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

Raíssa Schwalbert

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GENÓTIPOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DE COBRE

Santa Maria, RS
2018

Raíssa Schwalbert

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GENÓTIPOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DE COBRE

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como parte das exigências para a obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS
2018

Schwalbert, Raíssa
Respostas fisiológicas de genótipos de soja (Glycine max (L.) Merrill) em relação aos níveis de cobre / Raíssa Schwalbert.- 2018.
87 p.; 30 cm

Orientador: Fernando Teixeira Nicoloso
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2018

1. Respostas fisiológicas 2. Estresse oxiativo 3. Metal pesado 4. Solos contaminados 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.

©2018 Todos os direitos autorais reservados à Raíssa Schwalbert. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: raissa_schwalbert@hotmail.com

Raíssa Schwalbert

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GENÓTIPOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DE COBRE

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como parte das exigências para a obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Aprovado em 29 de Janeiro de 2018:

Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Gustavo Brunetto (UFSM)

Dr. Henrique Pessoa dos Santos (EMBRAPA)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Rudi e Rosa, ao meu irmão Raí e ao meu namorado Lincon que sempre me apoiaram em minhas escolhas, me incentivaram e estiveram ao meu lado durante toda essa trajetória. E também à todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma, ou que torceram por mim. Essa conquista é de todos nós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela oportunidade de viver e aprender constantemente, por todas as graças alcançadas e também por cada dificuldade que me tornou mais forte, só assim pude conhecer o gosto que tem uma conquista.

À minha família, em especial aos meus pais, Rudi e Rosa, que são meus alicerces e inspiração como ser humano, e ao meu irmão Raí, por todo o apoio e ajuda que dedicou a mim ao longo desse período. Obrigada por me apoiarem quando nem tudo foi como esperava, por vibrarem comigo a cada vitória e por torcerem por mim sempre.

Ao meu companheiro de vida, colega de profissão, amigo e amor, Lincon, por todo auxílio emocional, intelectual e braçal! Obrigada por ser minha luz e por abdicar de muitas coisas comigo para podermos chegar aonde queremos!

Aos meus pequenos Cecília e Augusto, por tornarem a caminhada mais leve!

Aos meus amigos e colegas, pela compreensão, descontração e amizade. Muitas vezes vocês foram minha família.

Aos meus amigos e colegas do laboratório FisioPlant, desde o período de iniciação científica, que me acolheram muito bem, e aos que hoje, na Pós Graduação, me ajudaram muito em cada etapa desse processo. Essa conquista não seria a mesma sem a ajuda de vocês. Obrigada, Anderson, Bianca, Camila Costa, Camila Tarouco, Darlene, Gíllian, Júlia, Letícia, Liliani, Márcio, Melissa, Miriam, Ruziele e demais colegas.

Ao professor Fernando, por ter me ensinado, compartilhado comigo seu conhecimento e por ter me conduzido por esse caminho que me trouxe até aqui.

Ao professor Gustavo Brunetto, por nos ajudar na elaboração e condução do trabalho, e por estar sempre disponível para ajudar.

À banca examinadora pela disponibilidade em ler e contribuir com o trabalho.

À UFSM pela estrutura, e por ter aberto as portas para mim à 7 anos.

À CAPES pelo incentivo financeiro que tornou o trabalho possível.

Enfim, à todos que de uma forma ou de outra auxiliaram nesse processo e na elaboração da dissertação!

Muito obrigada!

Fazer o que você gosta é liberdade.
Gostar do que você faz é felicidade.

RESUMO

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GENÓTIPOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DE COBRE

AUTORA: Raíssa Schwalbert
ORIENTADOR: Fernando Teixeira Nicoloso

O uso prolongado de fungicidas com cobre (Cu) em sua composição, utilizados para o controle de doenças fúngicas em videiras, vem ocasionando o acúmulo de Cu no solo. Isso é observado em vinhedos de vários países, inclusive no Brasil, nos vinhedos da Campanha Gaúcha. O revolvimento do solo potencializa a oxidação da matéria orgânica e aumenta a disponibilidade de Cu, que em excesso é tóxico às plantas jovens de videira transplantadas em solos de vinhedos erradicados. Dessa forma, o uso de culturas anuais, como a soja, depois da erradicação dos vinhedos, pode fitoextrair ou fitoestabilizar o Cu no solo diminuindo o seu potencial toxidez. Além disso, a soja pode fixar N_2 atmosférico, incrementando a disponibilidade de N no solo, o que é importante em solos com baixo teor de matéria orgânica. Para isso, se faz necessário estudar as respostas fisiológicas da cultura quando exposta ao excesso de Cu, bem como avaliar quais as cultivares são mais adaptadas para essa condição. O objetivo do estudo foi avaliar respostas fisiológicas de diferentes genótipos de soja e a influência do revolvimento do solo sobre a fitotoxicidade do Cu às plantas. Para isso, dois estudos foram realizados. O estudo 1 foi conduzido em sistema hidropônico sendo os tratamentos compostos por concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM de Cu) e cultivares de soja (NA 5909 RG, DM 5958 RSF IPRO, M 6410 IPRO e DM 6563 RSF IPRO). Após 21 dias de cultivo, foram avaliadas as trocas gasosas da folha, a atividade das enzimas SOD e as concentrações de H_2O_2 e de TBARS, a massa seca de raízes e de parte aérea e a concentração de Cu nos tecidos. O estudo 2 foi conduzido em canos de PVC contendo solo de vinhedo e solo de campo natural. O solo foi coletado com estrutura indeformada e deformada. O solo proveniente de campo natural foi corrigido e adubado. Sementes de cultivares de soja (DM 5958 RSF IPRO e M 6410 IPRO) foram inoculadas e semeadas nas colunas de solo. Foram realizadas as mesmas avaliações do estudo 1 acrescido da atividade da POD. As plantas cultivadas em concentrações mais elevadas de Cu em ambos os estudos apresentaram menor produção de massa seca e taxa fotossintética, e maior concentração de Cu nos tecidos. No estudo 1, a cultivar M 6410 IPRO foi a menos sensível ao excesso de Cu. Essa cultivar manteve a mais alta taxa fotossintética quando exposta a maior concentração de Cu, e acumulou grandes concentrações de Cu nas raízes sem reduzir a produção de massa seca radicular, possivelmente devido à maior atividade das enzimas SOD. Por outro lado, a cultivar DM 5958 RSF IPRO reduziu drasticamente sua taxa fotossintética e sua produção de massa seca em excesso de Cu. No estudo 2, para a estrutura de solo indeformada, o solo de vinhedo foi mais prejudicial sobre a fisiologia das plantas do que o solo de campo natural. O revolvimento do solo mostrou-se prejudicial às plantas em comparação ao solo com estrutura indeformada, mas essa resposta ocorreu em solos de ambas origens (vinhedo e campo natural), mostrando que o efeito negativo do revolvimento não está relacionado somente ao aumento da disponibilidade de Cu no solo.

Palavras-chave: Metal Pesado. Fotossíntese. Sistema Antioxidante. Produção De Massa Seca. Sistema De Manejo Do Solo.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF SOYBEAN GENOTYPES (*Glycine max* (L.) Merrill) IN RELATION TO COPPER LEVELS

AUTHOR: Raíssa Schwalbert
ADVISOR: Fernando Teixeira Nicoloso

Prolonged use of copper-based fungicides, that are used to control fungal diseases in vines, has led to the accumulation of Cu in the soil. This accumulation of Cu is observed in vineyards of several countries, including Brazil, such as the Campanha Gaúcha region vineyards. Soil mobilization increases organic matter oxidation and it increases copper availability, which in excess is toxic to young vine plants transplanted into soils of eradicated vineyards. Thus, after vineyard eradication, the using of annual crops, such as soybean, can phytoextract or phytostabilize Cu in the soil, reducing its toxicity to plants. In addition, soybean can fix atmospheric N_2, increasing the N availability in soil, which is important in soils with low organic matter content. However, it is necessary to study soybean physiological responses to high Cu concentrations, and which soybean cultivars would be better adapted to this condition. The objective of the study was to evaluate the physiological responses of different soybean genotypes and the influence of soil mobilization on Cu phytotoxicity to the plants. Two studies were performed. Study 1 was conducted in hydroponic system and the treatments were composed of Cu concentrations (0.5, 20 and 40 μM Cu) and soybean cultivars (NA 5909 RG, DM 5958 RSF IPRO, M 6410 IPRO and DM 6563 RSF IPRO). 21 days after cultivation, leaf gas exchange was measured, SOD activity and H_2O_2 and TBARS concentrations in plants were evaluated. Dry matter of roots and dry matter of shoots, and Cu concentration in the tissues were obtained. Study 2 was performed in PVC tubes containing vineyard soil and natural field soil. Soil was collected with undisturbed and disturbed structure. Natural field soil was submitted to liming and fertilization. Seeds of soybean cultivars (DM 5958 RSF IPRO and M 6410 IPRO) were inoculated and sown in soil tubes. The same evaluations of study 1 plus the POD activity were performed. In both studies, plants grown at higher concentrations of Cu had lower dry mass production and lower photosynthetic rates, and they had higher Cu concentrations in tissues. In study 1, cultivar M 6410 IPRO was the least sensitive cultivar to Cu excess. This cultivar maintained the highest photosynthetic rate when exposed to higher Cu concentrations, and accumulated large concentrations of Cu in roots without reducing root dry mass production. It possibly have happened due to the higher SOD activity. On the other hand, the cultivar DM 5958 RSF IPRO drastically reduced its photosynthetic rate and its dry mass production in Cu excess. In study 2, for undisturbed soil structure, vineyard soil was more harmful to plant physiology than natural field soil. However, this response occurred in both soil types (vineyard and natural field), showing that the negative effect of tillage is not only related to the increase of soil availability Cu.

Keywords: Heavy Metal. Photosynthesis. Antioxidant System. Dry Matter Production. Soil Management System.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MANUSCRITO I

Figura 1 - Concentração de Cu na parte aérea (PA) e raízes (R) das cultivares de soja 5909, 5958, 6410 e 6563 cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu e parte da planta. Letras minúsculas indicam comparação entre concentrações de Cu para uma mesma cultivar e parte da planta (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....43

Figura 2 - Taxa de assimilação líquida de CO_2 (a), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (b), concentação interna de CO_2 (c), taxa de transpiração (d), condutância estomática (e) e eficiência do uso da água (f) em cultivares de soja (5909, 5958, 6410 e 6563) cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu. Letras minúsculas indicam comparação entre concentrações de Cu para uma mesma cultivar (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....45

Figura 3 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (a), concentração de peróxido de hidrogênio (b) e concentração de malondialdeído (c), em cultivares de soja (5909, 5958, 6410 e 6563), cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu e parte da planta. Letras minúsculas indicam comparação entre concentrações para uma mesma cultivar e parte da planta (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....48

Figura 4 - Relação entre o componente principal 1 (CP 1) e o componente principal 2 (CP 2) dos parâmetros fotossintéticos (A, A/C_i, E, EUA, G_s e C_i), concentração de clorofilas a, b, total e de carotenoides, massa seca (MSPA e MSR) concentração de Cu nas raízes e parte aérea (Cu R e Cu PA), atividade das enzimas superóxido dismutase nas raízes e parte aérea (SOD R e SOD PA), concentração de peróxido de hidrogênio nas raízes e parte aérea (H_2O_2 R e H_2O_2 PA) e peroxidação lipídica nas raízes e parte aérea (Tbars R e Tbars PA), de cultivares de soja 5909, 5958, 6410 e 6563 para as três concentrações de Cu na solução nutritiva (0,5; 20 e 40 µM de Cu).....49

MANUSCRITO I I

Figura 1 - Relação entre o componente principal 1 (CP 1) e o componente principal 2 (CP 2) dos parâmetros fotossintéticos (A, A/C_i, E, EUA, G_s e C_i), pigmentos fotossintéticos (clorofilas a, b, total e carotenoides), massa seca da parte aérea e raízes (MSPA e MSR), concentração de Cu nas folhas, atividade das enzimas antioxidantes (SOD e POD), concentração de H_2O_2 e peroxidação lipídica (TBARS) (a) para cultivares de soja (DM 5958 RSF IPRO e M 6410 IPRO) (b), origem do solo (campo natural e vinhedo) (c) e estrutura de solo (deformada e indeformada) (d).....75

Figura 2 - Taxa de assimilação líquida de CO_2 (a), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (b), concentação interna de CO_2 (c), taxa de transpiração (d) e eficiência do uso da água (e) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo. (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....76

Figura 3 - Concentrações de clorofila total (a, b), clorofila a (c), carotenoides (d), e clorofila b (e) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo. (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....77

Figura 4 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (a, b), atividade da guaiacol peroxidase (c), concentração de H_2O_2 (d) e peroxidação lipídica (e) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo. (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....78

Figura 5 - Concentração de Cu nas folhas de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo. (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....78

Figura 6 - Massa seca de parte aérea (a) e massa seca de raízes (b) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI) com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo. (P<0,05). As barras de erro representam ± desvio padrão.....79

Figura suplementar - Análise de componentes da variância para cultivar, estrutura do solo, origem do solo e a interação com resíduos da variância total para concentração de Cu nas folhas (Cu), clorofila a (CLA), clorofila b (CLB), clorofila total (CLT), carotenoides (Car), taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) condutância estomática de vapores de água (Gs), concentração intercelular de CO_2 (C_i), taxa transpiratória (E), eficiência de uso da água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/C_i), peroxidação lipídica (Tbars), atividades de SOD e POD e concentração de H_2O_2.....79

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Tabela 1 - Massa seca de raízes e relação da massa seca de raízes/massa seca da parte aérea das cultivares de soja 5909, 5958, 6410 e 6563 cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) em solução nutritiva.....42

Tabela 2 - Concentração de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides em cultivares de soja (5909, 5958, 6410 e 6563) cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) em solução nutritiva.....46

Tabela suplementar - Massa seca de parte aérea de duas plantas de soja cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) em solução nutritiva.....57

MANUSCRITO II

Tabela suplementar – Características físicas e químicas da camada de 0-0,20 m de um solo Argissolo Vermelho cultivado por 35 anos com videiras e um solo de campo natural adjacente ao vinhedo.....80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5909 – Cultivar de soja NA 5909 RG
5958 – Cultivar de soja DM 5958 RSF IPRO
6410 – Cultivar de soja M6410 IPRO
6563 – Cultivar de soja DM 6563 RSF IPRO
A – Taxa de assimilação líquida de CO_2
A/C_i – Eficiência instantânea de carboxilação da rubisco
ACP – Análise de componentes principais
AIC – Critério de informação de Akaike
Al – Alumínio
B – Boro
BIC – Critério de informação Bayesiano
BOD – Box Organism Development
C – Carbono
Ca – Cálcio
$CaCO_3$ – Carbonato de cálcio
Cfa – Clima subtropical úmido
C_i – Concentração intercelular de CO_2
Cl – Cloro
$cmol_c$ – Centimol de carga
CP – Componente principal
CQFS – Comissão de Química e Fertilidade do Solo
CTC – Capacidade de troca de cátions
CO_2 – Dióxido de carbono
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
Cu – Cobre
DM – Donmário
dm^3 – Decímetro cúbico
DMSO – Dimetilsulfóxido
E – Taxa transpiratória
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
Embrapa – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
ERO – Espécie reativa de oxigênio
EUA – Eficiência de uso da água
Fe – Ferro
g – Grama
g – Força centrífuga relativa
G_s – Condutância estomática de vapores de água
H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
ha – Hectare
IPRO – Tecnologia intacta
K – Potássio
kg – Quilograma
L – Litro
M – Monsoy
m^2 – Metro quadrado
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA – Malondialdeído
Mg – Magnésio
mg – Miligrama
$MgCO_3$ – Carbonato de magnésio

min – Minuto
mL – Mililitro
Mn – Manganês
Mo – Molibdênio
MOS – Matéria orgânica do solo
MSPA – Massa seca de parte aérea
MSR – Massa seca de raízes
NA – Nidera
NBT - Nitroblue- tetrazolium
N – Nitrogênio
N_2 – Nitrogênio atmosférico
NH_3 – Amoníaco
Ni – Níquel
nm – Nanômetro
O_2 – Oxigênio molecular
$O_2^{\bullet-}$ – Ânion superóxido
$OH^{\bullet}$ – Radical hidroxil
$^1O_2$ – Oxigênio singleto
pH – Potencial hidrogeniônico
P – Fósforo
PA – Parte aérea
PF – Peso fresco
POD – Guaiacol peroxidase
PVC – Policloreto de vinila
R – Raiz
RG – Resistente ao glifosato
RNC – Registro Nacional de Cultivares
RSF – Rendimento sem fronteiras
Rubisco – Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase
S – Enxofre
S – South
s – Segundo
SFT – Superfosfato triplo
SOD – Superóxido dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TFK – Tampão fosfato citrato
UFSM – Universidade Federal de Santa Maria
W – West
Zn - Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

µM – Micromolar
µmol – Micromol
% - Porcentagem
° - Graus
°C – Escala de grau Celsius
’ – Minutos
” – Segundos
p/v – Relação peso/volume

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 – Cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (6563, 5909, 6410 e 5958) após 15 dias de cultivo em sistema hidropônico contendo Cu na solução nutritiva. Concentração de 0,5 µM de Cu (esquerda), 20 µM de Cu (centro), e 40 µM de Cu (direita).....84

Apêndice 2 – Plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) após 21 dias de cultivo em sistema hidropônico contendo Cu na solução nutritiva. Concentração de 0,5 µM de Cu (esquerda), 20 µM de Cu (centro), e 40 µM de Cu (direita).....84

Apêndice 3 – Plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em estágio R2 cultivadas em canos de PVC contendo solo de vinhedo e de campo natural com estrutura de solo deformada e indeformada.....85

Apêndice 4 – Determinação das trocas gasosas da folha em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em estágio R2 cultivadas em canos de PVC contendo solo de vinhedo e de campo natural com estrutura de solo deformada e indeformada.....85

Apêndice 5 – Cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) 6410 (a, b) e 5958 (c, d) em estágio R2 cultivadas em canos de PVC contendo solo de vinhedo (VI) e de campo natural (CN) com estrutura de solo e indeformada (I) (a, c) e deformada (D) (b, d).....86

Apêndice 6 – Crescimento radicular da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivada em colunas de solo de campo natural com estrutura indeformada.....87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 17
1.1 HIPÓTESES 18
1.2 OBJETIVOS 20
1.2.1 Objetivo geral 20
1.2.2 Objetivos Específicos 20
2 REFERENCIAL TEÓRICO 21
2.1 DINÂMICA DO COBRE NO SOLO 21
2.2 EXCESSO DE COBRE EM SOLOS DE VINHEDO 21
2.3 MANEJO DO SOLO SOBRE A DISPONIBILIDADE DO COBRE E A MICROBIOTA DO SOLO 23
2.4 COBRE NA FISIOLOGIA DAS PLANTAS 24
2.5 EXPANSÃO DO CULTIVO DA SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL) 26
REFERÊNCIAS 28
3 MANUSCRITO I 35
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL) SUBEMTIDAS AO EXCESSO DE COBRE 35
RESUMO 35
ABSTRACT 35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 37
3.2.1 Descrição do experimento 37
3.2.2 Produção de massa seca e concentração de Cu no tecido 38
3.2.3 Trocas gasosas da folha 38
3.2.4 Pigmentos fotossintéticos 39
3.2.5 Atividade das enzimas SOD 39
3.2.6 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 40
3.2.7 Peroxidação lipídica 40
3.2.8 Análise estatística 41
3.3 RESULTADOS 41
3.3.1 Produção de massa seca e concentração de Cu 41
3.3.2 Trocas gasosas da folha 43
3.3.3 Pigmentos fotossintéticos 46
3.3.4 Parâmetros bioquímicos 46
3.3.5 Análise de componentes principais 48
3.4 DISCUSSÃO 49
3.5 CONCLUSÕES 52
REFERÊNCIAS 53
4 MANUSCRITO II 58
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL) CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR CU COM ESTRUTURA INDEFORMADA E DEFORMADA 58

RESUMO 58
ABSTRACT 58
4.1 INTRODUÇÃO 59
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 60
4.2.1 Coleta de solo 60
4.2.2 Descrição do experimento 62
4.2.3 Avaliações 62
4.2.3.1 Trocas gasosas da folha 62
4.2.3.2 Concentração de clorofilas e carotenoides 63
4.2.3.3 Atividade das enzimas SOD e POD 63
4.2.3.4 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 64
4.2.3.5 Peroxidação lipídica 64
4.2.3.6 Concentração de Cu e produção de massa seca 64
4.2.4 Análise estatística 65
4.3 RESULTADOS 66
4.3.1 Análise de componentes da variância e ACP 66
4.3.2 Trocas gasosas da folha 66
4.3.3 Pigmentos fotossintéticos 67
4.3.4 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) 67
4.3.5 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 68
4.3.6 Peroxidação lipídica 68
4.3.7 Concentração de Cu e produção de massa seca 68
4.4 DISCUSSÃO 68
4.5 CONCLUSÕES 71
REFERÊNCIAS 72
5 DISCUSSÃO GERAL 81
REFERÊNCIAS 83
6 APÊNDICES 84

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Rio Grande do Sul (RS) é o maior estado vitivinícola do Brasil. Neste cenário, a maior e mais tradicional região produtora é a Serra Gaúcha. Porém, nas últimas décadas, a atividade tem se expandindo para outras regiões dentro do estado, principalmente para a região da Campanha Gaúcha, a qual concentra parte da produção de uvas destinadas a elaboração de vinhos finos e espumantes. Na Campanha Gaúcha, o cultivo de videiras teve início na década de 1970, em áreas anteriormente destinadas à pecuária de corte. A expansão do cultivo da videira, se deve em grande parte ao clima da região, o qual é mais favorável ao crescimento e desenvolvimento da cultura em relação à região da Serra Gaúcha. Entretanto, as precipitações pluviométricas ainda podem ser consideradas elevadas para a videira, o que favorece a incidência de doenças fúngicas, como o míldio (*Plasmopara viticola*). Por isso, torna-se necessário a aplicação de produtos fitossanitários para o controle dessas doenças. Entre os principais fungicidas utilizados no controle das doenças, está a calda bordalesa ($Ca(OH)_2 + CuSO_4$), que além de alta eficiência no controle, apresenta baixo custo. Contudo, em sua composição, este fungicida apresenta alta quantidade de cobre (Cu), que somado às frequentes aplicações durante o ciclo produtivo, pode adicionar anualmente até 30 kg ha^{-1} de Cu no solo, o que potencializa o risco de contaminação de águas superficiais e pode atingir teores tóxicos às plantas, como já acontece em vários países do mundo com tradição na produção de uvas.

