 300 µM de Mn. Portanto, esse estudo demonstrou a alta capacidade de tolerância

ao excesso de Mn pelas gramíneas que coabitam áreas de vinhedos do bioma Pampa, bem como seu potencial para fitorremediação de solos contaminados com Mn.

No estudo com excesso de Cu e Mn (Artigo II), a interação do excesso dos metais modificou as respostas fisiológicas das gramíneas de cobertura de solo. O excesso de Cu demonstrou ser potencialmente mais tóxico que o excesso de Mn nas gramíneas. Porém, a combinação do excesso de Cu e Mn não intensificou o efeito de toxicidade nas gramíneas quando comparado somente ao excesso de Cu, rejeitando-se a hipótese inicial de que o excesso dos dois metais resultaria em maiores injúrias fisiológicas às plantas. Entretanto, todas as combinações contendo excesso de Cu diminuíram a biomassa, taxas de crescimento, biometria do sistema radicular, fotossíntese, concentração de pigmentos fotossintéticos e atividade de enzimas antioxidantes e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio.

As gramíneas apresentaram elevadas concentrações de Cu nas raízes, sendo que a combinação do excesso de Cu e Mn ( $H^{Mn}H^{Cu}$ ) aumentaram a concentração de Cu nas raízes para todas as gramíneas e diminuíram na parte aérea das gramíneas nativas em comparação ao excesso somente de Cu. O excesso de Mn não apresentou variação da concentração na parte aérea das gramíneas, exceto em *Paspalum plicatulum* onde diminuiu a concentração de Mn na presença de excesso de Cu e Mn ( $H^{Mn}H^{Cu}$ ). Além disso, o excesso dos metais provocou modificações no processo de absorção, translocação e concentração de macronutrientes e micronutrientes conforme exposto na análise nutricional dos tecidos de cada gramínea.

Para as combinações contendo excesso de Cu ( $L^{Mn}H^{Cu}$  e  $H^{Mn}H^{Cu}$ ) todas as gramíneas apresentaram visualmente sintomas de toxicidade, causado inicialmente pelo escurecimento do ápice das raízes e inibição do crescimento radicular. Esse escurecimento nas pontas das raízes foi verificado cerca de dois dias após o início dos tratamentos, sendo facilitado a visualização pelo cultivo das gramíneas ser em solução nutritiva. Na parte aérea das gramíneas, os sintomas de toxicidade causados pelo excesso de Cu foram caracterizados por clorose internerval, ocorrendo inicialmente em folhas jovens, e posteriormente se intensificando nas demais folhas. Para o excesso de Mn, houve o aparecimento de sintomas de toxicidade em *Lolium multiflorum* de forma semelhante ao encontrado e caracterizado no Artigo I.

Como as espécies de gramíneas nativas crescem e se desenvolvem em locais comumente com excesso de metais pesados e são manejadas como plantas de cobertura de solo, como em área de vinhedos do bioma Pampa, surgiu a necessidade de estudar também o efeito do consórcio de videiras com gramíneas nativas em solo contaminado. Para isso, no estudo de consórcio (Artigo III), videiras foram cultivadas em monocultivo e em consórcio com *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* em dois níveis de metais pesados no solo

(denominados -Metais e +Metais). De forma diferente do esperado, o consórcio com as gramíneas diminuiu o crescimento e biometria do sistema radicular das videiras. Porém, o consórcio com *Paspalum notatum* (videira + *P. notatum*) melhorou as variáveis de fotossíntese das videiras, independentemente do nível dos metais.

As concentrações de metais como Cu, Mn e Zn foram diminuídas nos tecidos das videiras na maioria dos sistemas de cultivo em consórcio. As concentrações de Mn foram diminuídas nas folhas de videiras e de gramíneas em solo com excesso de metais (+Metais), diferentemente do que era esperado. Os resultados indicam que as gramíneas possuem potencial de fitoestabilização dos metais e, portanto, melhoria das respostas fisiológicas das videiras. Contudo, as respostas favoráveis ao crescimento das videiras não foram obtidas nos sistemas de cultivo em consórcio nesse estudo, devido provavelmente a competição entre plantas por água, nutrientes e espaço no recipiente de cultivo. Porém, acredita-se que além dos benefícios proporcionados na cobertura de solo, as gramíneas nativas têm potencial para favorecer o crescimento e desenvolvimento de videiras em solos contaminados por metais pesados.

As gramíneas nativas de cobertura de solo apresentaram bom crescimento e desenvolvimento no solo com excesso de metais. Porém, a espécie de *Paspalum notatum* apresentou-se mais sensível ao solo com excesso de metais (+Metais), fato demonstrado pelo aparecimento de clorose foliar e efeitos negativos nas respostas fisiológicas da planta. Por outro lado, essa gramínea favoreceu as respostas fotossintéticas das videiras. A partir dos sintomas de toxicidade apresentados pela gramínea, ela pode ser considerada uma planta indicadora em áreas com excesso de metais. O *Paspalum plicatulum* se mostrou mais tolerante ao excesso de metais, mas isso não resultou em melhoria das respostas fisiológicas das videiras. Contudo, é importante destacar que as gramíneas nativas absorveram e concentraram elevada quantidade dos metais em seus tecidos, com destaque para Cu, Mn e Zn.