Apesar do Cu ser um elemento essencial às plantas, quando presente em elevadas concentrações no meio, pode acumular-se nos tecidos vegetais e causar respostas negativas em nível fisiológico e bioquímico, o que pode levar à inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas. Um dos principais processos afetados pela ação tóxica do Cu é a fotossíntese, onde o metal pode inibir a transferência de elétrons na cadeia transportadora, a síntese de pigmentos e a atividade de enzimas do ciclo de Calvin. Devido à sua capacidade redox, o Cu pode catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) formado através da reação de Fenton. Caso o sistema antioxidante da planta não seja capaz de detoxificar o excesso de EROs, estas podem reagir com constituintes celulares e causar estresse oxidativo.

Os solos arenosos, como os da região da Campanha Gaúcha, apresentam baixo teor de matéria orgânica (MOS) e de óxidos, hidróxidos e óxi-hidróxidos de Fe e Al, que constituem os principais sítios de adsorção do Cu no solo. Dessa forma, expressiva quantidade de Cu está presente em formas trocáveis e solúveis, devido à baixa capacidade de adsorção destes solos,

o que aumenta o risco de fitotoxicidade. Associado à isso, o revolvimento do solo no momento do replantio do vinhedo pode potencializar a oxidação da MOS e aumentar a disponibilidade do Cu. Plantas de videiras jovens cultivadas nesses solos com altos teores de Cu, apresentaram sintomas de toxidez como redução no crescimento e no acúmulo de macronutrientes, alterações morfológicas em raízes, redução da absorção de nutrientes e do crescimento da parte aérea.

A redução ou suspensão das aplicações de fungicidas que contém Cu em sua composição caracteriza-se como medida inicial para remediação dos solos contaminados. Entretanto, é necessário desenvolver estratégias de remediação, que reduzam a biodisponibilidade do metal presente no solo, mantendo os solos férteis e produtivos, além de reduzir o risco de contaminação ambiental pela transferência do elemento a outros ambientes. O cultivo de plantas anuais no momento da erradicação de um vinhedo antigo promove benefícios através da rotação de culturas, contribuindo para a melhoria do ecossistema. Isso além de reduzir a incidência de doenças, promoveria um aporte de material vegetal à superfície do solo, o que potencialmente auxiliaria na fitoimobilização e fitoextração do Cu, diminuindo a sua toxidez às plantas. Além disso, a inclusão de plantas que fixam simbioticamente o N_2, contribui para aumentar o conteúdo de nitrogênio do solo, uma contribuição importante em solos com baixo teor de matéria orgânica. A soja é uma leguminosa fixadora de N_2 e atualmente é considerada a oleaginosa de grãos com maior importância econômica no cenário agrícola mundial. Dessa forma, sua utilização pode ser uma alternativa interessante na fitoestabilização e fitoextração de metais pesados em solos contaminados, além de proporcionar uma fonte de renda.

Para isso, estudar as respostas fisiológicas que as plantas de soja podem apresentar frente à estresses abióticos, como em solos contaminados, pode ajudar a desvendar as estratégias empregadas na absorção, acumulação e tolerância aos metais pesados. Da mesma forma, é necessário estudar quais cultivares de soja por apresentam maior tolerância ao Cu, e assim, poderiam ser cultivadas em ambientes contaminados.

1.1 HIPÓTESES

1- Concentrações elevadas de Cu no meio aumentam a concentração de Cu nas plantas causando diminuição da fotossíntese e crescimento e alterações bioquímicas, mas cultivares com ciclos de crescimento maiores apresentam maior tolerância.

2- O revolvimento do solo aumenta a disponibilidade de Cu em solos arenosos e com baixo teor de matéria orgânica, o que prejudica o crescimento das plantas em solos de vinhedos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar respostas fisiológicas de diferentes genótipos de soja e a influência do revolvimento do solo sobre a fitotoxicidade do Cu às plantas.

1.2.2 Objetivos Específicos

1- Avaliar os parâmetros fotossintéticos, bioquímicos, produção de massa e concentração de Cu em cultivares de soja cultivadas em excesso de Cu no meio, visando a seleção de cultivares mais tolerantes.
2- Avaliar o efeito do revolvimento do solo contaminado por Cu sobre biomassa, concentração de Cu nas folhas, parâmetros fotossintéticos e bioquímicos de estresse oxidativo em soja.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DINÂMICA DO COBRE NO SOLO

O cobre (Cu) é considerado um metal pesado porque é um elemento químico metálico com densidade atômica maior do que 6 g dm^{-3} e número atômico maior que 20 (McBRIDE, 1994), podendo ser tóxico aos seres vivos quando presente em concentrações elevadas. A disponibilidade de Cu no solo varia naturalmente de acordo com a composição do material de origem e com os processos de formação do solo (ABREU et al., 2012). O Cu é um dos metais pesados menos móveis no solo devido à sua forte adsorção em colóides orgânicos e inorgânicos (BRADL, 2004; CROUÉ et al., 2003).

A maior parte do Cu que é adicionado no solo permanece nas camadas superficiais, sobretudo complexado na matéria orgânica do solo (MOS) (BRUN et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2005). Nessa fração, o Cu é retido principalmente pelos ácidos húmicos e fúlvicos, formando complexos estáveis (SILVA; SÁ MENDONÇA, 2007), com elevada energia de ligação, o que pode resultar na formação de complexos de esfera interna (SPARKS, 1995). O Cu apresenta alta afinidade de ligação aos grupos funcionais da MOS, incluindo grupos contendo S e N, bem como grupos carboxílicos e fenólicos (CROUÉ et al., 2003) que conferem alta energia de ligação e baixa reversibilidade (CASALI et al., 2008).

Na fração inorgânica do solo, os principais componentes que influenciam as reações de adsorção dos metais, como o Cu são os óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de Fe e Al, e os grupos funcionais nas periferias dos argilominerais (BRADL, 2004). Além da quantidade e qualidade da MOS, e de argilominerais no solo, outro fator que também exerce uma forte influência na dinâmica do Cu no solo é o pH (CHAIGNON; HINSINGER, 2003). Em geral, em solos ácidos, os metais apresentam maior mobilidade, enquanto que condições de pH acima de 6,0 favorecem a sua retenção, principalmente em solos altamente intemperizados (SODRÉ; LENZI; COSTA, 2001).

2.2 EXCESSO DE COBRE EM SOLOS DE VINHEDO

A contaminação do solo com Cu resulta principalmente de atividades humanas, como a fundição, mineração e utilização excessiva de produtos fitossanitários que contêm Cu em suas formulações em práticas agrícolas (BRUN; LE CORFF; MAILLET, 2003; EPSTEIN; BASSEIN, 2001). Dessa forma, a viticultura destaca-se pelo uso desses produtos com Cu em

sua composição, para o controle preventivo de doenças fúngicas em videiras, como o míldio, causado pelo fungo *Plasmopara viticola* (MACKIE; MUELLER; KANDELER, 2012). Entre os principais fungicidas utilizados no controle das doenças, está a calda bordalesa ($Ca(OH)_2$ + $CuSO_4$), que consiste em uma suspensão coloidal obtida pela mistura de sulfato de Cu, hidróxido de Ca e água. Além de alta eficiência no controle, a calda bordalesa apresenta baixo custo, e por essa razão, ao longo do ciclo da cultura realizam-se frequentes aplicações desse fungicida, o que tem ocasionado o acúmulo de Cu em solos de vinhedos (BRUNETTO et al., 2014). Estima-se que 8 à 30 kg de Cu ha^{-1} ano^{-1} sejam aplicados via fungicidas em vinhedos do Sul do Brasil (BRUNETTO et al., 2014; CASALI et al., 2008). Parte do Cu aplicado via fungicidas é depositado na superfície adaxial das folhas, sendo lavado pela precipitação pluviométrica e depositado sobre a superfície do solo. Além disso, folhas senescentes contendo Cu na sua superfície também são fonte de adição de Cu à superfície do solo (NACHTIGALL; NOGUEIROL; ALLEONI, 2007). Na Europa, a utilização repetitiva de fungicidas cúpricos desde o final do século 19, tem sido responsável pelo grande aumento do teor total de Cu nas camadas superficiais dos solos de vinhedos (FERNÁNDEZ-CALVIÑO et al., 2008; MICHAUD et al., 2007; TOSELLI et al., 2009).

No Brasil, o Rio Grande do Sul é o principal estado vitivinícola, onde a mais de três décadas a região da Campanha Gaúcha vem destacando-se como uma importante produtora de uvas viníferas (GIROTTO et al., 2016). Nessa região, o início do cultivo de videiras ocorreu em áreas anteriormente ocupadas com campo natural, destinadas à pecuária de corte, que a partir da década de 1970 foram convertidas à vinhedos (PROTAS; CAMARGO, 2011). Atualmente, essa região concentra grande parte da produção de uvas destinadas à elaboração de vinhos finos e espumantes (FLORES; MEDEIROS, 2013). A região da Campanha Gaúcha oferece boas condições edafoclimáticas para o cultivo da videira, entretanto, as precipitações pluviométricas ainda podem ser consideradas elevadas para a cultura, o que requer um número alto de aplicações de fungicidas. Dentre os fungicidas, utiliza-se principalmente os cúpricos, cujo uso repetido vem resultando no acúmulo de Cu nos solos (CAMBROLLÉ et al., 2015; GIROTTO et al., 2014; MIOTTO et al., 2014; SANTANA et al., 2015).

Os solos de vinhedo utilizados nesse estudo apresentaram teores de Cu disponível acima de 60 mg dm^{-3} (extraído por Mehlich-1). No entanto, o conteúdo de Cu em solos de vinhedos pode ter ampla variação nos países produtores de uvas no mundo, devido principalmente à diferenças físico-químicas entre os solos e às condições climáticas, tais como a precipitação pluviométrica, que determina a incidência de doenças fúngicas e, consequentemente, a quantidade de Cu aplicada (KOMÁREK et al., 2010). Esta situação

merece maior atenção nos solos da Campanha Gaúcha, pois estes apresentam baixos teores de argila (em geral < 10%), de matéria orgânica (<1%) e, portanto, baixa capacidade de adsorção de Cu. Associado à isso, esses solos apresentam predominância de argilominerais 1:1, como a caulinita, que possui baixa substituição isomórfica, e baixa densidade de cargas negativas (CTC) (McBRIDE, 1994). Estas características conferem uma baixa capacidade de adsorção de Cu (BRADL, 2004), sendo que a maior parte do metal permanece fracamente adsorvida, podendo facilmente ser dessorvida para a solução do solo e então ficar passível de absorção pelas plantas (MIOTTO et al., 2014).

2.3 MANEJO DO SOLO SOBRE A DISPONIBILIDADE DO COBRE E A MICROBIOTA DO SOLO

A MOS constitui um sistema complexo de substâncias, cuja dinâmica é governada pela adição de resíduos orgânicos de diversas naturezas e por uma transformação contínua sob ação de fatores bióticos e abióticos (GUERRA et al., 2008). As camadas superficiais do solo geralmente apresentam os maiores teores de MOS, devido à deposição do material vegetal. A MOS tem grande importância na retenção de cátions e complexação de elementos tóxicos, como o Cu, devido às cargas negativas presentes na superfície dos agregados (BAYER; MIELNICZUK, 2008). O Cu tem alta reatividade com grupos funcionais contendo S e N, bem como grupos carboxílicos e fenólicos da MOS (CROUÉ et al., 2003). Essa alta afinidade de ligação do Cu com as cargas da MOS, que confere alta energia de ligação (CASALI et al., 2008), aumenta a sua complexação e, consequentemente, reduz sua disponibilidade e mobilidade no solo, reduzindo o seu potencial fitotóxico (BRUNETTO et al., 2014). Isso é observado em sistemas de cultivo não submetidos ao revolvimento do solo, como o sistema de semeadura direta. Entretanto, quando o solo é submetido ao revolvimento, como ocorre no sistema convencional de cultivo, a área superficial específica da MOS é aumentada devido à desagregação do solo, o que permite a entrada de oxigênio e estimula a decomposição microbiana. Dessa forma, o Cu que estava ligado à superfície dos colóides torna-se disponível podendo causar fitotoxicidade às plantas (TOSELLI et al., 2009).

Outro fator afetado pelas práticas agrícolas de manejo de solo é a atividade microbiana do solo. Esses organismos atuam nos processos de decomposição da MOS, participando diretamente no ciclo biogeoquímico dos nutrientes, e dessa forma mediam a sua disponibilidade no solo (GRISI; GRAY, 1986). Em solos não revolvidos, a mineralização da MOS ocorre mais lentamente, e isso ocasiona menores perdas de C e N, o que favorece a

comunidade microbiana do solo como um todo, resultando em maior biomassa e atividade microbiana nesse solos (CAMPOS et al., 2016). Por outro lado, o revolvimento do solo estimula a perda de C e N através de CO_2 e NH_3 pela oxidação da MOS (OMONODE et al., 2011), isso leva a muitas mudanças na composição da microbiota do solo (FIERER et al., 2012), promovendo sua diminuição (PEREZ; RAMOS; McMANUS, 2005). Em um mesmo solo, o revolvimento pode duplicar a taxa de perda da MOS e de perda de C e N, em relação a um sistema de manejo sem revolvimento (BAYER; MIELNICZUK; MARTIN-NETO, 2000).

Esses efeitos causados pelo revolvimento do solo podem ser agravados em solos como o utilizado nesse estudo, devido apresentar baixa proteção física à MOS, pela inexpressiva interação organomineral entre a MOS e óxidos de Fe e Al. Estes, são os principais minerais responsáveis pela sorção de compostos orgânicos, e são apontados como a classe de minerais mais importante na estabilização da MOS (LOURENZI et al., 2011; WISEMAN; PÜTTMANN, 2005).

2.4 COBRE NA FISIOLOGIA DAS PLANTAS

O Cu é um elemento essencial aos vegetais pois atua como componente estrutural e catalítico de várias proteínas e enzimas que estão envolvidas em processos metabólicos (PILON et al., 2006), como na fotossíntese, na respiração, no metabolismo de carboidratos e reprodução (KABATA-PENDIAS, 2011). Em cloroplastos de plantas, ocorrem três proteínas cúpricas principais; a plastocianina, a polifenol oxidase e a superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD) (RAVET et al., 2011). A plastocianina é uma proteína localizada no lúmen de tilacóides de plantas, e é responsável pelo transporte de elétrons entre o citocromo b6*f* e o fotossistema I na fase fotoquímica da fotossíntese (YRUELA, 2013). A polifenol oxidase catalisa a hidroxilação de monofenóis em o-difenóis e a oxidação destes últimos para produzir o-quinonas (MAYER, 2006). As enzimas superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD) estão presentes nos peroxissomos, no citosol e no estroma dos cloroplastos, e agem na dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) à H_2O_2 (BURKHEAD et al., 2009; PILON; RAVET; TAPKEN, 2011). O Cu também é importante para a citocromo c oxidase, uma oxidase terminal da cadeia respiratória nas mitocôndrias (CARR; WINGE, 2003), e atua como receptor de etileno na membrana (BORGHI et al., 2007). Outras proteínas também requerem Cu, tais como ascorbato oxidases e amina oxidases (COHU; PILON, 2010).

Entretanto, quando presente em altas concentrações, pode proporcionar efeitos tóxicos ao tecido vegetal, inibindo o crescimento e o desenvolvimento das plantas, bem como causar

desbalanços nutricionais nas plantas (KABATA-PENDIAS, 2011; WENG et al., 2005; XU et al., 2006). Plantas que crescem em ambientes com altos teores de Cu disponíveis podem acumular elevada quantidade deste metal em seus tecidos (KABATA PENDIAS, 2011), sendo que o efeito primário da toxidez de Cu na maioria das espécies vegetais ocorre nas raízes, podendo apresentar rachaduras e danos na cutícula, causando redução significativa na absorção de água e de nutrientes pelas raízes (CHEN et al., 2013; KOPITTKE et al., 2009). Além disso, elevadas concentrações de Cu no substrato podem levar à translocação do metal para a parte aérea e, dessa forma, interferir em vários processos fisiológicos, como a fotossíntese (CAMBROLLÉ et al., 2013). O excesso de Cu na parte aérea pode impedir a transferência de elétrons na cadeia transportadora, causar danos às membranas do cloroplasto, inibir a formação e/ou alterar a estrutura dos pigmentos fotossintéticos e impedir a síntese ou atividade das enzimas do ciclo de Calvin (GONZÁLEZ-MENDOZA et al., 2013; JOHN et al., 2009; KÜPPER et al., 2002; YRUELA, 2005).

Somado a isso, o acúmulo de Cu na planta pode causar respostas bioquímicas de estresse oxidativo devido ao efeito tóxico que causa nas plantas (CAMBROLLÉ et al., 2012; MATEOS-NARANJO et al., 2013). O Cu pode catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em função de oscilar entre as formas reduzida (Cu^{+}) e oxidada (Cu^{+2}) dentro da planta. A terminologia EROs inclui os radicais livres, que são espécies reativas que possuem um elétron desemparelhado em seu último orbital, e outras, que embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade eletrônica (MARRONI, 2002). Dentre elas, encontra-se o $O_2^{\bullet-}$, o qual é produzido por meio de uma redução do oxigênio através de vários mecanismos, podendo ser resultado de uma transferência de elétrons na mitocôndria ou cloroplastos (BREUSEGEM et al., 2001; GILL; TUTEJA, 2010). Nas células, o $O_2^{\bullet-}$ é convertido à H_2O_2 através da dismutação realizada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (PILON; RAVET; TAPKEN, 2011). O H_2O_2 também é uma ERO, porém menos reativa que o $O_2^{\bullet-}$ e relativamente estável, o que pode facilitar a sua difusão através das membranas (MITTLER, 2002). Contudo, na presença de metais de transição como o Cu^{2+}, o H_2O_2 pode gerar o radical $OH^{\bullet}$ através da reação de Fenton (GILL; TUTEJA, 2010). O $OH^{\bullet}$ é provavelmente um dos radicais mais reativos dentre as EROs, e embora possua uma meia-vida curta, é um radical potencialmente forte e com afinidade à biomoléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; POSCHENRIEDER et al., 2008). O oxigênio singleto ($^1O_2$) é uma ERO formada predominantemente nos cloroplastos através da transferência de energia de uma clorofila foto-excitada para o elétron do oxigênio molecular (MITTLER, 2002).

Para controlar o nível de EROs e para proteger as células contra o seu excesso, as plantas possuem um sistema antioxidante representado por compostos de baixo peso molecular, como os carotenoides, e por enzimas, tais como a SOD e a guaiacol peroxidase (POD) (GRATÃO et al., 2005). A atividade das enzimas SOD é essencial para a transformação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2, enquanto que a POD é uma das enzimas responsáveis pela remoção do excesso de H_2O_2 (SHARMA et al., 2012; CHOUDHARY et al., 2007; TANYOLAC; EKMEKÇI; ÜNALAN, 2007). Devido às EROs apresentarem potencial para interagir com muitos componentes celulares, um desequilíbrio entre as respostas antioxidantes e o aumento da produção de EROs pode causar estresse oxidativo na célula (ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; GUO, 2007), promovendo danos significativos às membranas e à outras macromoléculas essenciais, tais como pigmentos fotossintéticos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídios (GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, a atividade das enzimas POD e SOD estão entre os principais parâmetros bioquímicos afetados pelo estresse oxidativo (JAIN et al., 2010; YANG et al., 2011). Essas perturbações nos processos fisiológicos podem levar à inibição do crescimento (MOURATO; MARTINS; CAMPOS-ANDRADA, 2009) e diminuição na produção de biomassa pelas plantas, como um resultado da toxidez do Cu (BAZIHIZINA et al., 2015; ZHANG et al., 2014).

2.5 EXPANSÃO DO CULTIVO DA SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL)

A soja é considerada a leguminosa de grãos de maior importância econômica no cenário agrícola mundial (SÁNCHEZ-PARDO; FERNÁNDEZ-PASCUAL; ZORNOZA, 2012), e o Brasil é o maior exportador e segundo maior produtor do grão (CONAB, 2017). Sendo a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas décadas, a soja é responsável por 57% da área cultivada no Brasil (MAPA, 2017). Dentro disso, o Rio Grande do Sul contribui com uma área cultivada de 5,6 milhões de hectares, sendo o terceiro maior produtor de soja do país (CONAB, 2017).

Nos últimos anos, tem-se observado um incremento na implantação de culturas agrícolas na região da Campanha Gaúcha, a exemplo da soja, que tem ganhado espaço devido, principalmente, ao incentivo financeiro que recebe (RATHMANN et al., 2008). Associado à isso, a cultura da soja pode ser utilizada no processo de fitoestabilização de metais em solos contaminados (FELLET et al., 2007; MURAKAMI; AE, 2009; PIERZYNSKI et al., 1994), como os solos da região da Campanha Gaúcha. As plantas jovens de videira cultivadas nesses

solos, demonstraram crescimento reduzido de raízes e parte aérea, clorose foliar e acúmulo de cobre nas raízes (MIOTTO et al., 2014).

O uso da cultura da soja nesses solos contaminados por Cu é uma alternativa interessante, uma vez que as concentrações de Cu no solo tendem a diminuir durante o desenvolvimento da cultura (SMANHOTTO et al., 2010). Outras culturas anuais já foram estudadas com essa finalidade (TIECHER et al., 2017). Entretanto, estudos sobre a tolerância da soja ao excesso de Cu em solos contaminados ainda são escassos (SILVA; VITTI; TREVIZAM, 2014). Associado à isso, os solos utilizados nesse estudo apresentam baixo teor de matéria orgânica, e a vegetação de plantas que coabitam os vinhedos, tais como espécies nativas dos Campos Sulinos e plantas de cobertura de solo cultivadas nas entrelinhas, é predominantemente formada por gramíneas (QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009; ZALAMENA et al., 2013). Portanto, a inclusão de plantas que fixam simbioticamente o N_2, como a soja, pode, contribuir na melhoria do ecossistema, aumentando o conteúdo de nitrogênio disponível no solo e promovendo a manutenção da cobertura vegetal (CONRAD et al., 2018; WHITING et al., 2004).

REFERÊNCIAS

ABREU, C. A. et al. Total and available copper in some soil profile samples from the state of São Paulo. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.43, n.1-2, p. 149- 160, 2012.

BAZIHIZINA, N. et al. Photosynthesizing on metal excess: Copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. populations. **Plant Science**, v.232, p. 67–76, 2015.