Portanto, as gramíneas nativas podem ser consideradas plantas potencialmente fitoestabilizadoras de solos contaminados e, por isso devem ser mantidas e manejadas como plantas de cobertura de solo nas áreas de vinhedos. Durante a estação de inverno na região sul do Brasil, a introdução de espécies exóticas como a *Avena strigosa* e *Lolium multiflorum* é uma alternativa interessante para manutenção da cobertura de solo e incremento de matéria orgânica, visto que as espécies nativas diminuem seu crescimento nesse período. Contudo, a manutenção das gramíneas de cobertura de solo nas entrelinhas dos vinhedos é uma forma de preservação da biodiversidade das espécies nativas do bioma Pampa do sul do Brasil.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

As gramíneas de cobertura de solo de vinhedos apresentaram elevadas concentrações de Mn nos tecidos e, por outro lado, pequenas modificações nas respostas fisiológicas das plantas. Os mecanismos de tolerância ao excesso de Mn adotados pelas gramíneas incluem o armazenamento do metal em organelas menos ativas como os vacúolos e paredes celulares. Isso resultou em menor produção de espécies reativas de oxigênio, as quais são responsáveis por causar estresse oxidativo. O *Lolium multiflorum* foi a espécie de gramínea mais sensível ao excesso de Mn, o qual afetou negativamente diversas respostas fisiológicas e com presença de sintomas de toxicidade caracterizados por manchas necróticas marrons em folhas velhas.

A interação do excesso de Cu e Mn não intensifica os efeitos de toxicidade dos metais e não aumenta a concentração de Mn nos tecidos, mas provoca alterações no estado nutricional das plantas, principalmente em relação ao excesso de Cu que é potencialmente mais tóxico que o Mn. Contudo, o excesso de Cu e Mn afetou a taxa fotossintética líquida das espécies de *Avena strigosa* e *Paspalum notatum*. As gramíneas apresentam capacidade de concentrar grande quantidade dos metais nos tecidos, sendo o Cu armazenado preferencialmente nas raízes, como mecanismo a fim de reduzir a translocação para a parte aérea onde os efeitos de toxicidade poderiam ser mais severos. O excesso de Cu afeta as respostas fisiológicas das plantas como produção biomassa, fotossíntese, pigmentos fotossintéticos, produção de espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes, biometria do sistema radicular e absorção e translocação de outros nutrientes. Os sintomas de toxicidade são caracterizados por inibição do crescimento do sistema radicular e clorose internerval nas folhas novas.

O consórcio de videiras com as gramíneas nativas do bioma Pampa diminuiu o crescimento de videiras por fatores de competição, mas o consórcio com *Paspalum notatum* melhorou as respostas de fotossíntese das videiras tanto em solo com baixa quanto com alta concentração de metais (Cu, Mn e Zn). A concentração desses metais nos tecidos de videiras diminuiu quando consorciadas com as gramíneas nativas. O solo contaminado afetou as respostas fisiológicas de *Paspalum notatum*, apresentando clorose foliar como sintomas de toxicidade. Consequentemente, essa espécie pode ser considerada como uma planta indicadora de solo contaminado nas áreas de vinhedos. De qualquer forma, recomenda-se a manutenção de gramíneas nativas nas entrelinhas de vinhedos, pois além do potencial de fitoestabilização e/ou fitoremediação e benefícios que plantas de cobertura de solo podem fornecer às videiras, é essencial para a diversidade e conservação das características do bioma Pampa, no sul do Brasil.

## **8 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS**

- a) Avaliar o efeito combinado do excesso de Cu, Mn e Zn sobre a diversidade de espécies nativas do bioma Pampa, que coabitam as áreas de vinhedos.
  
- b) Avaliar os benefícios do consórcio de gramíneas de cobertura de solo considerando a diversidade de espécies do bioma Pampa, bem como com espécies de leguminosas, sob o crescimento e desenvolvimento de videiras.
  
- c) Avaliar a composição dos exsudados radiculares das diferentes espécies de gramíneas de cobertura de solo como mecanismo de complexação dos metais e potencial de fitoestabilização em cultivos em consórcio.
  
- d) Estudar estratégias de manejo que contribuem para mitigar o efeito de toxidez dos metais pesados sobre as videiras e gramíneas de cobertura de solo.

## REFERÊNCIAS

- ALI, Hazrat; KHAN, Ezzat; SAJAD, Muhammad Anwar. Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869-881, 2013.
- ARSLAN, Hülya et al. Responses of ruderal *Verbascum olympicum* Boiss. (Scrophulariaceae) growing under cadmium stress. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 42, n. 6, p. 824-835, 2014.
- BALDI, Elena et al. Soil-applied phosphorous is an effective tool to mitigate the toxicity of copper excess on grapevine grown in rhizobox. **Scientia horticultrae**, v. 227, p. 102-111, 2018.
- BARBOSA, Marta Ribeiro et al. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BENEDET, Lucas et al. Copper and zinc in rhizosphere soil and toxicity potential in white oats (*Avena sativa*) grown in soil with long-term pig manure application. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 8, p. 1-10, 2019.
- BENEDET, Lucas et al. Copper and Zn distribution in humic substances of soil after 10 years of pig manure application in south of Santa Catarina, Brazil. **Environmental geochemistry and health**, v. 42, n. 10, p. 3281-3301, 2020.
- BOCHICCHIO, Rocco et al. 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 Physiology and Biochemistry**, v. 91, p. 20-27, 2015.
- BOLDRINI, Ilsi Iob. **Campos no Rio Grande do Sul. Fisionomia e problemática ocupacional**. Boletim do Instituto de Biociências da UFRGS, v. 56, p. 1-39, 1997.
- BOLDRINI, Ilsi Iob et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre – Ed. Palotti – p. 64, 2010.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Pampa. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>>. Acesso em: 06 Abr. 2019.
- BRUNETTO, Gustavo et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016.
- BRUNETTO, Gustavo et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 5, p. 609-624, 2014.
- CAMBROLLÉ, Jesús et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v. 120, p. 171-178, 2015.
- CEBALLOS-LAITA, Laura et al. Effects of manganese toxicity on the protein profile of tomato (*Solanum lycopersicum*) roots as revealed by two complementary proteomic approaches, two-dimensional electrophoresis and shotgun analysis. **Journal of proteomics**, v. 185, p. 51-63, 2018.



CHEN, Yi-Tze; WANG, Ying; YEH, Kuo-Chen. Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. **Current opinion in plant biology**, v. 39, p. 66-72, 2017.

CHEN, Zhijian et al. Malate synthesis and secretion mediated by a manganese-enhanced malate dehydrogenase confers superior manganese tolerance in *Stylosanthes guianensis*. **Plant Physiology**, v. 167, n. 1, p. 176-188, 2015.

CHEN, Zhijian et al. Malate synthesis and secretion mediated by a Mn enhanced malate dehydrogenase, SgMDH1, confers superior Mn tolerance in *Stylosanthes guianensis*. **Plant Physiology**, p. pp. 114.251017, 2014.

CHEN, Zhijian et al. Proteomic analysis reveals growth inhibition of soybean roots by manganese toxicity is associated with alteration of cell wall structure and lignification. **Journal of proteomics**, v. 143, p. 151-160, 2016.

COMIN, Jucinei José et al. Liming as a means of reducing copper toxicity in black oats. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

COUTO, Rafael da Rosa et al. Environmental vulnerability and phosphorus fractions of areas with pig slurry applied to the soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 44, n. 1, p. 162-173, 2015.

DA SILVA, Fernando Bruno Vieira et al. Assessing heavy metal sources in sugarcane Brazilian soils: an approach using multivariate analysis. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 8, p. 457, 2016.

DE CONTI, Lessandro et al. Growth and chemical changes in the rhizosphere of black oat (*Avena strigosa*) grown in soils contaminated with copper. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 163, p. 19-27, 2018.

DE CONTI, Lessandro et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019.

DE CONTI, Lessandro et al. Soil solution concentrations and chemical species of copper and zinc in a soil with a history of pig slurry application and plant cultivation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 216, p. 374-386, 2016.

DE OLIVEIRA, Vinícius Henrique; DE ANDRADE, Sara Adrián López. Manganese accumulation and tolerance in *Eucalyptus globulus* and *Corymbia citriodora* seedlings under increasing soil Mn availability. **New Forests**, p. 1-15, 2020.

DEMIREVSKA-KEPOVA, Klimentina et al. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n. 3, p. 253-266, 2004.

DRESLER, Sławomir et al. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 6, p. 1565-1575, 2014.

ERDEMIR, Umran Seven et al. Manganese tolerance in *Verbascum olympicum* Boiss. affecting elemental uptake and distribution: changes in nicotinic acid levels under stress conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 29, p. 29129-29143, 2018.

FARIA, Jorge Miguel Silva et al. Toxic levels of manganese in an acidic Cambisol alters antioxidant enzymes activity, element uptake and subcellular distribution in *Triticum aestivum*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 193, p. 110355, 2020.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, R. S.; SANTOS, L. A. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2018.

GIROTTO, Eduardo et al. Biochemical changes in black oat (*Avena strigosa* Schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 199-207, 2016.

GU, Dongfang et al. Metal tolerance protein family members are involved in Mn homeostasis through internal compartmentation and exocytosis in *Brassica napus*. **Environmental and Experimental Botany**, p. 104785, 2022.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas e de vegetação. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acesso em: 01 Abr. 2019.

JUANG, Kai-Wei et al. Effects of copper on root morphology, cations accumulation, and oxidative stress of grapevine seedlings. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 102, n. 6, p. 873-879, 2019.

JUNGLEE, Sanders et al. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 11, p. 730, 2014.

KABATA-PENDIAS, Alina. **Trace elements in soils and plants**. Fourth Edition. CRC press. 2010.

KARAVIN, Neslihan; BATIN, İbrahim. Resorption, mobilization and accumulation of metals in different parts of *Vitis vinifera* L. **Vitis: Journal of Grapevine Research**, v. 59, n. 3, p. 105-109, 2020.

KEDE, Maria Luiza Félix Marques et al. Estudo do comportamento do chumbo em latossolos brasileiros tratados com fosfatos: contribuições para a remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 579-584, 2008.

KOMÁREK, Michael et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environment international**, v. 36, n. 1, p. 138-151, 2010.

KRAMER, Ute. Metal hyperaccumulation in plants. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 517-534, 2010.