BAYER, C.; MIELNICZUC, J. Dinâmica e Função da Matéria Orgânica. In: SANTOS, G.A. et al. (Eds) **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo,** Ecossistemas Tropicais & Subtropicais. 2ed. Porto Alegre, 2008.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Efeito de sistemas de preparo e de cultura na dinâmica da matéria orgânica e na mitigação das emissões de CO_2. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.599-607, 2000.

BORGHI, M. et al. Responses of *Populus*×*euramericana* (*P. deltoides*×*P. nigra*) clone *Adda* to increasing copper concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v.61, n.1, p. 66-73, 2007.

BRADL H. B. Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. **Journal of Colloid and Interface Science,** v.277, p.1–18, 2004.

BREUSEGEM, F.V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

BRUNETTO, G. et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.65, p.609-624, 2014.

BRUN L. A. et al. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. **Environmental Pollution**, v.102, p.151–161, 1998.

BRUN, L. A.; LE CORFF, J.; MAILLET, J. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environmental Pollution**, v.122, p. 361–368, 2003.

BURKHEAD, J. L. et al. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, p. 799-816, 2009.

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

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

CAMBROLLÉ, J. et al. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, v.86, p.867–874, 2012.

CAMPOS, S. B. et al. Soil suppressiveness and its relations with the microbial community in a Brazilian subtropical agroecosystem under different management systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.96, p.191-197, 2016.

CARR, H. S.; WINGE, D. R. Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. **Accounts of Chemical Research**, v.36, p.309–316, 2003.

CASALI, C. A. et al. Formas e dessorção de cobre em solos cultivados com videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.32, p.1479–1487, 2008.

CHAIGNON, V.; HINSINGER, P. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v.32, p.824-833, 2003.

CHEN, P. Y. et al. Effects of calcium on rhizotoxicity and the accumulation and translocation of copper by grapevines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.73, p.375- 382, 2013.

CHOUDHARY, M. et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. E**cotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.204–209, 2007.

COHU, C. M., PILON, M. Cell biology of copper. In R Hell, RR Mendel, eds, Plant Cell Monographs: Cell Biology of Metals and Nutrients. **Springer**, v.17 p. 55–74, 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. v.4, n.9, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_06_08_09_02_48_boletim_graos_junho_2017. pdf. >Acesso em: 15 out. 2017.

CONRAD, K. A. et al. Soil nitrogen status and turnover in subtropical leucaena-grass pastures as quantified by $\delta^{15}N$ natural abundance. **Geoderma**, v.313, p.126-134, 2018.

CROUÉ, J. P. et al. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: evidence for the presence of nitrogenous binding site. **Environmental Science & Technology**, v.37, p.328–336, 2003.

EPSTEIN, L.; BASSEIN, S. Pesticide applications of copper on perennial crops in California, 1993 to 1998. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p.1844 – 1847, 2001.

FELLET, G. et al. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. **Ecological Engineering**, v.31, p.207-214, 2007.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D. et al. Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components. **Geoderma**, v.145, p.91–7, 2008.

FIERER, N. et al. Comparative metagenomic, phylogenetic, and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **The ISME Journal**, v.61, p.1007–1017, 2012.

FLORES, S. S.; MEDEIROS, R. M. V. Ruralidades na compreensão dos territórios do vinho e sua identidade, Campo-território. **Revista de Geografia Agrária**, v.8, p.1-19, 2013.

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

GIROTTO, E. et al. Biochemical changes in black oat (A*vena 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, p.9051–9063, 2014.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D. et al. Copper Stress on Photosynthesis of Black Mangle (*Avicennia germinans*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v.85, n.2, p.665-670, 2013.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, p.481–494, 2005.

GRISI, B. M.; GRAY, T. R. G. Comparação dos métodos de fumigação, taxa de respiração em resposta à adição de glicose e conteúdo de ATP para estimar a biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.109-115, 1986.

GUERRA, J. G. M. et al. Macromoléculas e Substâncias Húmicas. In: SANTOS, G.A. et al. (Eds) **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo**. Ecossistemas Tropicais & Subtropicais. 2ed. Porto Alegre, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and medicine**, 5ed. Reino Unido, Oxford University Press, 2015.

JAIN, R. et al. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta Physiologiae Plantarum,** v.32, p.979–986, 2010.

JOHN, R. et al. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. **International Journal of Plant Production**, v.3, p.65–75, 2009.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. CRC Press, 4 ed. Boca Raton, Florida, cap 5. 2011.

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

KOPITTKE, P. M. et al. Toxic effects of Cu^{2+} on growth, nutrition, root morphology, and distribution of Cu in roots of Sabi grass. **Science of the Total Environment**, v.16, p.4616–4621, 2009.

KÜPPER, H. et al. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **Journal of Phycology**. v.38, p.429–441, 2002.

LOURENZI, C. R. et al. Soil chemical properties related to acidity under successive pig slurry applications. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1827-1836, 2011.

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

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Soja. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>. Acesso em: 11 set. 2017.

MARRONI, N. P. **Estresse oxidativo e antioxidante**. Canoas: Ed. Ulbra, p,27-38, 2002.

MATEOS-NARANJO, E. et al. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: ecotoxicological implications. E**cotoxicology and Environmental Safety**. v.90, p.136–142, 2013.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochemistry**, v.67, p.2318–2331, 2006.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils.** Oxford University Press, New York.1994.

MICHAUD, A. M. et al. Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cucontaminated, former vineyard soils. **Plant and Soil**, v.298, p.99-111, 2007.

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, p.593–610, 2014.

MITTLER, R. Oxidative Stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science,** v.7, p.405-410, 2002.

MOURATO, M. P.; MARTINS, L. L.; CAMPOS-ANDRADA, M. P. Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. **Biologia Plantarum**, v.53, p.105–111, 2009.

MURAKAMI, M.; AE, N. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Hazardous Materials**, v.162, p. 1185-1192, 2009.

NACHTIGALL, G. R.; NOGUEIROL, R. C.; ALLEONI, L. R. F. Formas de cobre em solos de vinhedos em função do pH e da adição de cama-de-frango. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.427-434, 2007.

OLIVEIRA, K. W. et al. Metais pesados em latossolos tratados com biossólido e cultivados com milho em experimento de longa duração. **Scientia Agrícola**, v.62, p.381-388, 2005.

OMONODE, R. A. et al. Soil Nitrous Oxide Emissions in Corn following Three Decades of Tillage and Rotation Treatments. **Soil Science Society of America Journal**, v.75, p.152–163, 2011.

PEREZ, K. S. S.; RAMOS, M. L. G.; McMANUS, C. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo, nos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.137-144, 2005.

PIERZYNSKI, G. M. et al. Vegetative Remediation at Superfund Sites. In: HESTER, R. E.; HARRIZON, R. M. **Mining and its Environmental Impact** (Royal Soc. Chem. Issues in Environ. Sci. Technol. 1). p. 49-69, 1994.

PILON, M. et al. Copper cofactor delivery in plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.256-263, 2006.

PILON, M.; RAVET, K.; TAPKEN, W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutase. **Biochimica et Biophysica Acta,** v.1807, p.989–998, 2011.

POSCHENRIEDER, C. et al. A glance into aluminium toxicity and resistance in plants. **Science of Total Environment,** v.400, p.356-368, 2008

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010**. Brasília, DF: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho, 110 p. 2011.

QUADROS, F. L. F.; TRINDADE, J. P. P.; BORBA, M. A abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. In: Pillar V.P. de; Müller S.C.; Castilhos Z.M.S.; Jacques A.V.A. (Ed.). **Campos Sulinos** "conservação e uso sustentável da biodiversidade". Brasília-DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 206-213, 2009.

RATHMANN, R. et al. Diversificação produtiva e as possibilidades de desenvolvimento: um estudo da fruticultura na região da Campanha no RS. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.46, p. 325-354, 2008.

RAVET, K. et al. Spatiotemporal analysis of copper homeostasis in *Populus trichocarpa* reveals an integrated molecular remodeling for plant physiology, a preferential allocation of copper to plastocyanin in the chloroplasts of developing leaves. **Plant Physiology,** v. 157, p. 1300-1312, 2011.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. **Environmental and Experimental Botany**, v.84, p.52–60, 2012.

SANTANA, N. A. et al. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. **Applied Soil Ecology**, v.96, p.172–182, 2015.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SILVA, I. R.; SÁ MENDONÇA, E. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R. F.et al., (Eds) **Fertilidade do Solo**, Viçosa, MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p. 275 – 374, 2007.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAM, A. R. Heavy metal toxicity in rice and soybean plants cultivated in contaminated soil. **Revista Ceres**, v.61, p.248-254, 2014.

SMANHOTTO, A. et al. Cobre e zinco no material percolado e no solo com a aplicação de água residuária de suinocultura em solo cultivado com soja. **Engenharia Agrícola, Jaboticabal**, v.30, p.346-357, 2010.

SODRÉ, F. F.; LENZI, E.; COSTA, A. C. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**, v. 24, p. 324-330, 2001.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic Press, 267 p. 1995.

TANYOLAC, D.; EKMEKÇI, Y.; ÜNALAN, S. Changes in photochemical and anti-oxidant enzyme activities in maize *(Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. **Chemosphere**, v.6, p.89–98, 2007.

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.

TOSELLI, M. et al. The accumulation of copper in soils of the Italian region Emilia-Romagna. **Plant, Soil and Environment**, v.55, p.74-79, 2009.

WENG, G. et al. Copper uptake by four *Elsholtzia* ecotypes supplied with varying levels of copper in solution culture. **Environment International**, v.31, p.880–884, 2005.

WHITING, S. N. et al. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. **Restoration Ecology**. v.12, p.106-116, 2004.

WISEMAN, C. L. S.; PÜTTMANN, W. Soil organic carbon and its sorptive preservation in central Germany. **European Journal of Soil Science**, v.56, p.65-76, 2005.

XU, J. et al. Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. **Chemosphere**, v.62, p.602–607, 2006.

YANG, Y. et al. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* "Combier") to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.1483–1491, 2011.

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

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

ZALAMENA, J. et al. Estado nutricional, vigor e produção em videiras cultivadas com plantas de cobertura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.1190-1200, 2013.

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

ZHANG, Y. H. ZHANG, Z. P.; GUO, T. R. Physiological changes in barley plants under combinated toxicity of aluminium, copper and cadmium. **Colloides and surfaces**, v.57, p.182-188, 2007.

3 MANUSCRITO I

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL) SUBEMTIDAS AO EXCESSO DE COBRE

RESUMO

O cobre (Cu) é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Porém, quando em excesso pode causar efeitos tóxicos através de perturbações nos processos bioquímicos e fisiológicos, mas essas respostas podem ser diferentes para cada cultivar de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). O objetivo do estudo foi avaliar as respostas fisiológicas de diferentes cultivares de soja ao excesso de Cu. O estudo foi conduzido em sistema hidropônico, sendo os tratamentos compostos por três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 μM de Cu) e quatro cultivares de soja (NA 5909 RG, DM 5958 RSF IPRO, M 6410 IPRO e DM 6563 RSF IPRO). Após 21 dias de cultivo foram avaliadas as trocas gasosas da folha e as mesmas folhas foram utilizadas para determinar a atividade das enzimas SOD e as concentrações de H_2O_2 e de TBARS. As plantas foram seccionadas em raízes e parte aérea para obtenção da massa seca e concentração de Cu nos tecidos. O excesso de Cu no meio aumentou a concentração de Cu nas raízes e parte aérea das plantas de soja, o que foi tóxico para as plantas diminuindo a produção de massa seca, comprometendo a fotossíntese, mesmo com o aumento da atividade do sistema antioxidante (SOD). A cultivar M 6410 IPRO manteve a mais alta taxa fotossintética quando exposta a maior concentração de Cu. Essa cultivar ainda acumulou grandes concentrações de Cu nas raízes sem diminuir a produção de massa seca radicular, possivelmente devido à maior atividade das enzimas SOD. Por outro lado, a cultivar DM 5958 RSF IPRO reduziu drasticamente sua taxa fotossintética e sua produção de massa seca em excesso de Cu.

Palavras-chave: Metal Pesado. Fotossíntese. Sistema Antioxidante. Produção de Massa Seca.

ABSTRACT

Copper (Cu) is an essential element for the growth and development of plants. However, when present in excessive concentrations can cause toxic effects related to disturbances in biochemical and physiological processes. These responses may be different among soybean cultivars. The objective of this study was to evaluate the physiological responses of different soybean cultivars to increases in Cu concentrations. To pursue it 4 different soybean cultivars (NA 5909 RG, DM 5958 RSF IPRO, M 6410 IPRO and DM 6563 RSF IPRO) were submited to treatments with 3 concentrations of Cu (0.5, 20 and 40 μM Cu). 21 days after the emergence, leaf gas exchanges, were evaluated and the same leaves were used to determine superoxide dismutase (SOD) activity and H_2O_2 and TBARS concentrations. Soybean plants were sectioned in roots and shoots to obtain the dry mass and Cu concentration in tissues for the different fractions. High concentrations of Cu were toxic to soybean plants, reducing dry mass production and compromising photosynthesis. The M 6410 IPRO cultivar maintained the highest photosynthetic rate when exposed to the highest Cu concentration. This cultivar also accumulated large concentrations of Cu in the roots without decreasing root dry mass production, possibly due to the higher SOD activity. On the other hand, DM 5958 RSF IPRO cultivar drastically reduced its photosynthetic rate and its dry mass production in Cu excess.

Key-words: Heavy Metal. Photosynthesis. Antioxidant System. Dry Matter Production.

3.1 INTRODUÇÃO

Aplicações sucessivas de fungicidas cúpricos em videiras ocasionaram o aumento do conteúdo de cobre (Cu) em solos de vinhedos ao longo dos anos (BRUNETTO et al., 2014). As videiras, com o passar dos anos diminuem a produtividade de uva e, por isso, os vinhedos são erradicados. Contudo, no momento da reimplantação dos vinhedos, a mobilização do solo potencializa a oxidação da matéria orgânica do solo (MOS), o que leva ao aumento na disponibilidade de Cu no solo (CAMPOS et al., 2013), especialmente em solos com baixa proteção física da MOS e baixa capacidade de sorção do Cu no solo (BRUNETTO et al., 2014). O Cu em excesso no solo tem sido tóxico para plantas jovens de videiras transplantadas em vinhedos antigos (MIOTTO et al., 2014). Dessa forma, culturas anuais, como a soja, podem ser cultivadas durante alguns anos auxiliando na fitoestabilização do Cu, para que posteriormente as videiras possam ser reinseridas nessas áreas (FELLET et al., 2007; MURAKAMI; AE, 2009; PIERZYNSKI et al., 1994).

O Cu é um elemento essencial às plantas, mas quando presente em elevadas concentrações no meio pode ser acumulado no tecido vegetal, causando respostas negativas em nível fisiológico, o que pode causar a inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas (KABATA-PENDIAS, 2011). O efeito primário da toxidez por Cu na maioria das espécies vegetais ocorre nas raízes, e essas geralmente acumulam mais Cu do que a parte aérea (LASAT, 2002). Entretanto, elevadas concentrações de Cu no substrato podem estimular a translocação de Cu para a parte aérea e, dessa forma, interferir em vários processos fisiológicos (CAMBROLLÉ et al., 2013). No processo da fotossíntese, o Cu pode causar a inibição do fluxo de elétrons, alterações na composição das membranas do cloroplasto, e inibição da síntese e/ou alterações na estrutura dos pigmentos fotossintéticos tais como clorofilas e carotenoides (GONZÁLEZ-MENDOZA et al., 2013; JOHN et al., 2009).

Além disso, devido a sua capacidade redox, o Cu pode catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (NAVARI-IZZO; QUARTACCI, 2001), como o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) formado através da reação de Fenton (GILL; TUTEJA, 2010). Estas EROs possuem um elétron não emparelhado e são altamente reativas. O equilíbrio entre a geração e a eliminação de EROs é controlado pelo sistema de defesa antioxidante (BECANA et al., 2010). Entretanto, quando este não pode suportar o nível de produção de EROs, ocorre o estresse oxidativo (GIROTTO et al., 2013), causando danos em estruturas ricas em ácidos graxos, como a peroxidação lipídica em membranas celulares, que produz compostos

carbonados como o malondialdeído (SOTO; GAETE; HIDALGO, 2011). O equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade do sistema antioxidante é crucial para a sobrevivência e adaptação de plantas que crescem em solos com níveis elevados de metais pesados (SŁOMKA et al., 2008). A primeira linha de defesa do sistema antioxidante da planta contra as EROs é a superóxido dismutase (SOD), que age na dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para a forma menos tóxica de H_2O_2 e O_2 (ZOUARI et al., 2016). A atividade dessa enzima é geralmente aumentada sob condições de elevadas concentrações de metais, como o Cu (ZHANG et al., 2010).

Contudo, as respostas fisiológicas das plantas cultivadas em excesso de Cu podem variar entre espécies e/ou entre cultivares dentro de uma mesma espécie (MASSOCATTO et al., 2013). Desse modo, avaliar essas respostas pode ajudar a desvendar as estratégias empregadas na absorção, acumulação e tolerância aos metais pesados, bem como quais as cultivares são mais adaptadas à solos contaminados por Cu (CAMBROLLÉ et al., 2013; KABATA-PENDIAS, 2011). Sendo assim, nesse estudo utilizaram-se as cultivares de soja que destacam-se como mais adaptadas às condições edafoclimáticas da região da Campanha Gaúcha (EMBRAPA, 2014) de acordo com o registro nacional de cultivares (RNC, 2016), tais como NA 5909 RG, DM 5958 RSF IPRO, M 6410 IPRO e DM 6563 RSF IPRO. O estudo objetivou avaliar respostas fisiológicas de diferentes cultivares de soja ao excesso de Cu.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Descrição do experimento

O estudo foi realizado durante o mês de outubro de 2016 em casa de vegetação climatizada, localizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, região Sul do Brasil (29°42’56,44” *S* e 53°43’12,57” *W*). A temperatura média do ar no interior da casa de vegetação foi 26ºC e a umidade relativa do ar 50%. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado contendo 4 repetições. As plantas foram cultivadas em sistema de cultivo hidropônico, onde cada bandeja continha 17 litros de solução nutritiva contendo as seguintes concentrações (mg L^{-1}): 85,31 N; 7,54 P; 11,54 S; 97,64 Ca; 23,68 Mg; 104,75 K; 176,76 Cl; 0,27 B; 0,05 Mo; 0,01 Ni; 0,13 Zn; 0,03 Cu; 0,11 Mn e 2,68 Fe. Três plântulas de cada cultivar de soja: NA 5909 RG (5909), DM 5958 RSF IPRO (5958), M 6410 IPRO

(6410) e DM 6563 RSF IPRO (6563) foram fixadas por espumas em placas de isopor e aeradas com o auxílio de um compressor (Chiaperini, CJ40 AP3V 360L, Brasil).

As sementes utilizadas para a obtenção das plântulas foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio à 10% (v/v) por 15 min (SÁNCHEZ-PARDO; FERNÁNDEZ-PASCUAL; ZORNOZA, 2012). As sementes foram semeadas em papel filtro umedecido 2,5 vezes o peso do papel seco, e mantidas em germinador tipo BOD (Box Organism Development) à 20ºC com fotoperíodo de 24 horas. Plântulas homogêneas foram transferidas para o sistema de cultivo hidropônico. Após 7 dias de aclimatização das plântulas, foram adicionadas as concentrações de Cu (0,5 µM, correspondente à concentração original da solução nutritiva, 20 e 40 µM) fornecidos na forma de $CuSO_4$. Durante o período experimental a solução nutritiva foi substituída a cada quatro dias, e o pH mantido a 5,5. Após 21 dias de cultivo foram realizadas as avaliações e coleta das plantas.

3.2.2 Produção de massa seca e concentração de Cu no tecido

Aos 21 dias após o transplante, duas plantas de cada repetição foram coletadas e seccionadas em raízes e parte aérea. As raízes foram lavadas com água destilada, secas com papel absorvente e reservadas. Raízes e parte aéreas foram secas em estufa de ventilação forçada à 65 °C até obtenção de massa constante. A massa seca de raízes (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA) foram obtidas usando uma balança de precisão (Shimadzu, AY220, Filipinas). As raízes e parte aéreas das plantas foram moídas em moinho do tipo Willey e passadas em peneira com malha de 2 mm. O tecido foi submetido a digestão nitroperclórica (EMBRAPA, 2009). A concentração de Cu no extrato da digestão foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, AAnalyst 200, Estados Unidos).

3.2.3 Trocas gasosas da folha

Aos 21 dias após o transplante das plântulas, as trocas gasosas das folhas com o ambiente foram determinadas utilizando uma radiação de 1500 µmol m^{-2} s^{-1} e concentração de CO_2 de 400 µmol mol^{-1}, por meio de um analisador de gás por radiação infra-vermelho [Infrared Gas Analyser (IRGA), Mod. Li-COR® 6400 XT]. As leituras foram realizadas entre oito e dez horas da manhã. Obteve-se a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), a concentração intercelular de CO_2 (C_i), a taxa de transpiração (E), a condutância estomática de vapores de água (G_s), a eficiência do uso da água (EUA), obtida pela relação entre quantidade de CO_2

fixado pela fotossíntese e quantidade de água transpirada, e a eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/C_i), obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e a concentração intercelular de CO_2. As avaliações foram realizadas no último trifólio completamente expandido em uma planta de cada repetição.

As folhas utilizadas para a realização dos parâmetros fotossintéticos juntamente com as raízes das plantas correspondentes, foram coletadas logo após o término das leituras e imediatamente congeladas em N líquido. Os tecidos foram macerados para a determinação dos pigmentos fotossintéticos, atividade SOD, concentração de H_2O_2 e peroxidação lipídica.

3.2.4 Pigmentos fotossintéticos

A determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos foi realizada segundo a metodologia proposta por Hiscox e Israeslstam (1979), com auxílio da fórmula de Lichtenthaler (1987). Para isso 0,05 g de material vegetal foram pesados e incubados durante 5 min à 65 °C em 40 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) até a remoção completa dos pigmentos do tecido. A absorbância da solução do sobrenadante foi determinada em um espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) nos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm, para a determinação da clorofila a, b e carotenoides, respectivamente. A clorofila total representa a soma dos valores de clorofilas a e b.

3.2.5 Atividade das enzimas SOD

Meio grama de material vegetal foi pesado e homogeneizado em 3 mL da solução tampão de fosfato de sódio 0,05 mol L^{-1} (pH 7,8), incluindo 1 mM EDTA e 0,5% Triton X-100. O extrato homogeneizado foi centrifugado à 13000 *g* durante 20 min à 4 ºC. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e conteúdo proteico (BRADFORD, 1976; ZHU et al., 2004).