- LE BOT, Jacques; KIRKBY, Ernest Arnold; BEUSICHEM, Marinus L. Van. Manganese toxicity in tomato plants: effects on cation uptake and distribution. **Journal of Plant Nutrition**, v. 13, n. 5, p. 513-525, 1990.
- LEGUIZAMO, Mayerly Alexandra Oyuela; GÓMEZ, Wilmar Darío Fernández; SARMIENTO, Martha Cecilia Gutiérrez. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands - a review. **Chemosphere**, v. 168, p. 1230-1247, 2017.
- LIDON, Fernando Cebola; BARREIRO, Maria Graça; RAMALHO, José Cochicho. Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1235-1244, 2004.
- MAGRI, Ederlan et al. Manganese hyperaccumulation capacity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. and occurrence of interveinal chlorosis induced by transient toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 111010, 2020.
- MARQUES, Anderson Cesar Ramos et al. Growth strategies as determinants of CO<sub>2</sub> sequestration and response to nitrogen fertilisation in C4 grasses in South American natural grasslands. **Crop and Pasture Science**, v. 71, n. 8, p. 776-784, 2020.
- MARQUES, Anderson Cesar Ramos et al. The effects of phosphorous fertilization on the mycorrhizal colonization of native forage grasses in the pampa biome. **Revista Brasileira de Tecnologia Agropecuária**, v. 1, p. 58-64, 2017.
- MARSCHNER, Petra. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Third. Academic Press, London. 2012.
- MARTINEZ-FINLEY, Ebany J. et al. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free radical biology and medicine**, v. 62, p. 65-75, 2013.
- MILLALEO, Rayen et al. Excess manganese differentially inhibits photosystem I versus II in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 1, p. 343-354, 2012.
- MILLALEO, Rayen et al. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 4, p. 470-481, 2010.
- MIOTTO, Alcione et al. Copper accumulation and availability in sandy, acid, vineyard soils. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 48, n. 10, p. 1167-1183, 2017.
- MIOTTO, Alcione et al. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, n. 1-2, p. 593-610, 2014.
- NOUET, Cécile; MOTTE, Patrick; HANIKENNE, Marc. Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. **Trends in plant science**, v. 16, n. 7, p. 395-404, 2011.

PEREIRA, Adriana Alves. et al. Effects of iron-ore mining and processing on metal bioavailability in a tropical coastal lagoon. **Journal of Soils and Sediments**, v. 8, n. 4, p. 239-252, 2008.

PITTMAN, Joon K. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 733-742, 2005.

QUADROS, Fernando Luiz Ferreira de; TRINDADE, Jose Pedro Pereira; BORBA, Marcos. A abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. **Campos Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, cap. v. 15, p. 206-213, 2009.

RAHMAN, Anisur et al. Manganese-induced cadmium stress tolerance in rice seedlings: Coordinated action of antioxidant defense, glyoxalase system and nutrient homeostasis. **Comptes rendus biologiques**, v. 339, n. 11-12, p. 462-474, 2016.

SCHMIDT, Sidsel Birkelund; JENSEN, Poul Erik; HUSTED, Søren. Manganese deficiency in plants: the impact on photosystem II. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 7, p. 622-632, 2016.

SERKEDJIEVA, Julia. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**, p. 275-293, 2011.

SHAO, Ji Feng et al. The key to Mn homeostasis in plants: Regulation of Mn transporters. **Trends in plant science**, v. 22, n. 3, p. 215-224, 2017.

SHENG, Huajin et al. Sulfur mediated alleviation of Mn toxicity in polish wheat relates to regulating Mn allocation and improving antioxidant system. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1382, 2016.

SHENG, Huajin et al. Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, mineral nutrients translocation and antioxidative system in polish wheat (*Triticum polonicum* L.). **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 2, p. 32, 2015.

SHI, Qinghua et al. Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1551-1559, 2005.

SRIVASTAVA, Sarita; DUBEY, Rama Shanker. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 64, n. 1, p. 1-16, 2011.

TAKEMOTO, Yuma. et al. The tonoplast-localized transporter MTP8.2 contributes to manganese detoxification in the shoots and roots of *Oryza sativa* L. **Plant Cell Physiology**, v. 58, n. 9, p. 1573-1582, 2017.

TANG, Ting; TAO, Faqing; LI, Weiqi. Characterization of manganese toxicity tolerance in *Arabidopsis paniculata*. **Plant Diversity**, 2020.

TIECHER, Tadeu Luís et al. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 253-263, 2016.

TIECHER, Tadeu Luís et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017.

TRENTIN, Edicarla et al. Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. **Chemosphere**, v. 226, p. 421-430, 2019.

TSUNEMITSU, Yuta et al. A member of cation diffusion facilitator family, MTP11, is required for manganese tolerance and high fertility in rice. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 231-241, 2018.

VISIOLI, Giovanna; MARMIROLI, Nelson. The proteomics of heavy metal hyperaccumulation by plants. **Journal of proteomics**, v. 79, p. 133-145, 2013.

WAN, Xiaoming et al. Intercropped *Pteris vittata* L. and *Morus alba* L. presents a safe utilization mode for arsenic-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1467-1475, 2017.

WAN, Xiaoming; LEI, Mei; CHEN, Tongbin. Cost–benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. **Science of the total environment**, v. 563, p. 796-802, 2016.

WANG, Jun et al. The physiological response of *Mirabilis jalapa* Linn. to lead stress and accumulation. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 128, p. 11-14, 2018.

XIAO, Zehua et al. Effects of exogenous manganese on its plant growth, subcellular distribution, chemical forms, physiological and biochemical traits in *Cleome viscosa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p. 110696, 2020.

XUE, Shengguo et al. Effects of manganese on the microstructures of *Chenopodium ambrosioides* L., a manganese tolerant plant. **International journal of phytoremediation**, v. 18, n. 7, p. 710-719, 2016.

XUE, Shengguo et al. Physiological response of *Polygonum perfoliatum* L. following exposure to elevated manganese concentrations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 1, p. 132-140, 2018.

XUE, Shengguo et al. Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). **Environmental Pollution**, v. 131, n. 3, p. 393-399, 2004.

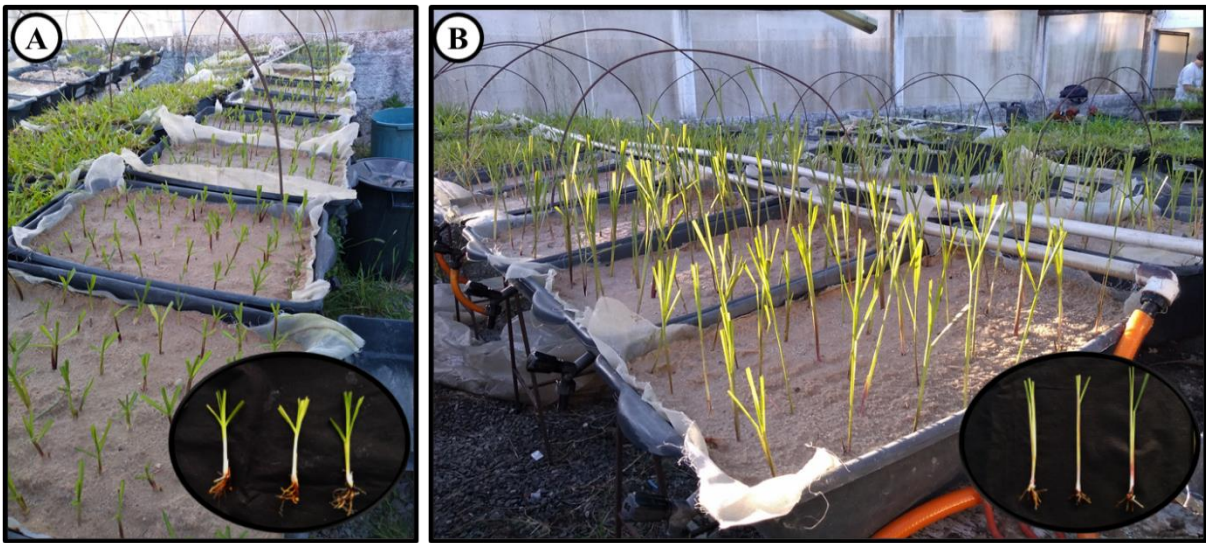
YRUELA, Inmaculada. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009.

ZHAO, Huijun et al. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 13, p. 1243-1252, 2012.

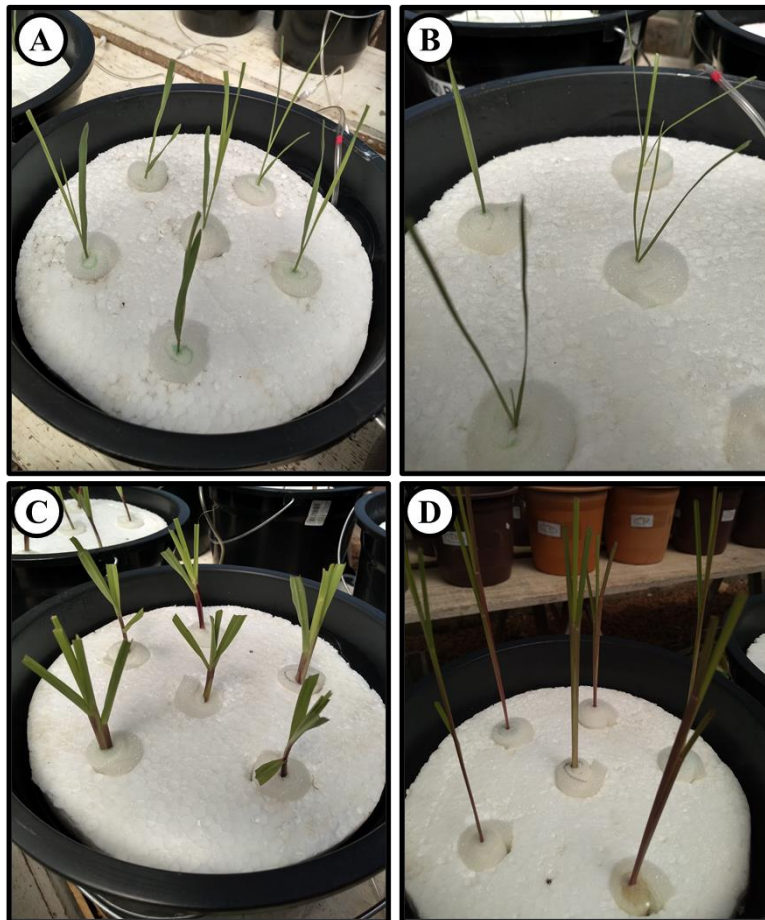
ZHAO, Jingjing et al. Manganese toxicity inhibited root growth by disrupting auxin biosynthesis and transport in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 272, 2017.