A atividade das enzimas SOD foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis e Ries (1977). Para a reação, 3 mL do mix contendo solução tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina (13 mM), EDTA (0,1 µM), NBT (75 µM) e riboflavina (2 µM) foram adicionados em um tubo de ensaio. Os tubos foram incubados com lâmpadas fluorescentes de 15 watts durante 15 min. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em um espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) à 560 nm. Por esse método foi determinada a inibição da redução do NBT (ρ-nitro blue

tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. Tubos que não continham extrato, expostos e não expostos à luz foram utilizados como brancos para a reação. Uma unidade de atividade enzimática (U) de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para obter 50% de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibe 50% da reação de NBT e expressa em U mg^{-1} proteína.

3.2.6 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de H_2O_2 foi determinada conforme metodologia proposta por Loreto e Velikova (2001). Para isso, 0,1 g do material vegetal foram homogeneizados em 2,0 mL de de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado à 12.000 *g* por 15 min à 4 ºC e 0,5 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (10 mM) (pH 7,0) e 1 mL de KI (1 mol L^{-1}). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) à 390 nm.

3.2.7 Peroxidação lipídica

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas usando metodologia proposta por El-Moshaty et al. (1993), de acordo com o acúmulo de malondialdeído (MDA), como produto final da peroxidação lipídica. Meio grama do material vegetal foi adicionado em 4,0 mL de tampão fosfato citrato TFK 0,2 M (pH 6,5). As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada à 4 ºC durante 15 min em 20000 *g*. Para a determinação de TBARS foram coletadas alíquotas de 1,5 mL do sobrenadante ao qual foi adicionado um volume igual de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v), sendo posteriormente incubadas em banho-maria à 95 ºC durante 40 min. A reação foi paralisada em banho de gelo por 15 min. Após, as amostras foram centrifugadas à 10000 *g* durante 5 min e em seguida foi determinada a absorbância em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) à 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica à 600 nm.

3.2.8 Análise estatística

A normalidade dos resíduos foi testada através do teste de Shapiro-Wilk. Os diferentes modelos (homocedásticos e heterocedásticos) foram selecionados baseados no critérios de informação de Akaike (AIC) e no critério de informação Bayesiano (BIC). Todos os modelos foram ajustados usando o pacote "nlme" (PINHEIRO et al., 2017) do ambiente estatístico R (R Core Team, 2017). Os resultados foram submetidos à análise de variância e testados pelo teste F. Quando significativo a 5% de probabilidade de erro, as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott. Uma análise de componentes principais (ACP) foi realizada para verificar a estrutura de correlação e o grau de associação das diferentes variáveis consideradas neste estudo. Este tipo de análise permite a identificação de associações mais complexas entre as variáveis avaliadas e identificação daquelas com maior contribuição para as diferenças entre os tratamentos avaliados nesse estudo. Apenas componentes com autovalores maiores que 1 foram consideradas nesse estudo. A ACP foi realizada usando o pacote “FactoMineR” (LE; JOSSE; HUSSON, 2008) do ambiente estatístico R (R CORE TEAM, 2017).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Produção de massa seca e concentração de Cu

As cultivares diminuíram a produção de massa seca de parte aérea (MSPA) com o incremento das concentrações de Cu na solução nutritiva (Tabela suplementar). Mas, a produção de MSPA não diferiu entre as cultivares. A cultivar 5958 apresentou produção de massa seca de raízes (MSR) menor em 24 e 45%, respectivamente, para os tratamentos de 20 e 40 µM de Cu, quando comparado ao controle. Entretanto, a relação MSR/MSPA não diferiu entre as concentrações de Cu para essa cultivar, uma vez que a parte aérea e raízes foram semelhantemente afetadas pelo excesso do Cu. Nas cultivares 6410 e 6563 as concentrações de Cu não afetaram a produção de MSR. Entretanto, para ambas as cultivares, na presença de 40 µM de Cu, a relação MSR/MSPA foi 55% maior do que no tratamento controle (Tabela 1).

As concentrações de Cu na parte aérea e raízes aumentaram com o incremento da concentração de Cu na solução (Figura 1). Na concentração controle de Cu (0,5 µM), a concentração de Cu na parte aérea e raízes não diferiu entre as cultivares. Na presença de 20 µM de Cu, a cultivar 6563 apresentou a maior concentração de Cu na parte aérea. Entretanto,

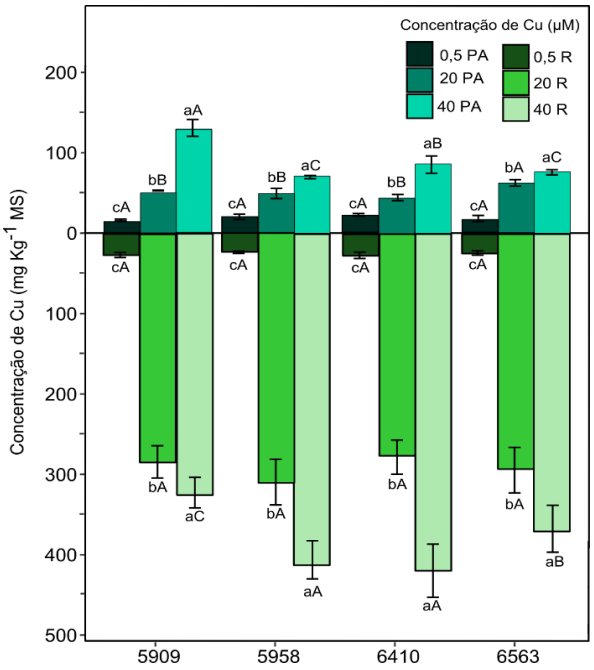
a concentração de Cu nas raízes não diferiu estatisticamente entre as cultivares. Na presença de 40 µM de Cu, a cultivar 5909 apresentou a maior concentração de Cu na parte aérea, aproximadamente 10 vezes maior que o observado na concentração controle, e a menor concentração de Cu nas raízes. As cultivares 5958 e 6410 apresentaram as maiores concentrações de Cu nas raízes quando cultivadas na solução com 40 µM de Cu (Figura 1).

Tabela 1 - Massa seca de raízes e relação da massa seca de raízes/massa seca da parte aérea das cultivares de soja 5909, 5958, 6410 e 6563 cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) em solução nutritiva.

Concentração de Cu (µM)	**5909**	**5958**	**6410**	**6563**
		Massa seca de raízes (g)		
0,5	0,22 ± 0,01 aC*	0,37 ± 0,03 aA	0,27 ± 0,03 aB	0,25 ± 0,03 aB
20	0,24 ± 0,04 aB	0,28 ± 0,02 bA	0,24 ± 0,00 aB	0,27 ± 0,02 aA
40	0,14 ± 0,01 bC	0,20 ± 0,01 cB	0,24 ± 0,01 aA	0,27 ± 0,02 aA
		Relação massa seca de raiz/ massa seca de parte aérea (g)		
0,5	0,11 ± 0,01 bC	0,17 ± 0,02 aA	0,14 ± 0,01 bB	0,12 ± 0,01 cC
20	0,14 ± 0,02 aB	0,16 ± 0,02 aA	0,13 ± 0,01 bB	0,15 ± 0,01 bB
40	0,11 ± 0,01 bC	0,19 ± 0,02 aB	0,21 ± 0,03 aA	0,18 ± 0,02 aB

*Os valores foram obtidos a partir de duas plantas e representam as médias ± desvio padrão de quatro repetições. Letras maiúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre concentrações de Cu para uma mesma cultivar ($P<0.05$).

Figura 1 - Concentrações de Cu na parte aérea (PA) e raízes (R) das cultivares de soja 5909, 5958, 6410 e 6563 cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu e parte da planta. Letras minúsculas indicam comparação entre concentrações de Cu para uma mesma cultivar e parte da planta (P<0.05). As barras verticais representam ± desvio padrão.



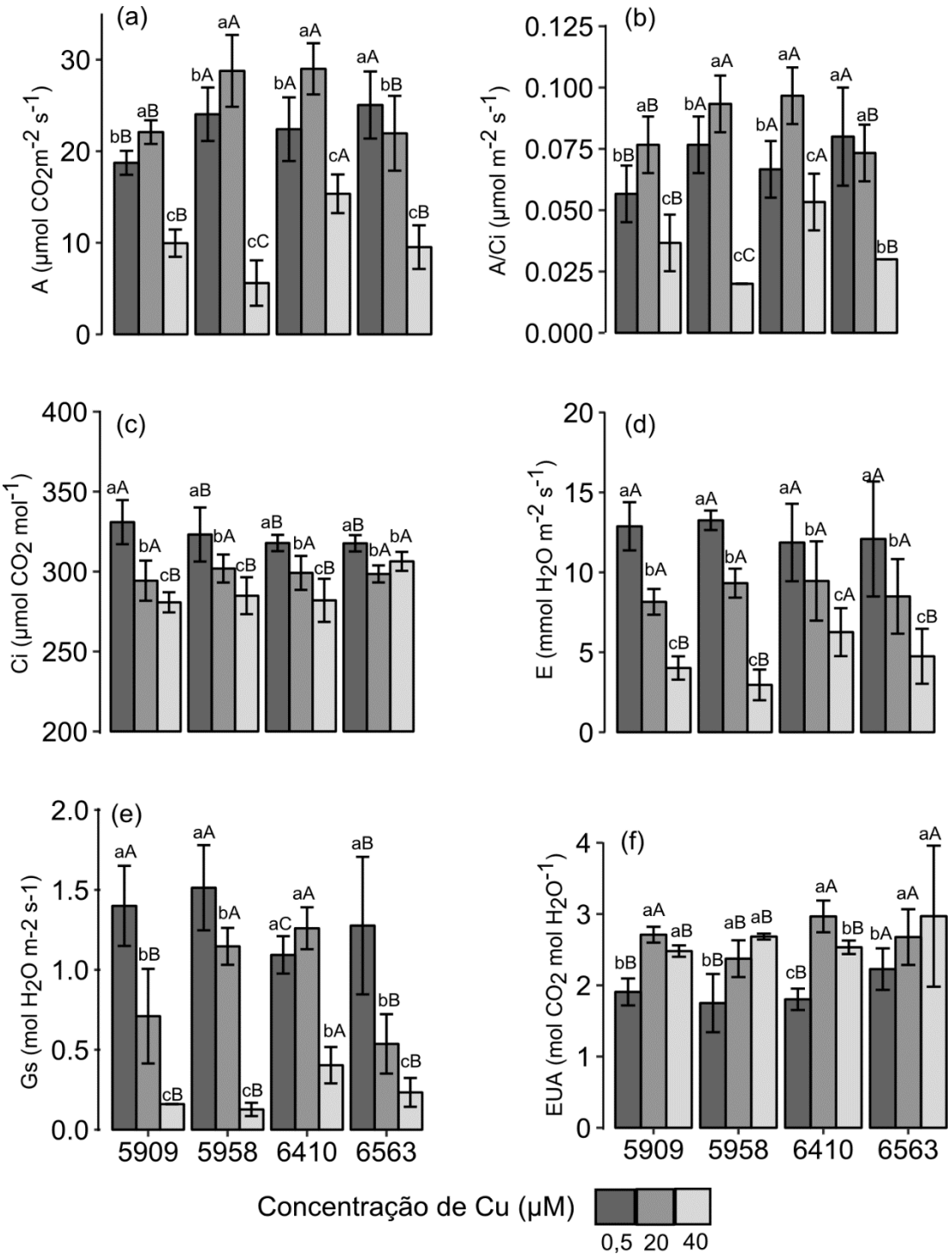
3.3.2 Trocas gasosas da folha

O excesso de Cu na solução nutritiva causou alterações nos parâmetros fotossintéticos das cultivares de soja. Na presença de 20 µM de Cu, a cultivar 6563 foi a única que apresentou taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) menor à obtida no tratamento controle (Figura 2 a). As demais cultivares apresentaram os máximos valores para A e A/C_i em 20 µM de Cu (Figuras 2 a, b). Nessa concentração de Cu houve diminuição na concentração interna de CO_2 (C_i) e na taxa transpiratória (E) para todas as cultivares. O mesmo comportamento foi observado para a condutância estomática (G_s), com exceção da cultivar 6410 que não diferiu do tratamento controle para essa variável (Figuras 2 c, d, e).

Na presença de 40 µM de Cu todas as cultivares apresentaram os menores valores de A, A/C_i, C_i, E e G_s, em comparação com os valores obtidos nas demais concentrações. Para essa concentração de Cu, a cultivar 6410 mostrou-se menos sensível, apresentando 70% da A obtida no controle (Figura 2). Por outro lado, a cultivar 5958 foi a mais sensível à presença de 40 µM de Cu, mantendo apenas 23% da A obtida no controle.

A eficiência de uso da água (EUA) foi menor para todas as cultivares na concentração controle de Cu, em comparação com as outras concentrações. Com o fornecimento de 20 ou 40 µM de Cu não houve variação na EUA para as cultivares, exceto para a cultivar 6410 que apresentou máxima EUA na presença de 20 µM de Cu (Figura 2 f).

Figura 2 - Taxa de assimilação líquida de CO_2 (a), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (b), concentação interna de CO_2 (c), taxa de transpiração (d), condutância estomática (e) e eficiência do uso da água (f) em cultivares de soja (5909, 5958, 6410 e 6563) cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu. Letras minúsculas indicam comparação entre concentrações de Cu para uma mesma cultivar (P<0.05). As barras verticais representam ± desvio padrão.



3.3.3 Pigmentos fotossintéticos

Todas as cultivares apresentaram diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos na presença de 40 µM de Cu em relação às outras concentrações (Tabela 2). Na presença de 20 µM de Cu as cultivares 6410 e 5958 apresentaram aumento na concentração de clorofila a, sendo que a cultivar 5958 apresentou também aumento na concentração de clorofila b e clorofila total (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides em cultivares de soja (5909, 5958, 6410 e 6563) cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) em solução nutritiva.

Concentração de Cu (µM)	**5909**	**5958**	**6410**	**6563**
		Clorofila a (mg g^{-1} PF)		
0,5	1,20 ± 0,12 aA*	1,09 ± 0,16 bB	1,03 ± 0,01 bB	1,05 ± 0,03 aB
20	1,04 ± 0,11bB	1,34 ± 0,05 aA	1,04 ± 0,02 aB	1,16 ± 0,11 aB
40	0,78 ± 0,05 cA	0,67 ± 0,03 cA	0,46 ± 0,06 cB	0,59 ± 0,05 bB
		Clorofila b (mg g^{-1} PF)		
0,5	0,36 ± 0,04 aA	0,33 ± 0,03 bA	0,29 ± 0,02 aB	0,29 ± 0,01 aB
20	0,28 ± 0,03 bC	0,40 ± 0,02 aA	0,26 ± 0,01 aC	0,32 ± 0,04 aB
40	0,21 ± 0,03 cA	0,18 ± 0,02 cA	0,11 ± 0,02 bB	0,15 ± 0,01 bB
		Clorofila total (mg g^{-1} PF)		
0,5	1,56 ± 0,03 aA	1,42 ± 0,02 bB	1,32 ± 0,02 aB	1,34 ± 0,01 aB
20	1,32 ± 0,01 bC	1,75 ± 0,01 aA	1,30 ± 0,01 aC	1,49 ± 0,01 aB
40	0,99 ± 0,01 cA	0,86 ± 0,03 cA	0,58 ± 0,03 bB	0,74 ± 0,01 bB
		Carotenoides (mg g^{-1} PF)		
0,5	0,33 ± 0,16 aA	0,35 ± 0,17 aA	0,28 ± 0,01 aB	0,31 ± 0,05 aB
20	0,29 ± 0,14 bC	0,37 ± 0,07 aA	0,26 ± 0,03 aD	0,33 ± 0,15 aB
40	0,21 ± 0,07 cA	0,19 ± 0,05 bA	0,12 ± 0,06 bC	0,16 ± 0,06 bB

*Médias ± desvio padrão de quatro repetições. Letras maiúsculas representam a comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu. Letras minúsculas representam a comparação entre concentrações para uma mesma cultivar ($P<0.05$).

3.3.4 Parâmetros bioquímicos

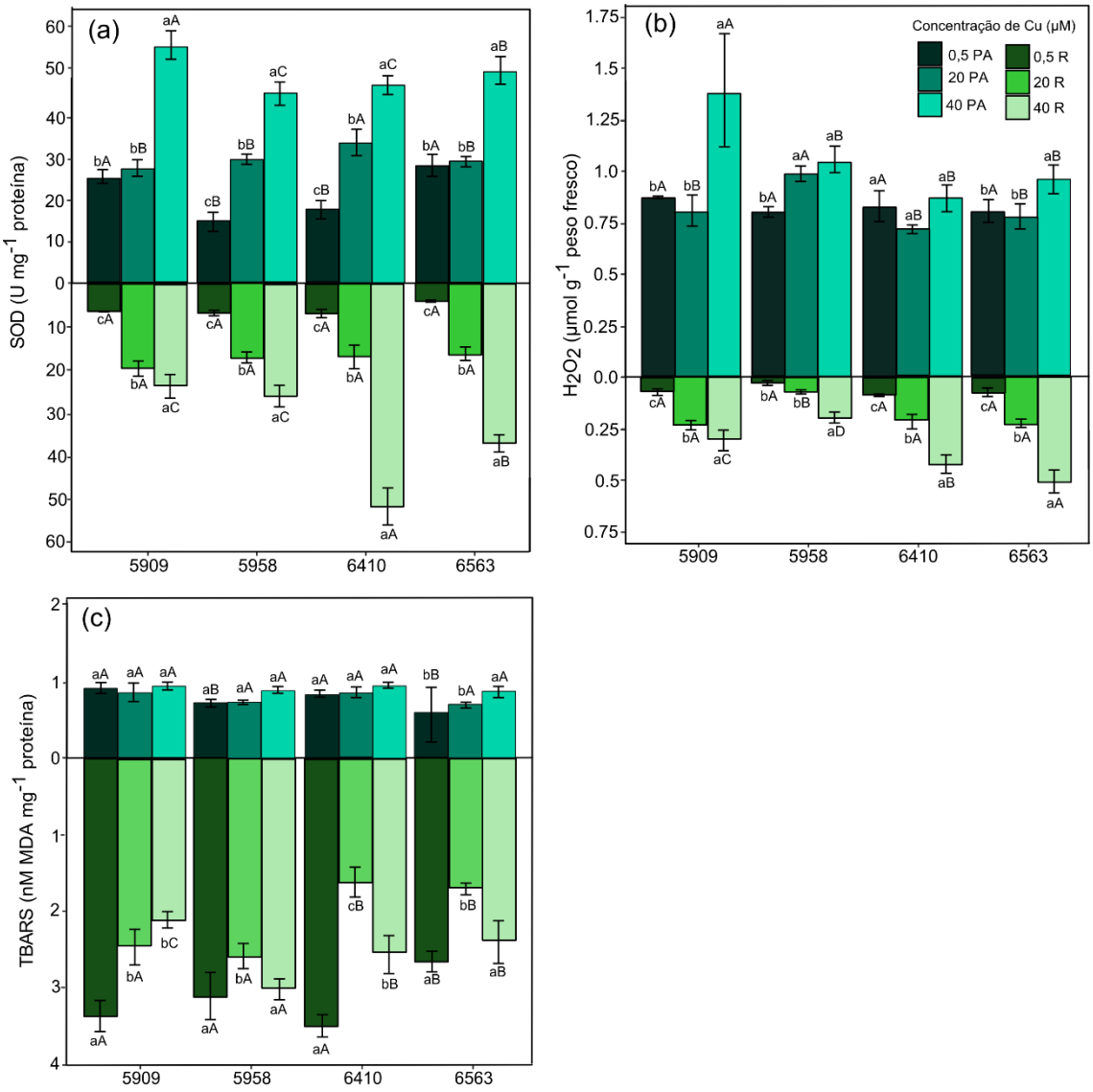
Na presença de baixa concentração de Cu (0,5 µM) observou-se a menor atividade das enzimas SOD em todas as parte aéreas e raízes das cultivares de soja. Aumentando a

concentração de Cu na solução para 20 e 40 µM, a atividade das enzimas SOD também aumentou, apresentando, na maioria das vezes, maior atividade na parte aérea em comparação às raízes. As cultivares não diferiram entre si para a atividade das enzimas SOD nas raízes nas concentrações 0,5 e 20 µM de Cu. Mas, na presença de 40 µM de Cu, a cultivar 6410 apresentou a mais alta atividade das enzimas SOD nas raízes, em comparação com as outras cultivares (Figura 3 a).

Na presença de 0,5 µM de Cu, as cultivares não apresentaram diferença entre si para as concentrações de H_2O_2, tanto nas raízes quando na parte aérea. Na concentração de 40 µM de Cu, as concentrações de H_2O_2 nas raízes e parte aérea foram em geral maiores em comparação ao controle. A cultivar 5909 diferenciou-se das demais, apresentando a maior concentração de H_2O_2 na parte aérea. As cultivares 6563 e 5958 apresentaram, a maior e menor concentração de H_2O_2 nas raízes, respectivamente (Figura 3 b).

As concentrações de malondialdeído (MDA) na parte aérea apresentaram diferenças apenas para a cultivar 6563, que aumentou em 45% quando cultivada em 40 µM de Cu, em comparação ao controle. As raízes das plantas cultivadas na presença de 20 µM de Cu apresentaram diminuição nas concentrações de MDA, em comparação com o controle (Figura 3 c).

Figura 3 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (a), concentração de peróxido de hidrogênio (b) e concentração de malondialdeído (c) em cultivares de soja (5909, 5958, 6410 e 6563) cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Cu e parte da planta. Letras minúsculas indicam comparação entre concentrações para uma mesma cultivar e parte da planta (P<0.05). As barras verticais representam ± desvio padrão.

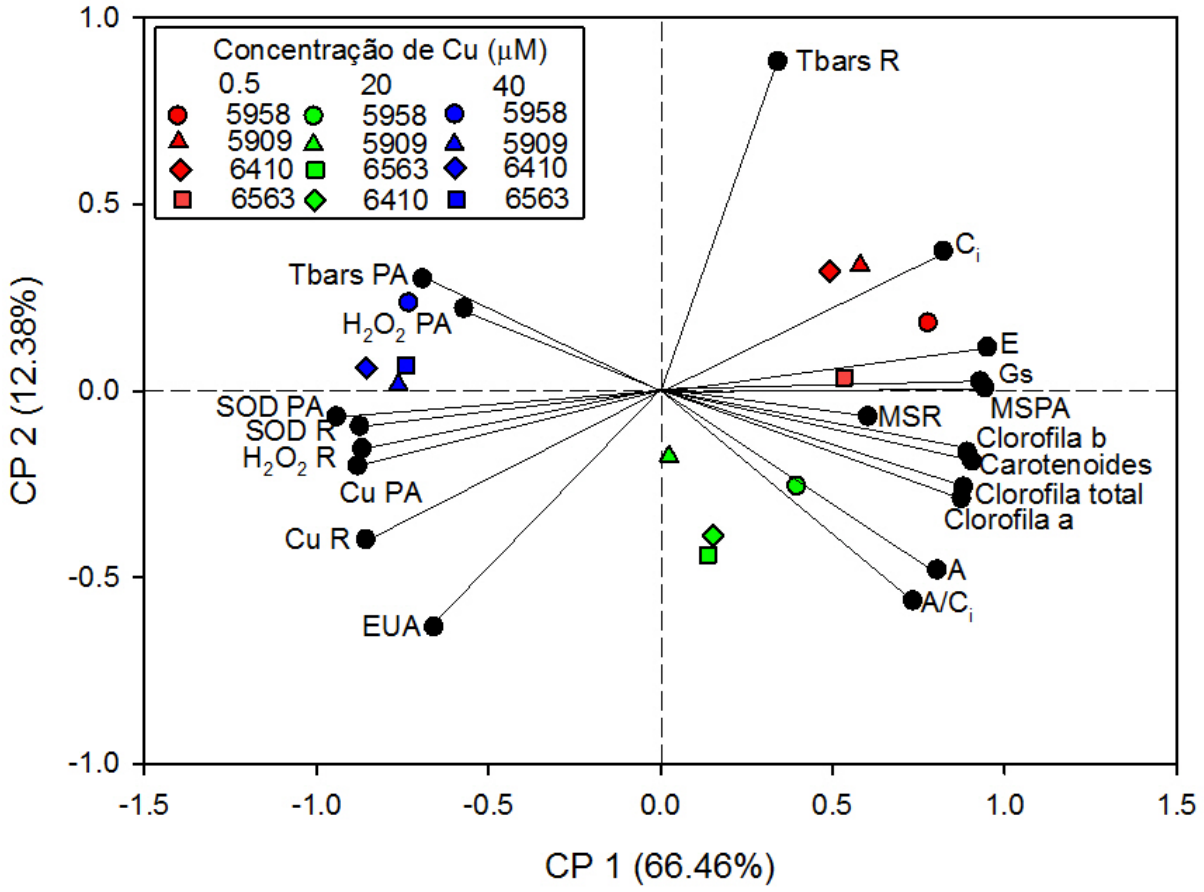


3.3.5 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (ACP) demonstrou que a soma da variabilidade dos componentes explicam 78,84% da variabilidade dos resultados originais (Figura 4 a). Deste total, 66,46% foi explicado pelo componente principal 1 (CP1) e 12,38% pelo componente proncipal 2 (CP 2). A distribuição dos pontos em cada grupo no CP 1 está relacionada com as concentrações de Cu, separando as concentrações 0,5 e 20 µM de Cu em

relação ao tratamento com 40 µM de Cu. Para esta separação, as variáveis mais influentes no grupo das concentrações 0,5 e 20 µM de Cu foram a concentração dos pigmentos e as variáveis fotossintéticas (exceto *EUA*), a massa seca e a concentração de MDA nas raízes (TBARS raízes). No grupo da maior concentração de Cu, as variáveis com maior contribuição foram a concentração de Cu nos tecidos, a atividade das enzimas SOD e a concentração de H_2O_2 na raízes e parte aérea, concentração de MDA na parte aérea (TBARS PA) e *EUA* (Figura 4).

Figura 4 - Relação entre o componente principal 1 (CP 1) e o componente principal 2 (CP 2) dos parâmetros fotossintéticos (A, A/C_i, E, EUA, G_s e C_i), concentração de clorofilas a, b, total e de carotenoides, massa seca (MSPA e MSR) concentração de Cu nas raízes e parte aérea (Cu R e Cu PA), atividade das enzimas superóxido dismutase nas raízes e parte aérea (SOD R e SOD PA), concentração de peróxido de hidrogênio nas raízes e parte aérea (H_2O_2 R e H_2O_2 PA) e peroxidação lipídica nas raízes e parte aérea (Tbars R e Tbars PA), de cultivares de soja 5909, 5958, 6410 e 6563 para as três concentrações de Cu na solução nutritiva (0,5; 20 e 40 µM de Cu).



3.4 DISCUSSÃO

As concentrações de Cu observadas nas plantas de soja cultivadas em 40 µM de Cu podem ser consideradas tóxicas (KABATA-PENDIAS, 2011) e apresentaram correlação

negativa com a produção de massa seca (Figura 4). A menor produção de MSPA obtida em 40 µM de Cu (Tabela suplementar) pode ser atribuída à menor fotossíntese (A) (Figura 2 a), conforme sugerido também por Cambrollé et al. (2013). Isso porque, a elevada concentração de Cu na parte aérea pode causar o comprometimento dos processos fotossintéticos (ZHANG et al., 2014), impedindo o fluxo de elétrons na fase fotoquímica, alterando a composição das membranas dos tilacóides e dos pigmentos fotossintéticos, e ainda, causando a inibição da síntese ou atividade de enzimas do ciclo de Calvin (GONZÁLEZ-MENDOZA et al., 2013; JOHN et al., 2009).

Para a concentração de 20 µM de Cu, onde não ocorreu a diminuição na taxa fotossintética das cultivares 5958, 5909 e 6410, a diminuição na produção de MSPA pode estar relacionada à adoção de mecanismos de tolerância ao excesso de Cu para os quais tenha ocorrido a destinação dos produtos fotossintéticos em detrimento do crescimento (BAZIHIZINA et al., 2015), tais como a síntese de ligantes de metais, para sequestrar o excesso de Cu no citoplasma da célula e/ou, a compartimentalização do metal no vacúolo (HALL, 2002). Além disso, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) também pode ser responsável pela diminuição da produção de massa seca, devido à correlação negativa que a concentração de H_2O_2 apresentou com MSR e MSPA (Figura 4). Isso é baseado no princípio de que os organismos podem mobilizar suas reservas de energia para suportar condições de estresse, tais como processo de detoxificação com consequentes custos em funções biológicas como o crescimento (CALOW, 1991).

A concentração de Cu nos tecidos aumentou proporcionalmente com a presença do metal na solução nutritiva (Figura 1). Além disso, esse aumento foi superior nas raízes do que na parte aérea das plantas. Isso é devido a imobilização do Cu por carboidratos extracelulares na parede celular das raízes, que faz com que menos íons permaneçam livres no citoplasma para serem transportados para a parte aérea (LASAT, 2002). Essa restrição da translocação do Cu para a parte aérea parece ser uma estratégia de sobrevivência das plantas, buscando manter menor concentração do metal nos órgãos mais sensíveis fotossinteticamente, e acumulando o excesso nos órgãos menos sensíveis, tais com as raízes (YANG et al., 2011). As cultivares 6563 e 6410 apresentaram maior capacidade de acumular Cu nas raízes (Figura 1), sem ocorrer diminuição na produção de massa seca das raízes (Tabela 1). Por outro lado, essas plantas apresentaram diminuição na produção de MSPA com o excesso de Cu no meio (Tabela Suplementar). Isso ocasionou o aumento da relação de MSR/MSPA em excesso de Cu. Segundo Zhang et al. (2014), esse aumento na relação de MSR/MSPA pode ser um

mecanismo que busca melhorar a absorção de outros nutrientes ou algum outro recurso limitante devido à presença do Cu.

A presença de 20 µM de Cu ocasionou um aumento na taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e na eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/C_i) para as cultivares 5909, 5958 e 6410, mesmo ocorrendo pequena restrição na condutância estomática (G_s) e diminuição da concentração interna de CO_2 (C_i) (Figura 1). Isso pode ser atribuído ao papel que o metal desempenha no transporte de elétrons na fotossíntese como componente da plastocianina (YRUELA, 2013). Além disso, baixas concentrações de Cu no meio podem estimular a evolução do oxigênio no PSII e, por consequência, o fluxo de elétrons (BURDA et al., 2002). A cultivar 6563 foi a única que apresentou redução em A para a concentração de 20µM de Cu (Figura 2 a), o que pode estar relacionado ao grande acúmulo de Cu na parte aérea (Figura 1), uma vez que essas variáveis apresentaram correlação negativa (Figura 4). Essa concentração de Cu pode ter potencializado a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), comprometendo indiretamente o aparato fotossintético pela inibição do reparo de proteínas fundamentais do PSII (MURATA et al., 2007).

A diminuição de G_s nas maiores concentrações de Cu possivelmente é responsável pela diminuição na taxa transpiratória (E), uma vez que apresentaram alta correlação positiva (Figura 4). Com menor condutância estomática, a perda de água é reduzida e, por consequência, ocorre um aumento na eficiência de uso da água (EUA), como observado para as concentrações de 20 e 40 µM de Cu em relação ao controle (Figura 2). Por outro lado, a diminuição observada em G_s não aparenta ser a principal causa para a diminuição em A e em A/Ci na presença de 40 µM de Cu, uma vez que C_i manteve aproximadamente 90% do valor verificado no tratamento controle. Portanto, outro fator é responsável por essa diminuição da fotossíntese. Isso pode ter acontecido por causa da menor concentração de pigmentos fotossintéticos (Tabela 2) ou pela formação de EROS devido à presença de excesso de Cu (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015), uma vez que essas variáveis apresentaram correlação positiva e negativa, respectivamente com a fotossíntese (Figura 4).

O efeito tóxico que a concentração elevada de Cu (40 µM) causou sobre as concentrações dos pigmentos fotossintéticos pode ser devido à (i) alterações na composição dos tilacóides (JOHN et al., 2009); (ii) peroxidação das membranas do cloroplasto, através da formação de EROs (GILL; TUTEJA, 2010); e (iii) formação de complexos entre o metal e o pigmento (BAZIHIZINA et al., 2015) como a substituição do Mg pelo Cu na molécula de clorofila (KÜPPER et al., 2002). Além disso, os carotenoides são pigmentos que, além da absorção de luz como pigmentos acessórios nos complexos de captação de luz, também atuam

exercendo ação fotoprotetora do aparato fotoquímico, prevenindo danos foto-oxidativos às moléculas de clorofila (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Portando, pode-se sugerir que a diminuição da concentração de clorofilas na presença de 40 µM de Cu (Tabela 2) também podem resultar, em parte, da diminuição da concentração de carotenoides (Tabela 2).

Nesse estudo, nos tratamentos de 20 e 40 µM de Cu houve aumento na atividade das enzimas SOD (Figura 3 a), que pode ser devido a um aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$, pois a SOD é responsável pela sua detoxificação e constitui a primeira linha de defesa da célula contra as EROs (THOUNAOJAM et al., 2012). A atividade das enzimas SOD apresentou correlação positiva com a concentração de Cu (Figura 4). Isso aconteceu porque a SOD, bem como outras enzimas antioxidantes, tem geralmente sua atividade aumentada sob condições de altas concentrações de Cu (ZHANG et al., 2010). A maior atividade das enzimas SOD na parte aérea, quando comparada às raízes, pode ter relação com as isoformas de SOD (SOD Cu/Zn e SOD Fe) presentes nos cloroplastos (PILON; RAVET; TAPKEN, 2011).

As concentrações de H_2O_2 aumentaram progressivamente em ambas parte aérea e raízes da maioria das cultivares (Figura 3 b). Resultados semelhantes foram observados por Thounaojam et al. (2012), o que demonstra que possivelmente o acúmulo de Cu na planta ocasionou o aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ e na atividade das enzimas SOD e, consequentemente, um aumento nas concentrações de H_2O_2, como pode ser observado pela correlação positiva que essas variáveis apresentaram (Figura 4). Para a cultivar 6410, possivelmente, alguma outra linha de defesa do sistema antioxidante, tais como a atividade da catalase ou de peroxidades tenham agido na detoxificação do H_2O_2 na parte aérea das plantas (CHOUDHARY et al., 2007; GILL; TUTEJA, 2010). A concentração de EROs nas plantas aparentemente não causou a peroxidação das membranas, de acordo com as concentrações de malondialdeído (MDA) detectados na parte aérea das cultivares 5958, 5909 e 6410 (Figura 3 c). Resultados semelhantes foram observados por Chen et al. (2015), que os associaram com o baixo transporte do Cu das raízes para a parte aérea. O mesmo não é válido para a cultivar 6563 que apresentou elevada concentração de MDA na parte aérea na presença de 40 µM de Cu (Figura 3 c), indicando que possa ter ocorrido peroxidação lipídica. Possivelmente, a detoxificação do H_2O_2 não tenha sido eficiente e na presença de Cu ocorreu a formação de $OH^{\bullet}$ através da reação de Fenton (GILL; TUTEJA, 2010).

3.5 CONCLUSÕES

Elevadas concentrações de Cu na solução nutritiva foram prejudiciais para a fisiologia das plantas de soja, e embora essa resposta tenha sido diferente para cada cultivar, nenhuma cultivar apresentou tolerância ao excesso de Cu.

Na presença de 40 µM de Cu, a cultivar M 6410 IPRO foi menos afetada pelo excesso de Cu, mantendo a mais alta taxa fotossintética dentre as cultivares, e acumulando grandes quantidades de Cu nas raízes, sem que a produção de massa seca radicular fosse comprometida.

A cultivar DM 6563 RSF IPRO mostrou resultados semelhantes à M 6410 IPRO, entretanto, sua taxa fotossintética diminuiu mais, além de apresentar dano oxidativo na parte aérea.

A cultivar NA 5909 RG apresentou a maior translocação de Cu para a parte aérea, entretanto, o sistema antioxidante da planta evitou que o Cu na parte aérea causasse peroxidação lipídica.

A cultivar DM 5958 RSF IPRO mostrou-se a mais sensível ao excesso de Cu, reduzindo drasticamente sua taxa fotossintética e sua produção de massa seca.

REFERÊNCIAS

BAZIHIZINA, N. et al. Photosynthesizing on metal excess: Copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. populations. **Plant Science**, v.232, p. 67–76, 2015.

BECANA, M. et al. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. **New Phytologist,** v.188, p.960–97, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Plant Physiology and Biochemestry**, v.72, p.248–254, 1976.

BRUNETTO, G. et al. Frações de cobre e zinco em solos de vinhedos no Meio Oeste de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p.805-10, 2014.

BURDA, K. et al. Stimulation of oxygen evolution in photosystem II by copper. **Journal of Biosciences**, v.57, p.853–857, 2002.

CALOW, P. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications**.** **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.100, p.3–6, 1991.

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

CAMPOS, L. P. et al. Estoques e frações de carbono orgânico em Latossolo Amarelo submetido a diferentes sistemas de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.304-312, 2013.

CHEN, J. et al. Copper induced oxidative stresses, antioxidant responses and phytoremediation potential of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Scientific Reports,** v.5, p.1-9, 2015.

CHOUDHARY, M. et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. E**cotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.204–209, 2007.

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

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Manual de análises químicas de solos plantas e fertilizantes** (Manual of chemical analysis of soils, plants and fertilizers), 2. ed. Brasília, 627p, 2009.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Clima Temperado. (Pelotas, RS). **Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina.** Safras 2014/2015 e 2015/2016**,** 40ª Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul. 124p. (Documentos/Embrapa Clima Temperado, ISSN 1516-8840;382), 2014.

FELLET, G. et al. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. **Ecological Engineering**, v.31, p.207-214, 2007.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants, **Plant Physiol**. v.59, p.309–314, 1977.

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

GIROTTO, E. et al. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.93, p.145-155, 2013.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D. et al. Copper Stress on Photosynthesis of Black Mangle (*Avicennia germinans*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v.85, p.665-670, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and medicine**, 5ed. Reino Unido, Oxford University Press, 2015.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 53, p. 1–11, 2002.

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

JOHN, R. et al. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. **International Journal of Plant Production**, v.3, p.65–75, 2009.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. CRC Press, 4 ed. Boca Raton, Florida, cap 5. 2011.

KÜPPER, H. et al. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **Journal of Phycology**. v.38, p.429–441, 2002.

LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.109-120, 2002.

LE, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v.25, p.1-18, 2008.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Method 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, p.1781– 1787, 2001.

MASSOCATTO, C. L. et al. Quantificação de elementos potencialmente tóxicos presentes em diferentes cultivares de grãos de soja e milho comercializados na região Noroeste do Paraná**. Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, p.182-192, 2013.

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, p.593–610, 2014.

MURAKAMI, M.; AE, N. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Hazardous Materials**, v.162, p. 1185-1192, 2009.

MURATA, N. et al. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta,** v.1767, p.414-421, 2007.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F. Phytoremediation of metals: tolerance mechanisms against oxidative stress. **Minerva Biotechnology**, v.13, p.23–83, 2001.

PIERZYNSKI, G. M. et al. Vegetative Remediation at Superfund Sites. In: HESTER, R. E.; HARRIZON, R. M. **Mining and its Environmental Impact** (Royal Soc. Chem. Issues in Environ. Sci. Technol. 1). p. 49-69, 1994.

PILON, M.; RAVET, K.; TAPKEN, W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutase. **Biochimica et Biophysica Acta,** v.1807, p.989–998, 2011.

PINHEIRO, J. et al. R Core Team (2017). **_nlme:** Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_. R package version 3.1-131, <URL: https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 728p., 2007.

R CORE TEAM. **R:** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/. 2017.

RNC – REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php Acesso em: 12 dez. 2016.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. **Environmental and Experimental Botany**, v.84, p.52–60, 2012.

SŁOMKA, A. et al. Metalliferous and non-metalliferous populations of Viola tri-color represent similar mode of antioxidative response. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.1610–1619, 2008.

SOTO, P.; GAETE, H.; HIDALGO, M. E. Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-a, and growth rate in the freshwater green algae Pseudokirchneriella subcapitata exposed to copper and zinc. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v.39, p.280-285, 2011.

THOUNAOJAM, T. C. et al. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.53, p.33-39, 2012.

YANG, Y. et al. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* "Combier") to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.1483–1491, 2011.

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

ZHANG, H. X. et al. Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of Elsholtzia haichowensis through apoplastic and symplastic Cu Zn-superoxide dismutase. **Journal of Hazardous Materials**, v.178, p.834-843, 2010.

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

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, p.527–533, 2004.

ZOUARI, M. et al. Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). E**cotoxicology and Environmental Safety**, v.128, p.100–108, 2016.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar - Massa seca de parte aérea de duas plantas de soja cultivadas em três concentrações de Cu (0,5, 20 e 40 µM) em solução nutritiva.

Concentração de Cu (µM)	Massa seca de parte aérea (g)
0,5	2,07 a*
20	1,76 b
40	1,26 c

*Os valores representam a média das cultivares NA 5909 RG, DM 5958 RSF IPRO, M 6410 IPRO E DM 6563 RSF IPRO para cada concentração de Cu.

4 MANUSCRITO II

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SOJA (*Glycine max* (L.) MERRILL) CULTIVADA EM SOLO CONTAMINADO POR CU COM ESTRUTURA INDEFORMADA E DEFORMADA

RESUMO

Devido ao histórico de 35 anos de aplicação de fungicidas cúpricos em videiras ao longo de vários anos ocorreu o aumento do conteúdo de cobre (Cu) em solos de vinhedos. Consequentemente, verifica-se um decréscimo na produtividade dos vinhedos antigos, e por essa razão estes são erradicados. No momento do reimplante de um novo vinhedo, o solo é mobilizado, o que potencializa a oxidação da matéria orgânica do solo (MOS), especialmente em solos como os da Campanha Gaúcha, que apresentam baixa proteção física à MOS. Isso leva ao aumento na disponibilidade de Cu no solo, o que tem se mostrado tóxico para plantas jovens de videira. Dessa forma, o uso de culturas anuais, como a soja, depois da erradicação dos vinhedos, pode fitoextrair ou fitoestabilizar o Cu no solo diminuindo o seu potencial toxidez. Além disso, a soja pode fixar N_2 atmosférico, incrementando a disponibilidade de N no solo, o que é importante em solos com baixo teor de matéria orgânica. O objetivo do estudo foi avaliar respostas fisiológicas da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill**)** cultivada em solo com estrutura deformada e indeformada, contaminado com Cu. Amostras de um Argissolo Vermelho foram coletadas com estruturas deformadas e indeformadas em um vinhedo com histórico de 35 anos de aplicações de fungicidas cúpricos, e em uma área de campo natural, adjacente ao vinhedo. O solo do campo natural foi submetido à calagem, adubação e incubação. Sementes de duas cultivares de soja (DM 5958 RSF IPRO e M 6410 IPRO) foram inoculadas e semeadas no solo. Trocas gasosas da folha, concentração de pigmentos fotossintéticos, enzimas antioxidantes tais como superoxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD), concentração de H_2O_2, peroxidação lipídica (TBARS), concentração de Cu nas folhas e massa seca foram avaliadas. Para a estrutura indeformada, o solo de vinhedo foi mais prejudicial sobre a fisiologia das plantas do que o solo de campo natural. O revolvimento do solo mostrou-se prejudicial às plantas em comparação ao solo com estrutura indeformada, mas essa resposta ocorreu em ambos os tipos de solo (vinhedo e campo natural) mostrando que o efeito negativo do revolvimento não está relacionado somente ao aumento da disponibilidade de Cu no solo. Isso pode ser devido às perdas de C e N através de CO_2 e NH_3 pela oxidação da MOS, levando à alterações na composição da microbiota do solo e dessa forma interferindo na disponibilidade de nutrientes do solo.

Palavras-chave: Metal Pesado. Fotossíntese. Estresse Oxidativo. Sistema de Manejo do Solo.