ZONG, Haiying et al. Root morphological response of six peanut cultivars to chromium (VI) toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-9, 2020.

## APÊNDICES

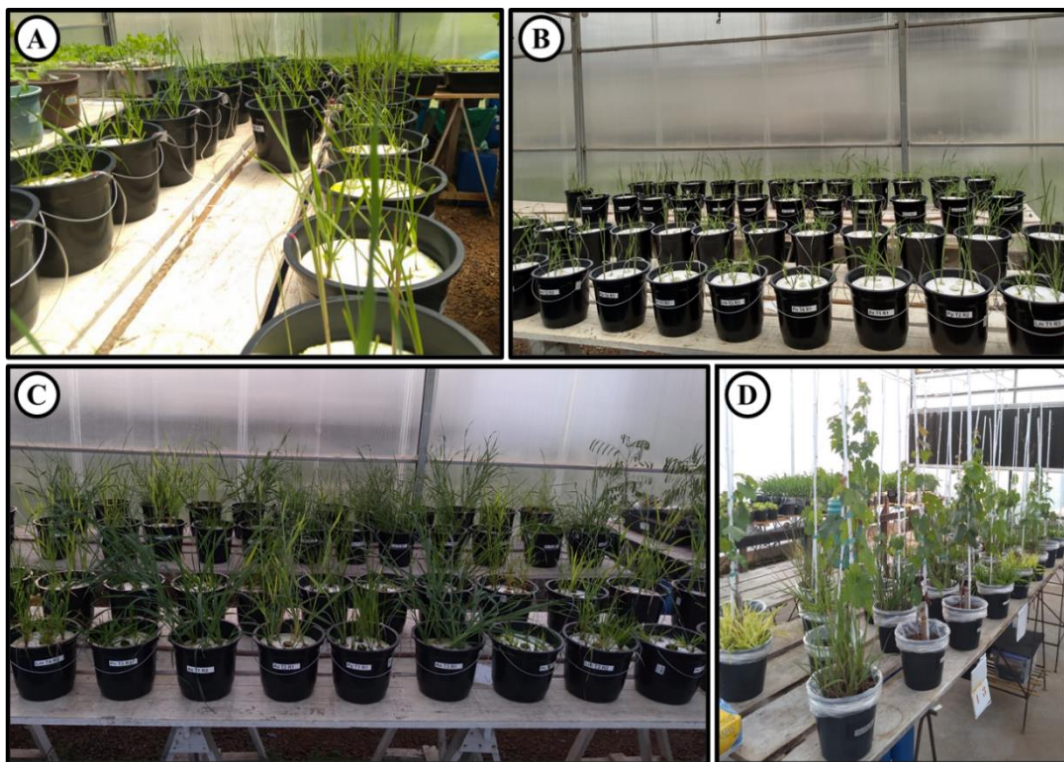


**APÊNDICE A** - Propagação e cultivo das gramíneas nativas do bioma Pampa *Paspalum notatum* (A) e *Paspalum plicatulum* (B) em bandejas com areia para posterior uso nos experimentos.