ABSTRACT

Due to the historical application of copper (Cu) fungicides in vines over several years, copper content in vineyards soils has increased. Over the years, the grape yield from old vineyards decreases, and because of that, they have been eradicated. At the moment of the reimplantation of a new vineyard, the soil is mobilized, which increases soil organic matter (SOM) oxidation, especially in soils such those from Campanha Gaúcha, which present low physical protection to the SOM. This leads to increased availability of Cu in soil, which was toxic to young vine plants. Thus, after vineyard eradication, the using of annual crops, such as

soybean, can phytoextract or phytostabilize Cu in the soil, reducing its toxicity to plants. In addition, soybean can fix atmospheric N_2, increasing the N availability in soil, which is important in soils with low organic matter content. The objective of this study was to evaluate physiological responses of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivated in disturbed and undisturbed soils contaminated with Cu. Samples of a Red Argisol were collected with disturbed and undisturbed in 1) a vineyard that continuously received fungicide applications in the last 35 years, and in 2) a natural field area, adjacent to the vineyard. The natural field soil was submitted to liming, fertilization and incubation. Seeds of two soybean cultivars (DM 5958 RSF IPRO and M 6410 IPRO) were inoculated and sown in the soil. The evaluated variables were leaf gas exchange with the environment, photosynthetic pigments concentration, antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and guaiacol peroxidase (POD), H_2O_2 concentration, lipid peroxidation (TBARS) and, Cu concentration in leaves and dry mass. The vineyard soil with undisturbed structure was more harmful to variables considered in this study than the natural field soil with undisturbed structure. Soil with deformed structure was harmful to plants compared to soil with undisturbed structure, however, this response occurred in both soil conditions (vineyard and natural field), showing that the negative effect of tillage was not only related to the increase of Cu availability in soil. This can be due to the losses of C and N through CO_2 and NH_3 by the oxidation of SOM, leading to changes in the composition of soil microorganisms and thus interfering in the availability of soil nutrients.

Key-words: Heavy metal. Photosynthesis. Oxidative stress. Soil Management System.

4.1 INTRODUÇÃO

O uso prolongado de fungicidas com cobre (Cu) na sua composição, como a calda bordalesa ($CuSO_4$ $5H_2O$ + $Ca(OH)_2$) utilizada para o controle de doenças fúngicas em videiras (*Vitis* sp.), vem ocasionando o acúmulo de Cu no solo, principalmente nas camadas superficiais (BRUNETTO et al., 2014). Nessa porção de solo, o Cu permanece, sobretudo, ligado à matéria orgânica (MOS) (BRUN et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2005). A disponibilidade de Cu no solo também é dependente dos grupos funcionais de partículas reativas do solo como óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de Fe e Al, bem como da CTC e do pH do solo (MIOTTO et al., 2017). Dessa forma, os solos da região da Campanha Gaúcha, que são arenosos, possuem baixo teor de MOS e predomínio de argilominerais 1:1, apresentam baixa capacidade de adsorção de Cu no solo (BRUNETTO et al., 2014).

Devido à diminuição na produtividade das videiras, que ocorre com o passar dos anos, o vinhedo necessita ser erradicado. Para isso, realiza-se o revolvimento do solo, o que potencializa a oxidação da MOS, aumentando a disponibilidade de Cu no solo (CAMPOS et al., 2013). Além disso, o revolvimento do solo pode provocar mudanças na composição da microbiota do solo (FIERER et al., 2012). As plantas jovens de videira cultivadas nesses solos demonstram crescimento reduzido nas raízes e brotos, clorose foliar e acumulação de Cu nas

raízes (MIOTTO et al., 2014). Por essa razão, o uso de plantas anuais, como a soja, é uma alternativa para promover a redução gradual dos níveis de contaminação através da fitoestabilização do Cu (MEURER, 2012). Além disso, a soja, como uma leguminosa fixadora de N_2, pode contribuir para o incremento do conteúdo de N disponível no solo (CONRAD et al., 2018; WHITING et al., 2004), além de gerar uma renda financeira alternativa. Entretanto, estudos sobre as respostas fisiológicas da soja ao excesso de Cu em solos contaminados ainda são escassos (SILVA; VITTI; TREVIZAM, 2014), bem como a influência do manejo de preparo desses solos sobre o estabelecimecimento da cultura.

O Cu, apesar de ser um micronutriente, quando presente em excesso no solo, pode causar danos fisiológicos e bioquímicos às plantas, comprometendo o seu crescimento e desenvolvimento (GIROTTO et al., 2013). O excesso de Cu pode causar (i) alteração na composição das membranas do cloroplasto e dos pigmentos fotossintéticos, comprometendo a atividade fotossintética da planta (GILL; TUTEJA, 2010), (ii) desequilíbrios nutricionais nas plantas, (iii) danos no aparato fotossintético, interrompendo o fluxo de elétrons na cadeia transportadora (CAMBROLLÉ et al., 2013), e (iv) danos oxidativos devido ao desbalanço entre a atividade do sistema antioxidante da planta e a produção de espécies reativas de oxigênio (GILL; TUTEJA, 2010). Como consequência, o alto teor de Cu no solo pode prejudicar o incremento da massa seca das plantas, retardando seu crescimento (OLIVEIRA et al., 2015). O estudo objetivou avaliar respostas fisiológicas da cultura da soja cultivadas em solo com estrutura deformada e indeformada, contaminado com Cu.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta de solo

Amostras de um Argissolo Vermelho (EMBRAPA, 2013), Typic Hapludalf (SOIL SURVEY STAFF, 2006) foram coletadas em um vinhedo com 35 anos de cultivo e histórico de aplicação de, aproximadamente, 10 kg Cu ha^{-1} ano^{-1} via fungicidas cúpricos. Coletou-se também, solo de um campo natural, localizado em uma área adjacente ao vinhedo. O clima da região é subtropical úmido (Cfa), segundo a classificação de Köppen, com média pluviométrica de 1388 mm ano^{-1}, e temperatura média anual de 18,4 °C, sendo 24,6°C a temperatura média do mês mais quente (IPAGRO, 1989).

Os solos de vinhedo e campo natural foram coletados com estrutura deformada e indeformada. A coleta de solo com estrutura indeformada foi realizada com a inserção manual

de tubos de PVC no solo, acoplados à um coletor de monolito, até 0,40 m de profundidade. A condição de solo indeformado simulou o sistema de semeadura direta. O solo com estrutura deformada foi coletado com o auxílio de uma pá-de-corte e homogeneizado em bandejas, com o intuito de simular o sistema de cultivo convencional. A homogeneização foi realizada nas camadas de 0-0,20 m e 0,20-0,40 m. As características físicas e químicas do solo de vinhedo e campo natural antes da instalação do experimento constam na tabela suplementar.

O solo de campo natural com estrutura deformada referente à camada 0-0,20 m foi separado em sacos plásticos contendo 10 kg de solo cada. Em seguida, foi adicionado 0,7 toneladas ha^{-1} de $CaCO_3$:$MgCO_3$ (relação 2:1), para elevar o pH em água até 6,0, como sugerido pela CQFS-RS/SC (2004). Adicionou-se água destilada para elevar a capacidade de campo à 70%. O solo foi incubado durante 30 dias, e em seguida foi adicionado 110 kg P_2O_5 ha^{-1} na forma de superfosfato triplo (SFT-41% de P_2O_5), para elevar o conteúdo de P em solos com menos de 20% argila acima do nível crítico (CQFS-RS/SC, 2004). A capacidade de campo foi elevada novamente à 70% e o solo foi incubado por mais 30 dias. A cada dois dias os sacos de solo foram abertos, homogeneizados, pesados e, quando necessário, foi adicionado água destilada para manter a capacidade de campo em 70%. O solo de campo natural com estrutura deformada referente à camada 0,20-0,40 m não recebeu aplicação de calcário e P conforme sugerido pela CQFS-RS/SC (2004) para essa profundidade. Posteriormente, os solos foram secos ao ar e dispostos em tubos de PVC (0,2 x 0,45 m). Para isso, inicialmente o solo da camada de 0,20-0,40 m foi acondicionado no interior do tubo, e, em seguida, o solo da camada de 0-0,20 m foi adicionado sobre o solo da camada 0,20-0,40 m no mesmo tubo.

Para o solo de campo natural com estrutura indeformada, a correção da acidez foi realizada em superfície, conforme indicado pela CQFS-RS/SC (2004) para o cultivo em sistema de semeadura direta. Para isso, adicionou-se a mesma dose de calcário (0,7 toneladas ha^{-1} de $CaCO_3$ e $MgCO_3$ relação 2:1) utilizada no solo de campo natural com estrutura deformada (CQFS-RS/SC, 2004) e elevou-se a capacidade de campo à 70% utilizando água destilada. Após 30 dias, realizou-se a adubação fosfatada, aplicando 110 kg P_2O_5 ha^{-1} na forma de SFT.

O solo de vinhedo com estruturas deformada e indeformada não recebeu correção da acidez e adubação fosfatada, visto que o pH encontrava-se na faixa considerada ótima para a cultura da soja, e os teores de P estavam acima do nível crítico (CQFS-RS/SC, 2004). O solo de vinhedo com estrutura deformada foi seco ao ar e alocado em canos de PVC (0,2 x 0,45 m), conforme descrito para o solo de campo natural.

4.2.2 Descrição do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, região Sul do Brasil (29°42'56,44" *S* e 53°43'12,57" *W*). A temperatura média interna na casa de vegetação foi 24ºC e umidade relativa do ar de 50%. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições. Sementes de duas cultivares de soja (DM 5958 RSF IPRO e M 6410 IPRO) foram inoculadas com inoculante líquido contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium.* Cinco sementes foram semeadas em tubos de PVC (0,2 m de diâmetro e 0,45 m de comprimento) contendo solo de vinhedo e de campo natural. Após a emergência, foram mantidas 3 plântulas uniformes por unidade experimental. Ao longo do ciclo da cultura, as plantas foram irrigadas com água destilada e os tratos culturais foram realizados mediante necessidade. As plantas foram cultivadas até o estágio fenológico R8 que corresponde à maturação plena.

4.2.3 Avaliações

4.2.3.1 Trocas gasosas da folha

Aos 45 dias depois da semeadura foram determinados os parâmetros fotossintéticos por meio da medição das trocas gasosas da folha utilizando um analisador de gás por radiação infra-vermelho [Infrared Gas Analyser (IRGA), Mod. Li-COR® 6400 XT] com radiação fotossintética de 1500 μmol m^{-2} s^{-1} e concentração de CO_2 de 400 μmol mol^{-1}. Para a medição foi utilizado o último trifólio completamente expandido de cada planta. Foram determinados a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), a concentração intercelular de CO_2 (Ci), a taxa de transpiração (E), a condutância estomática de vapores de água (Gs), a eficiência do uso da água (EUA), obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e quantidade de água transpirada, e a eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/Ci), obtida pela relação entre quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese e a concentração intercelular de CO_2. As folhas utilizadas para a realização dos parâmetros fotossintéticos foram coletadas e imediatamente congeladas em N líquido e, posteriormente, os tecidos foram macerados e reservados para as análises de concentração de pigmentos fotossintéticos, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD), concentração de H_2O_2 e concentração de malondialdeído (MDA).

4.2.3.2 Concentração de clorofilas e carotenoides

Foram pesados 0,5 g de material vegetal macerado e posteriormente foram incubados durante 5 min à 65 °C em 40 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) até a extração completa dos pigmentos do tecido. A absorbância da solução sobrenadante foi medida em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) nos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm para a determinação da concentração de clorofila a, b e carotenoides, respectivamente, segundo a metodologia proposta por Hiscox e Israeslstam (1979), com auxílio da fórmula de Lichtenthaler (1987). A clorofila total representa a soma dos valores de clorofilas a e b.

4.2.3.3 Atividade das enzimas SOD e POD

Foram pesados 0,5 g de material vegetal macerado e posteriormente foram homogeneizados em 3 mL da solução tampão de fosfato de sódio 0,05 mol L^{-1} (pH 7,8), incluindo 1 mM EDTA e 0,5 % Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado a 13000 *g* durante 20 min à 4ºC em uma centrífuga refrigerada (Sigma, 3-18 K 1029, Brasil). O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática e conteúdo proteico (BRADFORD, 1976; ZHU et al., 2004).

A atividade das enzimas SOD foi determinada através do método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis e Ries (1977). Para a reação foi adicionado em um tubo de ensaio 3 mL do mix, contendo solução tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina (13 mM), EDTA (0,1 µM), NBT (75 µM) e riboflavina (2 µM). Os tubos foram incubados com lâmpadas fluorescentes de 15 watts durante 15 min, sendo então realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) à 560 nm. Para a leitura, os brancos foram compostos de tubos que não continham extrato, exposto e não exposto à luz. Uma unidade de atividade enzimática (U) de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para obter 50% de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibe 50% da reação de NBT e expressa em U mg^{-1} proteína.

A atividade da POD foi mensurada de acordo com a metodologia de Zeraik et al. (2008). A mistura da reação foi composta por 1,0 mL de tampão fosfato de potássio com pH 6,5 (100 mM), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H_2O_2 (3 mM). Depois de homogeneizada foi adicionado 50 uL de extrato vegetal à solução. A oxidação do guaiacol à

tetraguaiacol foi mensurado através do aumento da absorbância em 470 nm em espectrofotômetro (Femto, 800 XI, Brasil).

4.2.3.4 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com Loreto; Velikova (2001). Para isso, foram pesados 0,1 g do material vegetal e homogeneizados em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado à 12.000 *g* por 15 min à 4 ºC e 0,5 mL do sobrenadante foi retirado. O sobrenadante foi adicionado em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (10 mM) (pH 7,0) e 1 mL de KI (1M). A absorbância dessa solução foi medida em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) à 390 nm.

4.2.3.5 Peroxidação lipídica

Para a determinação da peroxidação lipídica foi utilizada a metodologia proposta por El-Moshaty et al. (1993), onde determina-se as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos vegetais, de acordo com o acúmulo de MDA, como produto final da peroxidação lipídica. Para isso foram homogeneizados 0,5 g de amostra em 4,0 mL de tampão fosfato citrato TFK 0,2 M (pH 6,5), e centrifugados em centrífuga refrigerada (Sigma, 3-18 K 1029, Brasil) à 4 ºC durante 15 min em 20000 *g*. Para a determinação de TBARS foram coletadas alíquotas de 1,5 mL do sobrenadante ao qual foi adicionado um volume igual de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria à 95 ºC durante 40 minutos, sendo a reação paralisada em banho de gelo por 15 min. Após, as amostras foram centrifugadas à 10000 *g* durante 5 minutos e foi determinada a absorbância em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) à 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica à 600 nm.

4.2.3.6 Concentração de Cu e produção de massa seca

O terceiro trifólio maduro do terço superior da haste principal de cada planta foi coletado quando as plantas estavam no estágio R2, segundo a escala de Fehr et al. (1971), conforme proposto pela CQFS-RS/SC (2004) para a determinação de nutrientes no tecido. As folhas foram secas à 65 °C até massa constante, moídas em moinho do tipo Willey. O tecido

foi passado em peneira com malha de 2 mm e submetido à digestão nitroperclórica (EMBRAPA, 2009). Para isso, 0,250 g de massa seca foram acondicionados em tubos de digestão. Em seguida, 4 mL de solução nitroperclórica (3:1) foram adicionados em cada tubo de digestão. O extrato permaneceu em repouso por 12 horas e posteriormente foi digerido à 175 ^{o}C até mineralização completa. A concentração de Cu no extrato foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, A Analyst 200, Estados Unidos).

Quando as plantas encontravam-se no estágio fenológico R8, que corresponde à maturação plena, a parte aérea das plantas foi seccionada no nível do solo. No mesmo momento, as colunas de solo foram cortadas longitudinalmente e as raízes foram separadas do solo com o auxílio de uma peneira. As raízes foram lavadas em água destilada para remoção do solo aderido à superfície e foram secas em papel absorvente. A parte aérea e as raízes foram acondicionados em sacos de papel e secas em estufa com ventilação forçada de ar à 65 °C até a obtenção de massa constante. Para a determinação da massa seca de raiz (MSR) e da massa seca de parte aérea (MSPA) utilizou-se uma balança de precisão (Shimadzu, AY220, Filipinas).

4.2.4 Análise estatística

Para todas as variáveis analisadas, um modelo linear misto foi ajustado, considerando estrutura do solo (deformada e indeformada), origem do solo (vinhedo ou campo natural) e a interação entre esses fatores como efeito fixo, e as cultivares como efeito randômico. A normalidade dos resíduos foi testada através do teste de Shapiro-Wilk e o modelo foi ajustado com variâncias homogêneas e heterogêneas para os diferentes fatores. Os diferentes modelos (homocedásticos e heterocedásticos) foram selecionados baseados no critérios de informação de Akaike (AIC) e no critério de informação Bayesiano (BIC). Todos os modelos foram ajustados usando o pacote "nlme" (PINHEIRO et al., 2017) do ambiente estatístico R (R CORE TEAM, 2017). Quando os tratamentos foram significativos, com nível de significância menor que 0,05 a comparação de médias foi realizada usando o teste de Tukey.

Uma análise de componentes principais (ACP) foi realizada para verificar a estrutura de correlação e o grau de associação das diferentes variáveis. Este tipo de análise permite a identificação de associações mais complexas entre as variáveis avaliadas e identificação daquelas com maior contribuição para as diferenças entre os tratamentos avaliados nesse estudo. Apenas componentes com autovalores maiores que 1 foram consideradas. A ACP foi realizada usando o pacote “FactoMineR” (LE; JOSSE; HUSSON, 2008). De maneira

complementar a ACP, uma análise de componentes da variância foi realizada através do pacote “varComp” (QU, 2017), para verificar qual fonte de variação conhecida teve maior explicação na variabilidade de cada uma das variáveis resposta. Através dessa análise foi observado que a cultivar não apresentou grande influência para nenhuma variável analisada (Figura suplementar), bem como respostas pouco expressivas na ACP (Figura 1 b) e, por essa razão, cultivar foi considerada como efeito randômico, para evitar interações triplas mais complexas para desdobramento.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise de componentes da variância e ACP

Considerando as fontes de variações individuais conhecidas nesse estudo (estrutura de solo, origem de solo e cultivar), o fator estrutura de solo explicou majoritariamente a variabilidade de todas as variáveis, exceto para TBARS e concentração de Cu nas folhas, onde o efeito de origem de solo foi responsável pela explicação da maior porcentagem da variância (Figura suplementar). Para a ACP, apenas os dois primeiros componentes foram extraídos, os quais juntos explicaram 72,4% da variabilidade total dos dados. O componente principal 1 (CP1) explicou 60,2% da variabilidade, com maior influência dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas a, b, total e carotenoides) e massa seca de raiz, os quais foram positivamente correlacionados entre si, e da concentração de H_2O_2 e atividade das enzimas SOD, as quais apresentaram correlação negativa com as variáveis citadas anteriormente (Figura 1). O componente principal 2 (CP2) explicou 12,2% da variabilidade e foi primariamente influenciado pela condutância estomática de vapores de água (Gs) (Figura 1). Houve uma diferenciação evidente entre as estruturas de solo deformada e indeformada na ACP (Figura 1 d), concordando com a análise de componentes da variância que demonstrou que esse fator explicou grande parte da variabilidade das variáveis consideradas neste estudo (Figura suplementar).

4.3.2 Trocas gasosas da folha

Os valores de taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) e a eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/Ci) foram maiores nas plantas cultivadas no solo de campo natural com estrutura indeformada (Figura 2 a, b). O solo com estrutura indeformada proporcionou

maiores valores para A e A/Ci em relação ao solo com estrutura deformada, independentemente da origem do solo ser de vinhedo ou de campo natural (Figura 2 a, b). A concentração intercelular de CO_2 (C_i) e a taxa transpiratória (E) foram maiores nas plantas cultivadas no solo com estrutura deformada em relação às plantas cultivada no solo com estrutura indeformada (Figura 2 c, d). Os valores de eficiência de uso da água (EUA) foram maior nas plantas cultivadas no solo com estrutura indeformada em relação às plantas cultivadas no solo com estrutura deformada (Figura 2 e).

4.3.3 Pigmentos fotossintéticos

A concentração de clorofila total foi maior nas plantas cultivadas no solo com estrutura indeformada em relação às plantas cultivadas no solo com estrutura deformada (Figura 3 a). A concentração de clorofila total também foi maior em condições de solo do campo natural em relação ao solo do vinhedo (Figura 3 b). A concentração de carotenoides e de clorofila a foi maior nas plantas cultivadas no solo com estrutura indeformada em relação às plantas cultivadas no solo com estrutura deformada (Figura 3 c, d). A concentração de clorofila b foi maior nas plantas cultivadas em condições de solo de campo natural com estrutura indeformada, além disso, foi maior no solo com estrutura indeformada em relação às plantas cultivadas no solo com estrutura deformada; e maior nas plantas cultivadas no solo de campo natural, em relação as plantas cultivadas no solo de vinhedo (Figura 3 e).

4.3.4 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD)

A atividade das enzimas SOD foi maior nas folhas das plantas cultivadas no solo de vinhedo, em relação às plantas do solo de campo natural, e também foi maior nas plantas cultivadas no solo com estrutura deformada em relação às plantas cultivadas no solo com estrutura indeformada (Figura 4 a, b). A atividade da POD foi maior nas plantas cultivadas no solo de campo natural com estrutura indeformada, sendo sempre maior nas plantas cultivadas no solo com estrutura indeformada em relação às plantas cultivadas no solo com estrutura deformada. Para as plantas cultivadas no solo com estrutura deformada, não houve diferença na atividade da POD entre o solo de vinhedo e de campo natural (Figura 4 c).

4.3.5 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de H_2O_2 nas folhas foi maior nas plantas cultivadas no solo com estrutura deformada em relação às plantas cultivadas no solo com estrutura indeformada, para ambos os solos, de vinhedo e campo natural. Para a estrutura indeformada, as folhas das plantas cultivadas no solo de vinhedo apresentaram maior concentração de H_2O_2 em comparação às plantas cultivadas em solo de campo natural (Figura 4 d).

4.3.6 Peroxidação lipídica

A concentração de MDA nas folhas das plantas cultivadas no solo de campo natural não diferiu estatisticamente entre o tipo de estrutura do solo (Figura 4 e). Para o solo de vinhedo, a concentração de MDA foi maior nas folhas das plantas cultivadas no solo com estrutura deformada. A maior concentração de MDA nas folhas foi observada nas plantas cultivadas no solo de vinhedo com estrutura deformada.

4.3.7 Concentração de Cu e produção de massa seca

A maior concentração de Cu nas folhas foi observada nas plantas cultivadas no solo de vinhedo com estrutura deformada, em comparação às plantas dos demais tratamentos (Figura 5). Além disso, as plantas cultivadas no solo de vinhedo apresentaram maior concentração de Cu nas folhas, comparativamente às plantas cultivadas no solo de campo natural (Figura 5). Nas plantas cultivadas em solo de campo natural, não houve diferença na concentração de Cu nas folhas independente da estrutura de solo (Figura 5). A produção de massa seca de parte aérea foi maior nas plantas cultivadas em solo de campo natural em comparação às plantas cultivadas em solo de vinhedo. As plantas cultivadas em solo com estrutura deformada apresentaram produção de massa seca de parte aérea menor do que as plantas cultivadas em solo com estrutura indeformada (Figura 6 a, b). A produção de massa seca de raízes foi maior nas plantas cultivadas no solo de campo natural com estrutura indeformada. Na estrutura deformada de solo, as plantas cultivadas em solo de vinhedo não diferiram das plantas cultivadas em solo de campo natural para a produção de massa seca de raízes (Figura 6 c).

4.4 DISCUSSÃO

As plantas de soja cultivadas no solo de vinhedo com estrutura indeformada apresentaram, em geral, desempenho fisiológico prejudicado, quando comparadas às plantas

cultivadas no solo de campo natural com estrutura indeformada (Figura 1 a, c, d). Isso pode ter acontecido porque o solo de vinhedo possuía 63 mg Cu kg^{-1}, superior em 35 vezes ao observado no solo de campo natural (1,8 mg Cu kg^{-1}). Devido aos solos utilizados nesse estudo apresentarem baixo teor de matéria orgânica e baixa capacidade de troca de cátions (CTC), eles possuem pouca capacidade de complexação de Cu (BRADL, 2004; McBRIDE, 1994). Dessa forma, grande parte do Cu presente no solo apresenta-se fracamente adsorvido, podendo facilmente ser liberado para a solução do solo para ser absorvido pelas plantas (MIOTTO et al., 2014).

As concentrações de Cu nas folhas das plantas de soja cultivadas no solo de vinhedo foram maiores que àquelas observadas nas folhas das plantas cultivadas no solo de campo natural, em ambas as estruturas de solo (Figura 5). Embora concentrações de Cu na parte aérea inferiores à 20 mg kg^{-1} não sejam consideradas tóxicas para a um grande número de espécies (KABATA-PENDIAS, 2011), concentrações de 12 mg kg^{-1} de Cu que foram observadas nas folhas das plantas de soja cultivadas em solo de vinhedo com estrutura indeformada, mostraram-se prejudiciais às plantas, diminuindo os parâmetros fotossintéticos tais como a A e A/C_i, bem como a concentração de clorofila b, em comparação às plantas cultivadas em solo de campo natural com estrutura indeformada (Figuras 2, 3). Isso aconteceu porque o excesso de Cu no tecido prejudica a maquinaria fotossintética através do: (i) impedimento do fluxo de elétrons na fotossíntese, (ii) diminuição da síntese ou atividade das enzimas do ciclo de Calvin (GONZÁLEZ-MENDOZA et al., 2013), (iii) desestruturação dos tilacóides (JOHN et al., 2009) e (iv) mudanças na estrutura da molécula de clorofila pela substituição do átomo de Mg (KÜPPER et al., 2002). Da mesma forma, a produção de massa seca das plantas de soja cultivadas no solo de vinhedo foi menor em comparação às plantas cultivadas em solo de campo natural (Figura 6 b), e, maior nas plantas cultivadas em solo com estrutura deformada em comparação àquelas cultivadas em solo com estrutura indeformada (Figura 6 a). Isso pode ser um resultado da elevada concentração de Cu nas folhas das plantas cultivadas no solo de vinhedo, principalmente com a estrutrura deformada, o que possivelmente tenha comprometido os processos fotossintéticos na planta (CAMBROLÉ et al., 2015). Uma vez que as variáveis MSPA e A apresentarem correlação positiva entre si e negativa com a concentração de Cu nas folhas (Figura 1 a).

Os parâmetros bioquímicos, tais como atividade das enzimas SOD, concentrações de H_2O_2 e TBARS também foram maiores nas folhas das plantas cultivadas em solo de vinhedo com estrutura indeformada em comparação àquelas cultivadas em solo de campo natural com estrutura indeformada (Figura 4 a, b, c, d). Isso aconteceu porque o Cu pode mudar o seu

estado de oxidação facilmente, podendo, através da reação de Fenton, catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, em elevadas concentrações, podem causar danos às membranas celulares (GILL; TUTEJA, 2010). Para evitar esses danos oxidativos, o sistema antioxidante da planta combate o excesso de EROs. A SOD age na dismutação do superóxido em H_2O_2, e sua atividade geralmente é aumentada sob condições de altas concentrações de Cu (ZHANG et al., 2010), como o que ocorreu nesse estudo nos solos de vinhedo em comparação aos solos de campo natural (Figura 5), e pode ser verificado pela correlação positiva que ocorreu entre essas variáveis (SOD, H_2O_2 e TBARS) (Figura 1 a). O H_2O_2 é a ERO menos danosa para a célula, entretanto, na presença de um metal de transição como o Cu pode formar o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) que é altamente danoso, podendo reagir com lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (GILL; TUTEJA, 2010). Por essa razão, a detoxificação do H_2O_2 catalisada pela POD e outras enzimas é fundamental (CHOUDHARY et al., 2007; GILL; TUTEJA, 2010). Entretanto, nesse estudo, não observou-se aumento da atividade da POD, em resposta às concentrações de H_2O_2 (Figura 4 c), como pode ser observado na ACP (Figura 1 a). Mesmo assim, nas plantas de soja cultivadas em solo com estrutura indeformada não foi verificado aumento na concentração de MDA para o solo de vinhedo em comparação ao solo de campo natural (Figura 4 e), o que indica que outra linha de defesa do sistema antioxidante da planta, como a catalase, pode ter detoxificado o H_2O_2, impedindo a formação de $OH^{\bullet}$ na presença de Cu, o que poderia causar a peroxidação lipídica (CHOUDHARY et al., 2007; GILL; TUTEJA, 2010).

Quando o solo de vinhedo foi revolvido (estrutura deformada) observou-se maior concentração de Cu nas folhas das plantas de soja, comparativamente àquelas cultivadas no solo com estrutura indeformada (Figuras 1 a, c, d, 5). O revolvimento do solo favorece a oxidação da MOS, e como parte do Cu está complexado à MOS, sua disponibilidade na solução e fitotoxicidade é aumentada (BRUNETTO et al., 2014; GIROTTO et al., 2013). Isso acontece devido ao solo utilizado nesse estudo apresentar baixa proteção física à MOS, devido à inexpressiva interação organomineral entre a MOS e óxidos de Fe e Al, os quais são os principais minerais responsáveis pela sorção de compostos orgânicos, e são apontados como a classe de minerais mais importante na estabilização da MOS (LOURENZI et al., 2011; WISEMAN; PÜTTMANN, 2005).

O revolvimento do solo (estrutura deformada) apresentou uma resposta negativa para a fisiologia das plantas de soja em comparação ao manejo do solo com estrutura indeformada, para ambos os solos de vinhedo e de campo natural. Isso pode ser observado na ACP pela alocação da estrutura deformada próxima à variáveis como TBARS, concentração de H_2O_2 e

concentração de Cu nas folhas, que correlacionaram-se negativamente com a massa seca, A/Ci, A e pigmentos (Figura 1 a, c, d). Todavia, a resposta negativa do revolvimento do solo sobre parâmetros fotossintéticos, atividade das enzimas SOD e POD, concentração de H_2O_2 e produção de massa seca das plantas de soja não parece estar relacionada somente ao aumento da disponibilidade do Cu no solo, uma vez que esse comportamento foi observado em ambos os solos (campo natural e vinhedo) (Figuras 2, 3 e 4). Nesse estudo, o efeito do revolvimento do solo, independente do conteúdo de Cu, gerou uma resposta negativa sobre as plantas. Isso pode estar relacionado à perda de C e N como CO_2 e NH_3 pela oxidação da MOS (OMONODE et al., 2011), o que provoca alterações na composição e quantidade de microrganismos do solo (FIERER et al., 2012) afetando diretamente a disponibilidade de nutrientes no solo (MOREIRA; MALAVOLTA, 2004), e não somente relacionado à toxidez causada pelo aumento da disponibilidade de Cu provocado pelo revolvimento.

4.5 CONCLUSÕES

O solo de vinhedo com longo histórico de aplicação de fungicidas cúpricos sob estrutura indeformada apresentou efeitos negativos sobre a fisiologia das plantas de soja, diminuindo a taxa de assimilação líquida de CO_2, eficiência instantânea de carboxilação da rubisco, concentração de clorofila b, atividade da guaiacol peroxidase, massa seca de parte aérea e de raiz, aumentando concentrações de peróxido de hidrogênio e Cu nas folhas, em comparação às plantas de soja cultivadas em solo de campo natural com estrutura indeformada.

As plantas de soja cultivadas em solo com estrutura deformada, que simulou um cultivo em sistema convencional, apresentaram desempenho fisiológico prejudicado em comparação às plantas cultivadas no solo com estrutura indeformada, o qual reproduz o sistema de semeadura direta. Entretanto, o efeito prejudicial do revolvimento do solo sobre as plantas foi observado em ambos os solos, de vinhedo e campo natural. Isso pode estar relacionado à oxidação da matéria orgânica e as consequentes perdas de C e N no sistema, o que reduz a disponibilidade de nutrientes às plantas, e não somente relacionado ao aumento da disponibilidade de Cu no solo.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Plant Physiology and Biochemestry**, v.72, p.248–254, 1976.
BRADL, H. B. Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.277, p.1–18, 2004.

BRUNETTO, G. et al. Frações de cobre e zinco em solos de vinhedos no Meio Oeste de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p.805-10, 2014.

BRUN, L. A. et al. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. **Environmental Pollution**, v.102, p.151-161, 1998.

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

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

CAMPOS, L. P. et al. Estoques e frações de carbono orgânico em Latossolo Amarelo submetido a diferentes sistemas de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.304-312, 2013.

CHOUDHARY, M. et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. E**cotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.204–209, 2007.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 400 p, 2004.

CONRAD, K. A. et al. Soil nitrogen status and turnover in subtropical leucaena-grass pastures as quantified by $\delta^{15}N$ natural abundance. **Geoderma**, v.313, p.126-134, 2018.

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

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária—Brazilian Agricultural Research Corporation). **Manual de análises químicas de solos plantas e fertilizantes** (Manual of chemical analysis of soils, plants and fertilizers), 2. ed. Brasília, 627p, 2009.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa Solos, 353p, 2013.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* L. Merrill. **Crop Science**, v. 11, p. 929-931, 1971.

FIERER, N. et al. Comparative metagenomic, phylogenetic, and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **The ISME Journal**, v.61, p.1007–1017, 2012.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309–314, 1977.

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

GIROTTO, E. et al. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. E**cotoxicology and Environmental Safety,** v.93, p.145-155, 2013.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D. et al. Copper Stress on Photosynthesis of Black Mangle (*Avicennia germinans*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v.85, p.665-670, 2013.

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

IPAGRO. **Atlas do Rio Agroclimatológico do Estado Grande do Sul**. Instituto de Pesquisas Agronômicas – Seção de Enologia Agrícola. Porto Alegre: Palloti, 1989.

JOHN, R. et al. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. **International Journal of Plant Production**, v.3, p.65–75, 2009.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. CRC Press, 4 ed. Boca Raton, Florida, cap 5. 2011.

KÜPPER, H. et al. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **Journal of Phycology**. v.38, p.429–441, 2002.

LE, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v.25, p.1-18, 2008.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Method 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, p.1781– 1787, 2001.

LOURENZI, C. R. et al. Soil chemical properties related to acidity under successive pig slurry applications. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1827-1836, 2011.

McBRIDE MB. **Environmental chemistry of soils**. New York, NY: Oxford University Press, 1994.

MEURER, E. J. **Fundamentos da química do solo**. Ed. Porto Alegre: Evangraf, 5ªed. 280p. 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, p.593–610, 2014.

MIOTTO, A. et al. Copper Accumulation and Availability in Sandy, Acid, Vineyard Soils. **Communications in Soil Science and Plant Analys**, v.48, p 1167-1183, 2017.

MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.9, p.1103-10, 2004.

OLIVEIRA, K. W. et al. Metais pesados em latossolos tratados com biossólido e cultivados com milho em experimento de longa duração. **Scientia Agrícola**, v.62, p.381-388, 2005.

OLIVEIRA, P. D. et al. Uso de calcário na amenização da toxidez de cobre em videiras jovens. **Científica**, v.43, p.427-435, 2015.

OMONODE, R. A. et al. Soil Nitrous Oxide Emissions in Corn following Three Decades of Tillage and Rotation Treatments. **Soil Science Society of America Journal**, v.75, p.152–163, 2011.

PINHEIRO, J. et al. R Core Team (2017). **_nlme:** Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_. R package version 3.1-131, <URL: https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.

QU, L. **varComp:** Variance Component Models. R package version 0.2-0. https://CRAN.R-project.org/package=varComp, 2017.

R CORE TEAM. **R:** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/ 2017.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAM, A. R. Heavy metal toxicity in rice and soybean plants cultivated in contaminated soil. **Revista Ceres**, v.61, p.248-254, 2014.

SOIL SURVEY STAFF, **Soil Taxonomy:** A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys. 2nd ed. US Government Printing Office, Washington DC, 2006.

WISEMAN, C. L. S.; PÜTTMANN, W. Soil organic carbon and its sorptive preservation in central Germany. **European Journal of Soil Science**, v.56, p.65-76, 2005.

WHITING, S. N. et al. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. **Restoration Ecology**. v.12, p.106-116, 2004.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação**. Química Nova**, v.31, p.731–734, 2008.

ZHANG, H. X. et al. Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of Elsholtzia haichowensis through apoplastic and symplastic Cu Zn-superoxide dismutase. **Journal of Hazardous Materials**, v.178, p.834-843, 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, p.527–533, 2004.

Figura 1 - Relação entre o componente principal 1 (CP 1) e o componente principal 2 (CP 2) dos parâmetros fotossintéticos (A, A/C_i, E, EUA, G_s e C_i), pigmentos fotossintéticos (clorofilas a, b, total e carotenoides), massa seca da parte aérea e raízes (MSPA e MSR), concentração de Cu nas folhas, atividade das enzimas antioxidantes (SOD e POD), concentração de H_2O_2 e peroxidação lipídica (TBARS) (a) para cultivares de soja (DM 5958 RSF IPRO e M 6410 IPRO) (b), origem do solo [campo natural (CN) e vinhedo (VI)] (c) e estrutura de solo [deformada (D) e indeformada (I)] (d).

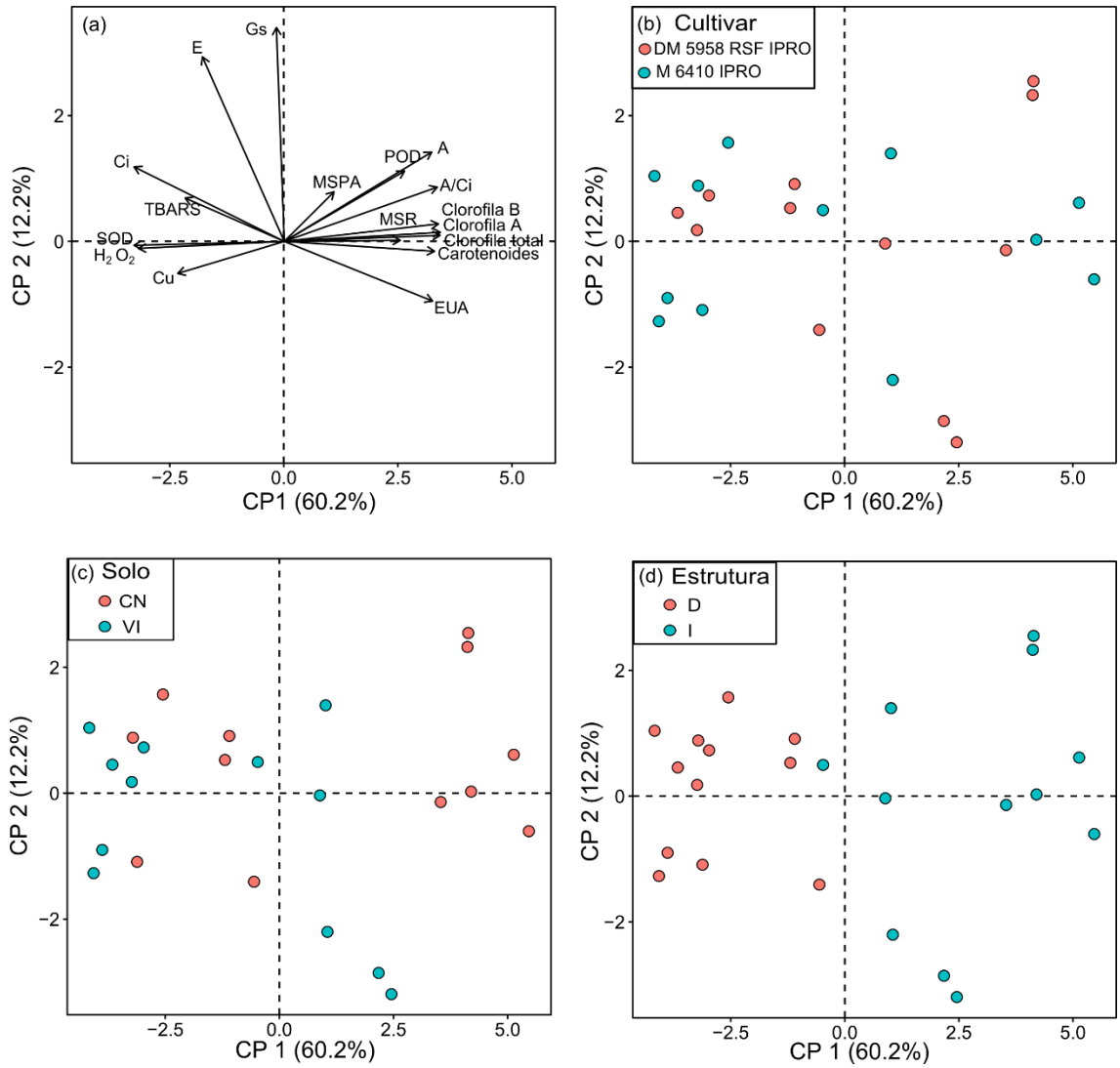


Figura 2 - Taxa de assimilação líquida de CO_2 (a), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (b), concentação interna de CO_2 (c), taxa de transpiração (d) e eficiência do uso da água (e) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo (P<0,05). As barras verticias representam ± desvio padrão.

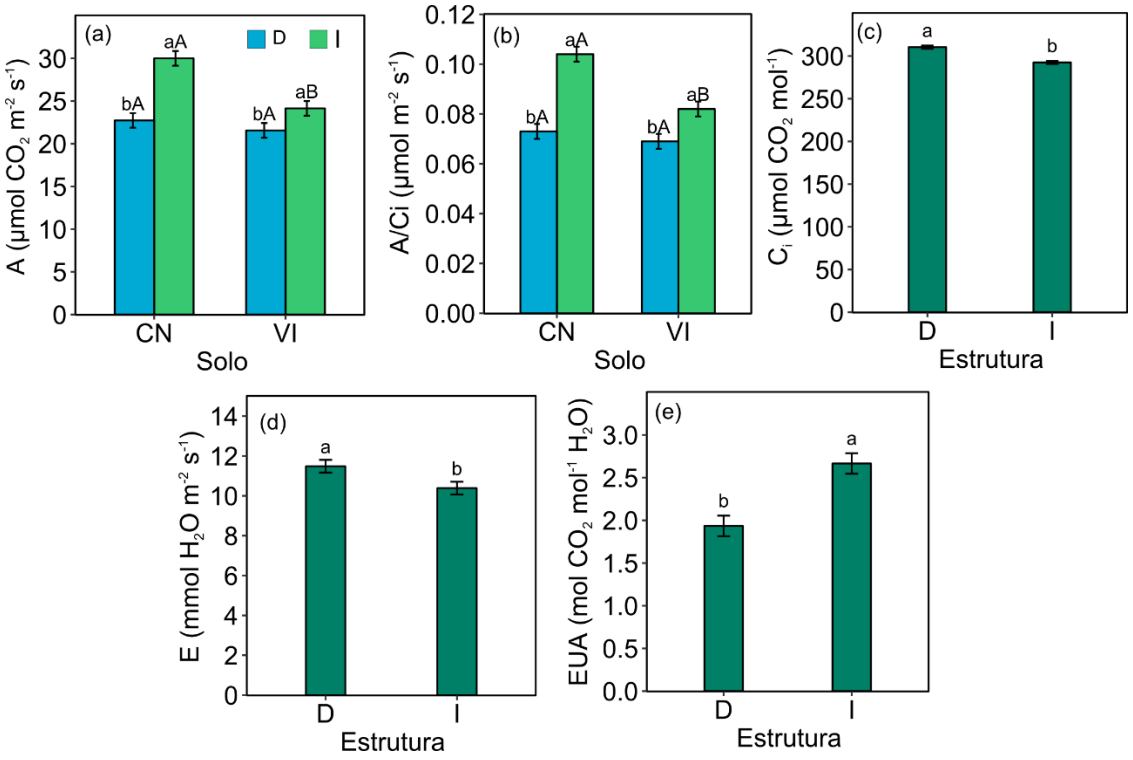


Figura 3 - Concentrações de clorofila total (a, b), clorofila a (c), carotenoides (d), e clorofila b (e) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo (P<0,05). As barras verticias representam ± desvio padrão.