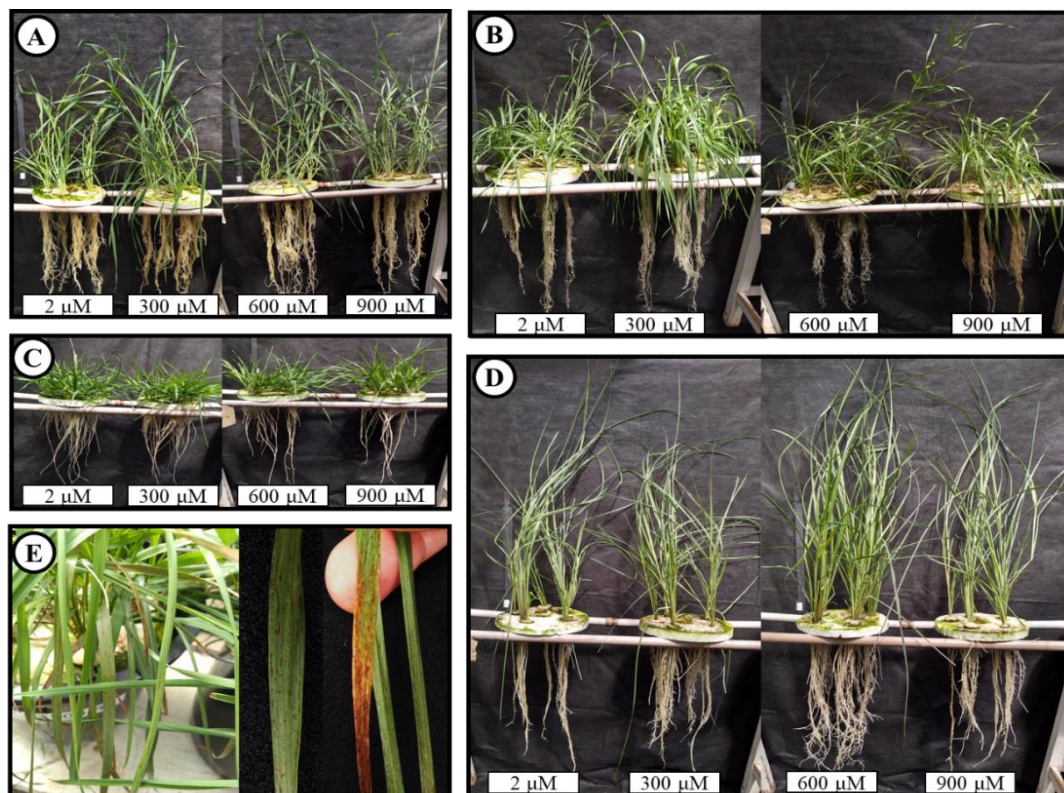


**APÊNDICE B** - Momento após o transplante das gramíneas de cobertura de solo *Avena strigosa* (A), *Lolium multiflorum* (B), *Paspalum notatum* (C) e *Paspalum plicatulum* (D) para aclimação na solução nutritiva.





**APÊNDICE C** - Visão geral do crescimento das espécies no experimento sob excesso de Mn (A), excesso de Cu e Mn (B e C) e consórcio de videiras com gramíneas nativas em solo com excesso de Cu, Mn e Zn (D).



**APÊNDICE D** - Crescimento das gramíneas de cobertura de solo *Avena strigosa* (A), *Lolium multiflorum* (B), *Paspalum notatum* (C) e *Paspalum plicatulum* (D) sob excesso Mn na solução nutritiva e sintomas de toxicidade de Mn em folhas de *Lolium multiflorum* (E) – Artigo 1.





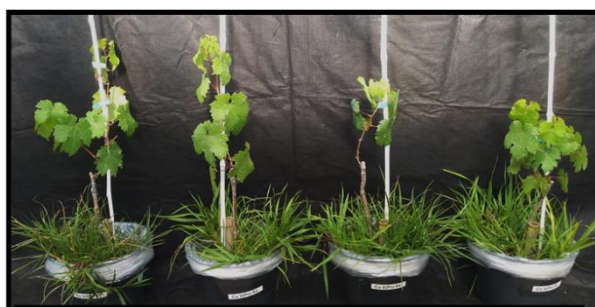
**APÊNDICE E** - Crescimento das gramíneas de cobertura de solo e sintomas de toxicidade nas raízes e folhas de *Avena strigosa* (A), *Lolium multiflorum* (B), *Paspalum notatum* (C) e *Paspalum plicatulum* (D) após 18 dias sob excesso de Cu e Mn na solução nutritiva – Artigo 2.



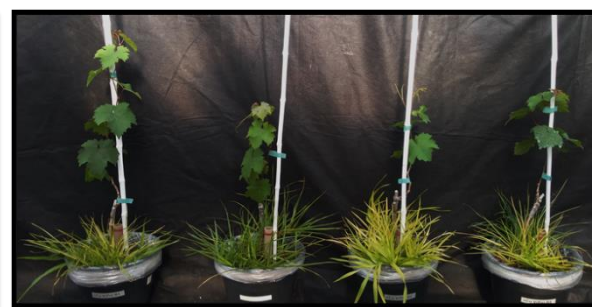
Videira em monocultivo em solo com -Metais.



Videira em monocultivo em solo com +Metais.



Videira + *Paspalum notatum* em solo com -Metais.



Videira + *Paspalum notatum* em solo com +Metais.



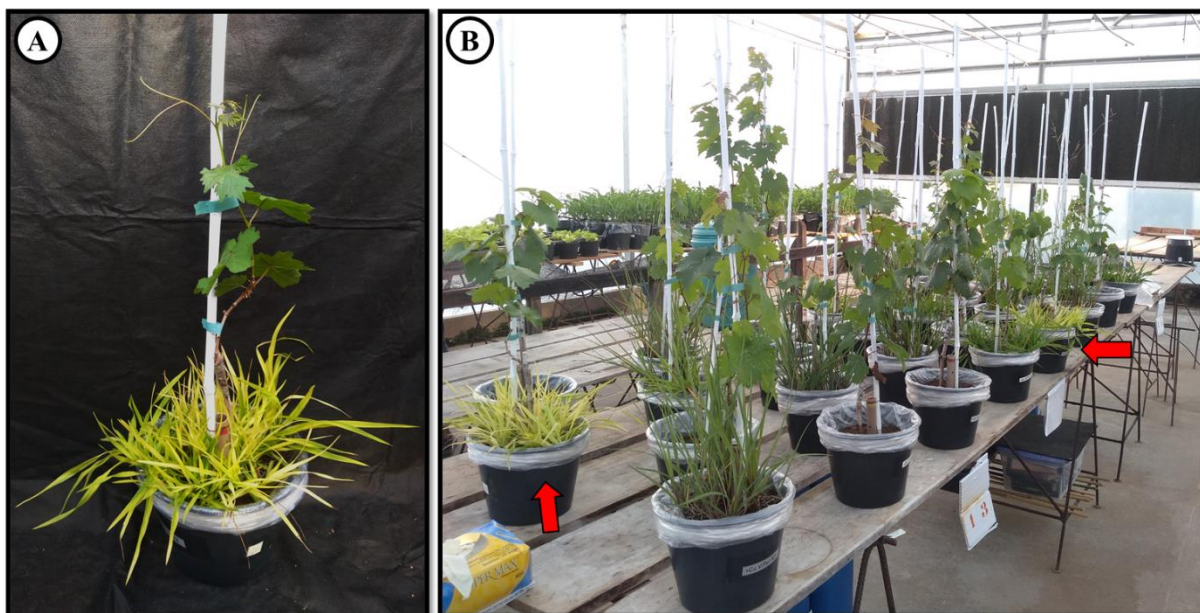
Videira + *Paspalum plicatulum* em solo com -Metais.



Videira + *Paspalum plicatulum* em solo com +Metais.

**APÊNDICE F** - Crescimento das videiras em monocultivo e em consórcios com *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* em dois níveis de metais pesados no solo (-Metais e +Metais) com 75 dias após a poda das plantas (187 dias após o transplante) – Artigo 3.

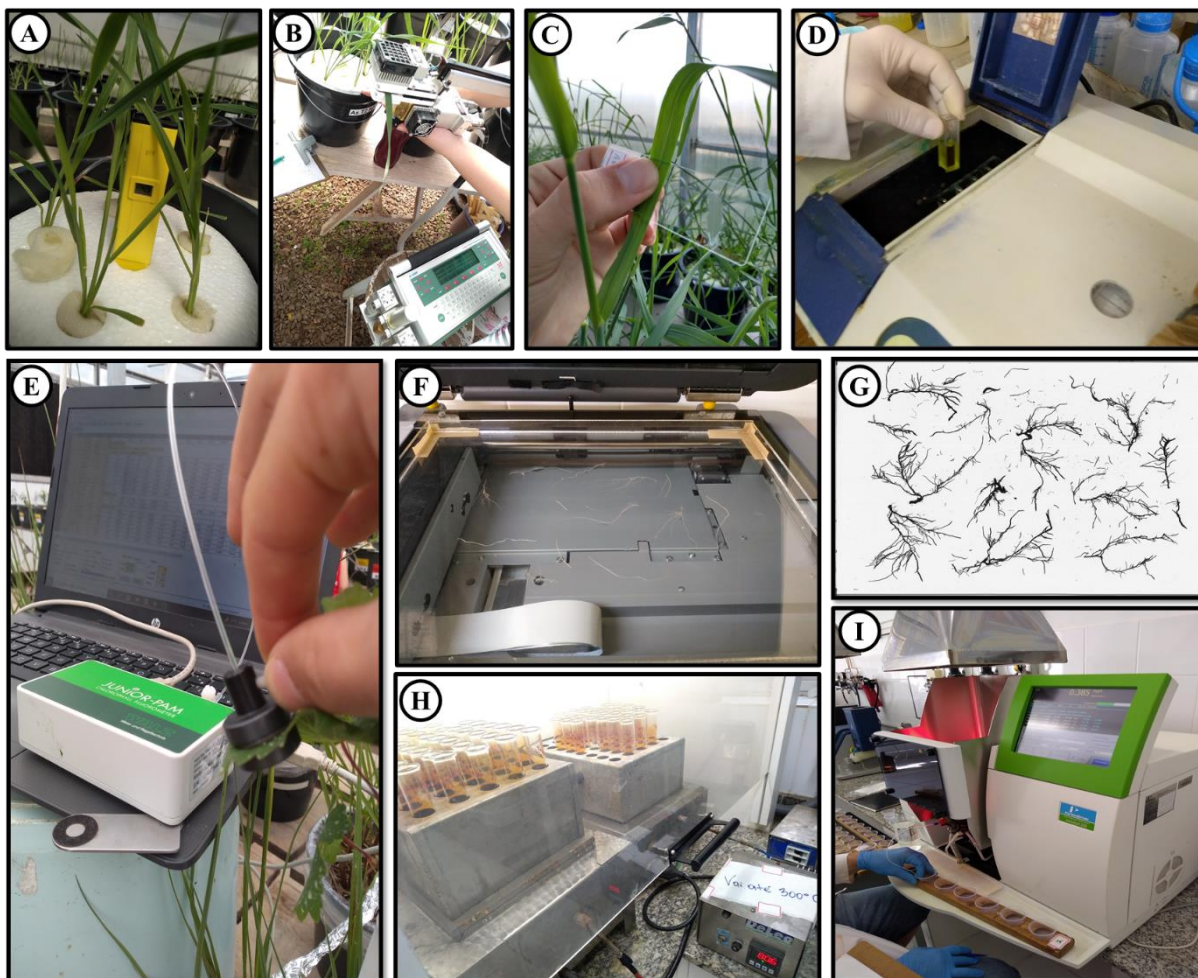




**APÊNDICE G** - Detalhes da clorose foliar observada na espécie de *Paspalum notatum* em solo com +Metais (A) e facilidade da identificação do tratamento no experimento (B).



**APÊNDICE H** - Detalhes do escurecimento das raízes de videiras no cultivo em solo com +Metais.



**APÊNDICE I** - Algumas das avaliações realizadas nos experimentos: pH (A), trocas gasosas (B), impressão de epiderme (C), bioquímicas (D), fluorescência da clorofila *a* (E), biometria do sistema radicular (F e G), digestão nitroperclórica (H) e leitura da concentração de nutrientes nos tecidos das plantas (I).