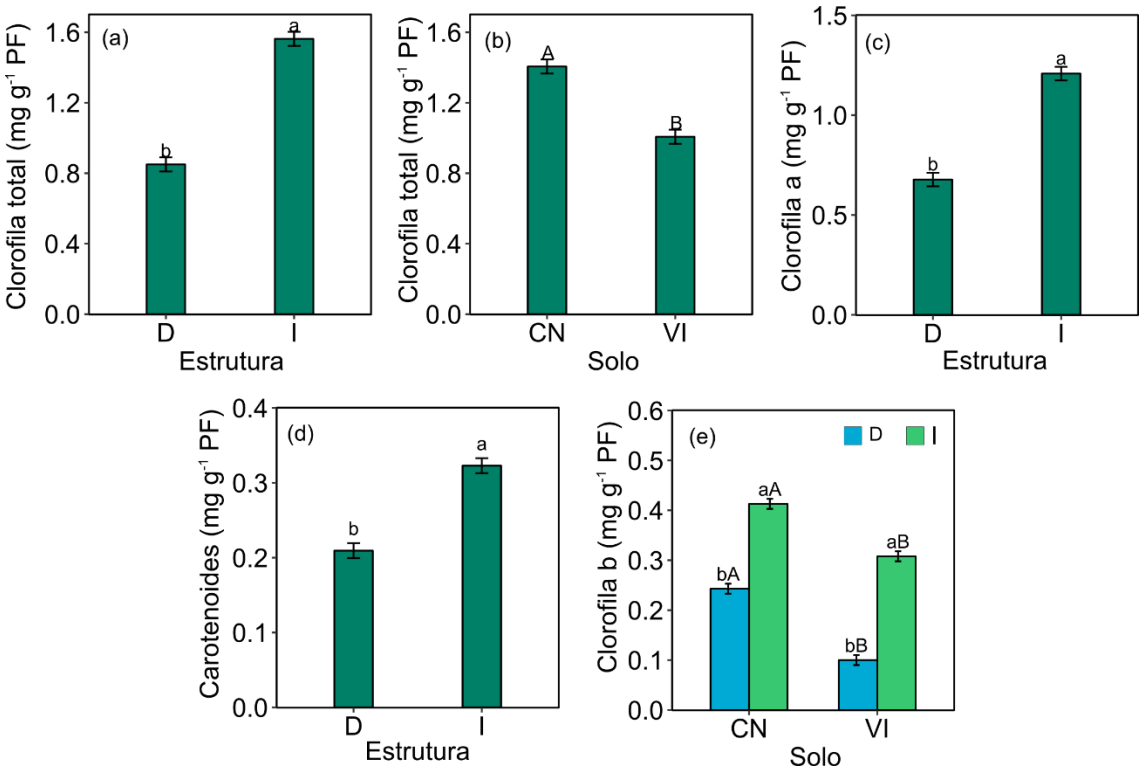


Figura 4 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (a, b), atividade da guaiacol peroxidase (c), concentração de H_2O_2 (d) e peroxidação lipídica (e) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo (P<0,05). As barras verticias representam ± desvio padrão.

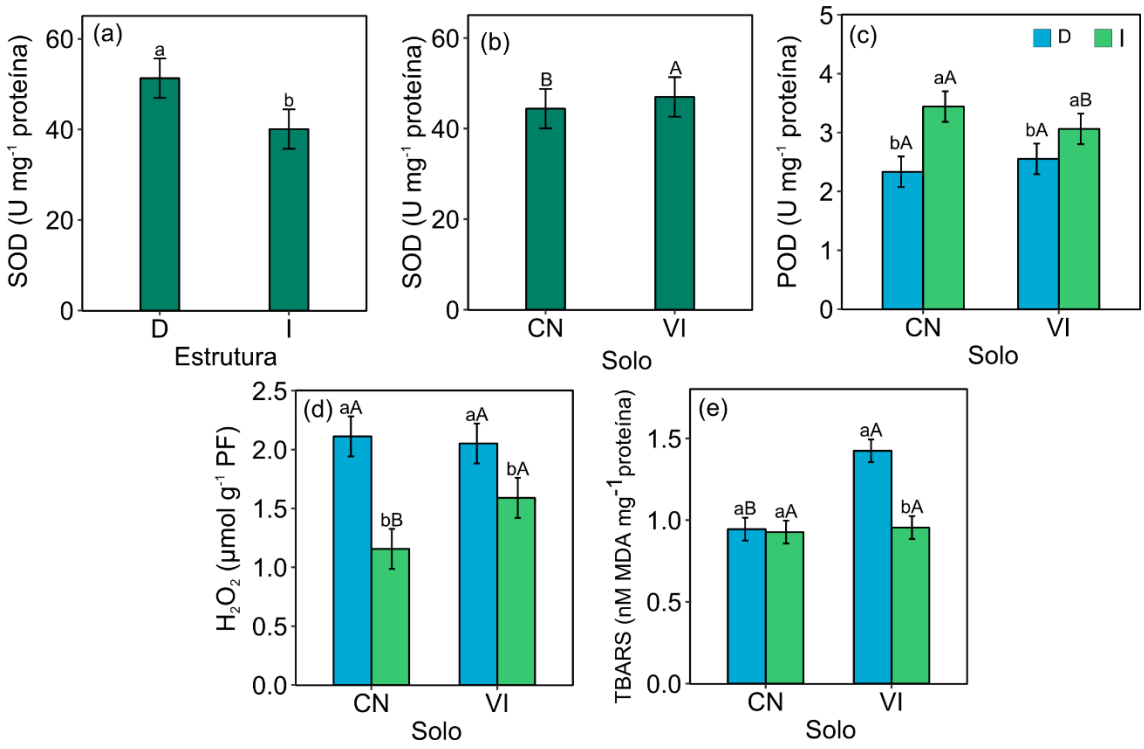


Figura 5 - Concentração de Cu nas folhas de plantas de soja (Glycine max (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI), com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo (P<0,05). As barras verticias representam ± desvio padrão.

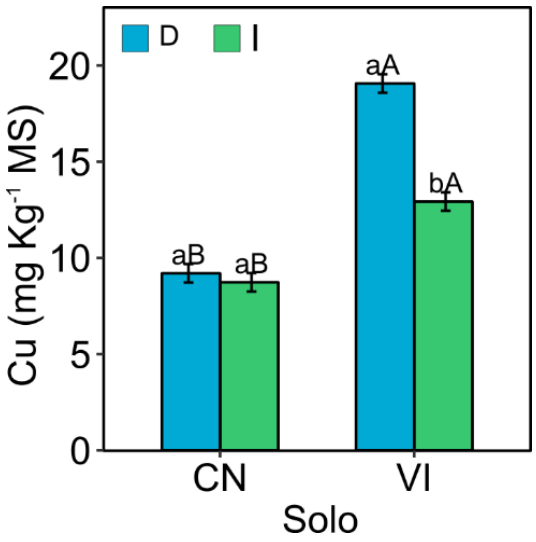
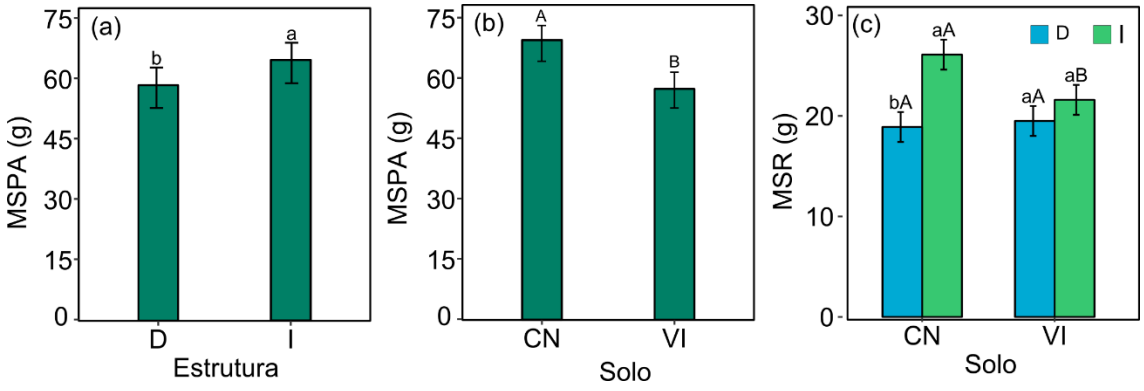


Figura 6 - Massa seca de parte aérea (a) e massa seca de raízes (b) em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas em solo de campo natural (CN) e vinhedo (VI) com estruturas deformada (D) e indeformada (I). Letras maiúsculas indicam comparação entre solos para uma mesma estrutura, enquanto letras minúsculas indicam comparação entre estruturas para um mesmo solo (P<0,05). As barras verticias representam ± desvio padrão.



MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura suplementar - Análise de componentes da variância para cultivar, estrutura do solo, origem do solo e a interação com resíduos da variância total para concentração de Cu nas folhas (Cu), clorofila a (CLA), clorofila b (CLB), clorofila total (CLT), carotenoides (Car), taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) condutância estomática de vapores de água (Gs), concentração intercelular de CO_2 (C_i), taxa transpiratória (E), eficiência de uso da água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco(A/C_i), peroxidação lipídica (Tbars), atividades de SOD e POD e concentração de H_2O_2.

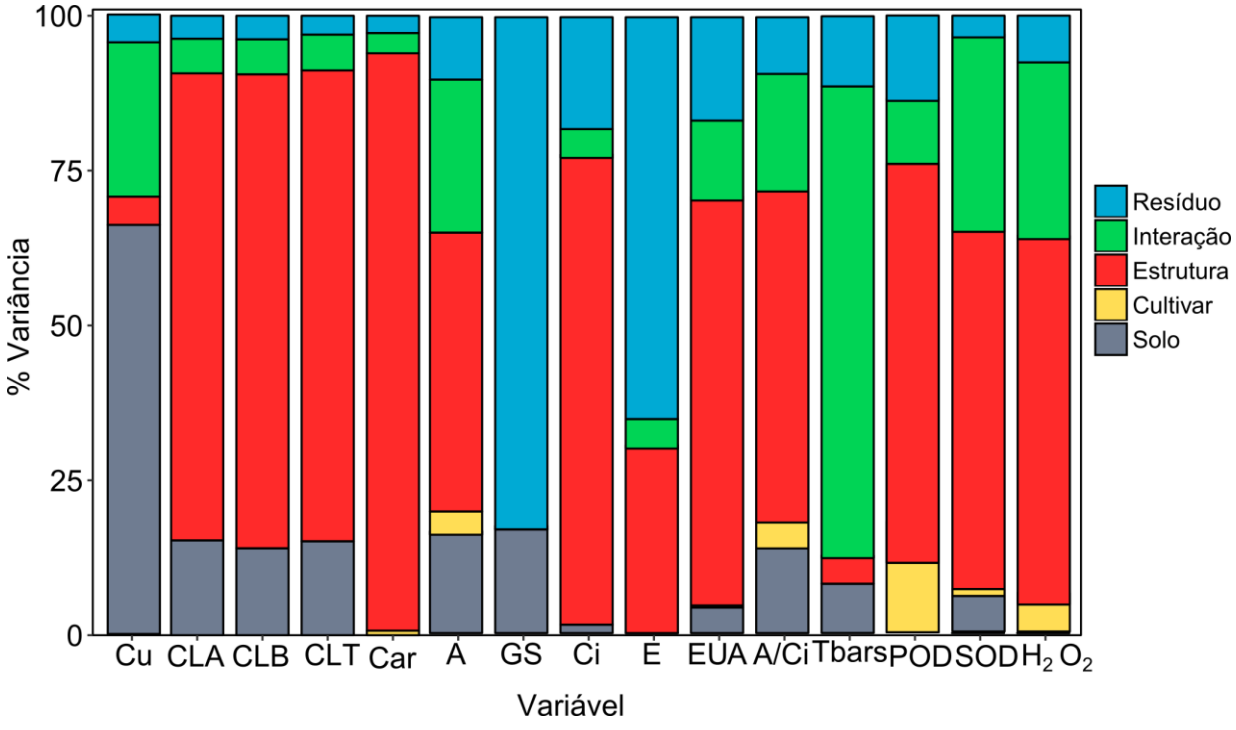


Tabela Suplementar – Características físicas e químicas da camada de 0-0,20 m de um solo Argissolo Vermelho cultivado por 35 anos com videiras e um solo de campo natural adjacente ao vinhedo.

	Vinhedo	*Campo natural*
Areia g kg^{-1}	822	818
Silte g kg^{-1}	95	88
Argila g kg-1	83	94
Matéria orgânica g kg^{-1}	12	12
pH $_{H2O}$ (1:1)	6,3	5,3
Al trocável por KCl 1mol L^{-1} ($cmol_c$ dm^{-3})	0	0,1
Ca trocável por KCl 1mol L^{-1} ($cmol_c$ dm^{-3})	2,6	1,2
Mg trocável por KCl 1mol L^{-1} ($cmol_c$ dm^{-3})	0,6	0,6
P disponível por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	53	5,6
K disponível por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	68	64
Cu disponível por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	63	1,8
Zn disponível por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	17	2,3
CTC $_{efetiva}$[a] ($cmol_c$ kg^{-1})	3,4	2,1
CTC $_{pH7}$[b] ($cmol_c$ kg^{-1})	4,4	3,6

[a] capacidade de efetivamente trocar cátions.
[b] capacidade de trocar cátions em pH 7.

5 DISCUSSÃO GERAL

Existem diferentes fontes de contaminação de Cu nos solos agrícolas. Dentre elas, destacam-se as aplicações de dejetos de animais como forma orgânica de adubação, e o uso frequente de fungicidas cúpricos, amplamente utilizados em pomares e vinhedos. As concentrações de Cu encontradas nos solos de vinhedo utilizados nesse estudo foram 35 vezes maiores do que as concentrações encontradas em solos de campo natural. Embora a legislação brasileira permita o cultivo de plantas em solos com esse nível de contaminação (CONAMA, 2009), devido às grandes quantidades de Cu adicionadas anualmente à esses solos (CASALI et al., 2008), se faz necessária a adoção de medidas preventivas à poluição do solo, o que além de inviabilizar o cultivo de plantas, poderia causar risco à saúde humana e ao meio ambiente. Sendo assim, a suspensão ou diminuição do uso de fungicidas cúpricos consiste em umas das principais medidas a serem adotadas quando se visa a remediação de solos de vinhedos contaminados por Cu. Dessa forma, estratégias que visam a inserção de culturas anuais na rotação de culturas, como o sugerido neste estudo através da soja, é uma importante alternativa para melhoria à longo prazo do solo e do sistema como um todo.

Um dos benefícios da rotação de culturas é a diminuição de incidência de doenças nas plantas, o que reduz a necessidade de aplicação de fungicidas cúpricos em cultivos futuros de videiras. Além disso, a utilização de culturas anuais na rotação de culturas, proporciona uma maior deposição de material vegetal sobre o solo, aumentando o teor de MOS, o que é importante para aumentar a capacidade do solo em complexar o Cu e diminuir a sua fitotoxicidade. O uso da soja, apresenta outros benefícios além destes, tais como alta produtividade e rentabilidade. Além disso, como uma planta leguminosa, a soja apresenta a capacidade de fixar N_2 atmosférico, adicionando altas quantidades de N no sistema, uma característica importante especialmente em solos com baixo teor de MOS, como os solos utilizados nesse estudo.

As cultivares de soja utilizadas no primeiro estudo (NA 5909 RG, DM 5958 RSF IPRO, M 6410 IPRO e DM 6563 RSF IPRO), comportaram-se de maneira diferente, entretanto, todas apresentaram diminuição na sua taxa fotossintética e produção de massa seca quando expostas ao excesso de Cu. Mas, de acordo com o exposto no manuscrito I, dentre as cultivares testadas neste estudo, a cultivar M 6410 IPRO é a mais recomendada para o uso em ambientes contaminados por Cu, e a cultivar DM 5958 RSF IPRO não é recomendada para essa finalidade por apresentar danos fisiológicos mais severos.

No segundo estudo, o cultivo da soja em solos de vinhedos ocasionou um acúmulo de Cu nas folhas maior do que o cultivo das plantas em solos de campo natural. Isso pode ter acontecido porque o solo do vinhedo apresentou 35 vezes mais Cu disponível do que o solo de campo natural. Associado à isso, os solos utilizados nesse estudo apresentam pouca capacidade de complexação de Cu, devido ao baixo teor de MOS e baixa capacidade de troca de cátions (CTC) (BRADL, 2004; McBRIDE, 1994), o que permite que grande parte do Cu presente no solo, permaneça fracamente adsorvido, podendo facilmente ser liberado para a solução do solo para ser absorvido pelas plantas (MIOTTO et al., 2014). O acúmulo de Cu nas folhas foi mais acentuado nas plantas cultivadas em solo com estrutura deformada em comparação àquelas cultivadas em solo com estrutura indeformada, o que era esperado devido ao revolvimento do solo favorecer a oxidação da MOS e assim aumentar a disponibilidade de Cu na solução do solo (BRUNETTO et al., 2014; GIROTTO et al., 2013), especialmente em solos como esses, que apresentam baixa proteção física da MOS.

Contudo, o revolvimento do solo afetou de maneira semelhante a fisiologia das plantas cultivadas em solos de vinhedo e de campo natural. Dessa forma, os efeitos negativos observados sobre a fisiologia das plantas de soja cultivadas em solo de vinhedo com estrutura deformada não são atribuídos somente ao aumento na disponibilidade do Cu causado pela oxidação da MOS em função do revolvimento, visto que as plantas cultivadas em solo de campo natural com a mesma estrutura de solo também apresentaram danos. Além do aumento da disponibilidade de Cu, a oxidação da MOS também ocasiona perdas de C e N do solo nas formas de CO_2 e NH_3 (OMONODE et al., 2011), o que afeta a disponibilidade de nutrientes devido afetar os microrganismos do solo (FIERER et al., 2012).

Isso nos leva a concluir que o revolvimento do solo não é recomendado para o cultivo de soja nos solos utilizados neste estudo. Além disso, conclui-se que o cultivo da soja pode ser realizado nesses solos contaminados por Cu com estrutura indeformada, ou seja, em sistema de semeadura direta, uma vez que os danos fisiológicos apresentados por essas plantas, tais como diminuição na produção de massa seca, nos parâmetros fotossintéticos e bioquímicos, foram inferiores à 20% em relação às plantas cultivadas em solo de campo natural com estrutura indeformada.

REFERÊNCIAS

BRADL H. B. Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. **Journal of Colloid and Interface Science,** v.277, p.1–18, 2004.

BRUNETTO, G. et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.65, p.609-624, 2014.

CASALI, C. A. et al. Formas e dessorção de cobre em solos cultivados com videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.32, p.1479–1487, 2008.

CONAMA (**Conselho Nacional do Meio Ambiente**). Resolução 420, de 28/12/2009 Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário Oficial da Repúbica Federativa do Brasil, 249, Brasília, 2009.

FIERER, N. et al. Comparative metagenomic, phylogenetic, and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **The ISME Journal**, v.61, p.1007–1017, 2012.

GIROTTO, E. et al. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. E**cotoxicology and Environmental Safety,** v.93, p.145-155, 2013.

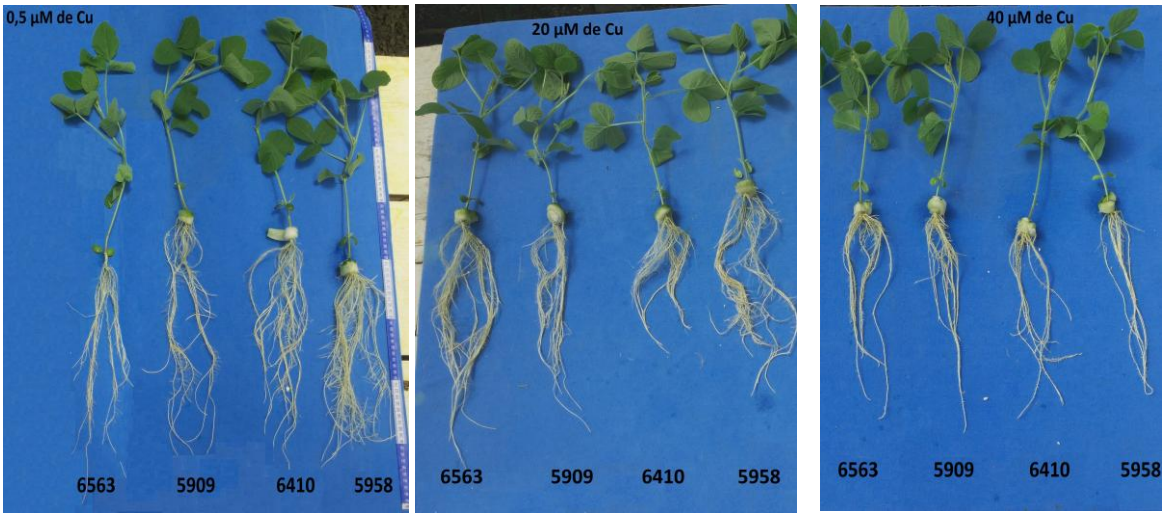
MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils.** Oxford University Press, New York.1994.

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, p.593–610, 2014.

OMONODE, R. A. et al. Soil Nitrous Oxide Emissions in Corn following Three Decades of Tillage and Rotation Treatments. **Soil Science Society of America Journal,** v.75, p.152–163, 2011.

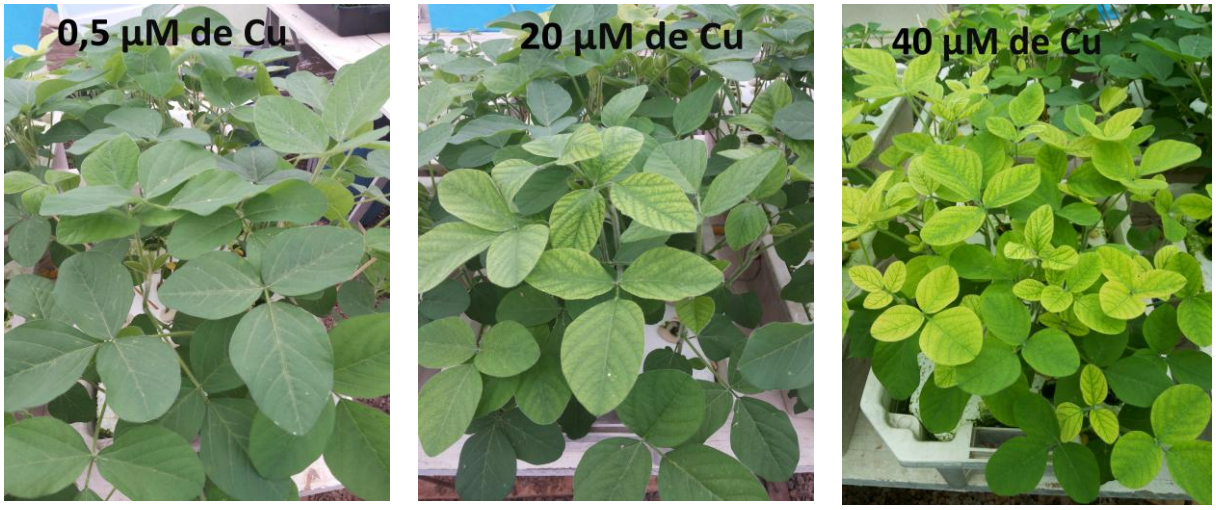
6 APÊNDICES

Apêndice 1 – Cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (6563, 5909, 6410 e 5958) após 15 dias de cultivo em sistema hidropônico contendo Cu na solução nutritiva. Concentração de 0,5 µM de Cu (esquerda), 20 µM de Cu (centro), e 40 µM de Cu (direita).



Fonte: Schwalbert, R (2018).

Apêndice 2 – Plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) após 21 dias de cultivo em sistema hidropônico contendo Cu na solução nutritiva. Concentração de 0,5 µM de Cu (esquerda), 20 µM de Cu (centro), e 40 µM de Cu (direita).



Fonte: Schwalbert, R (2018).

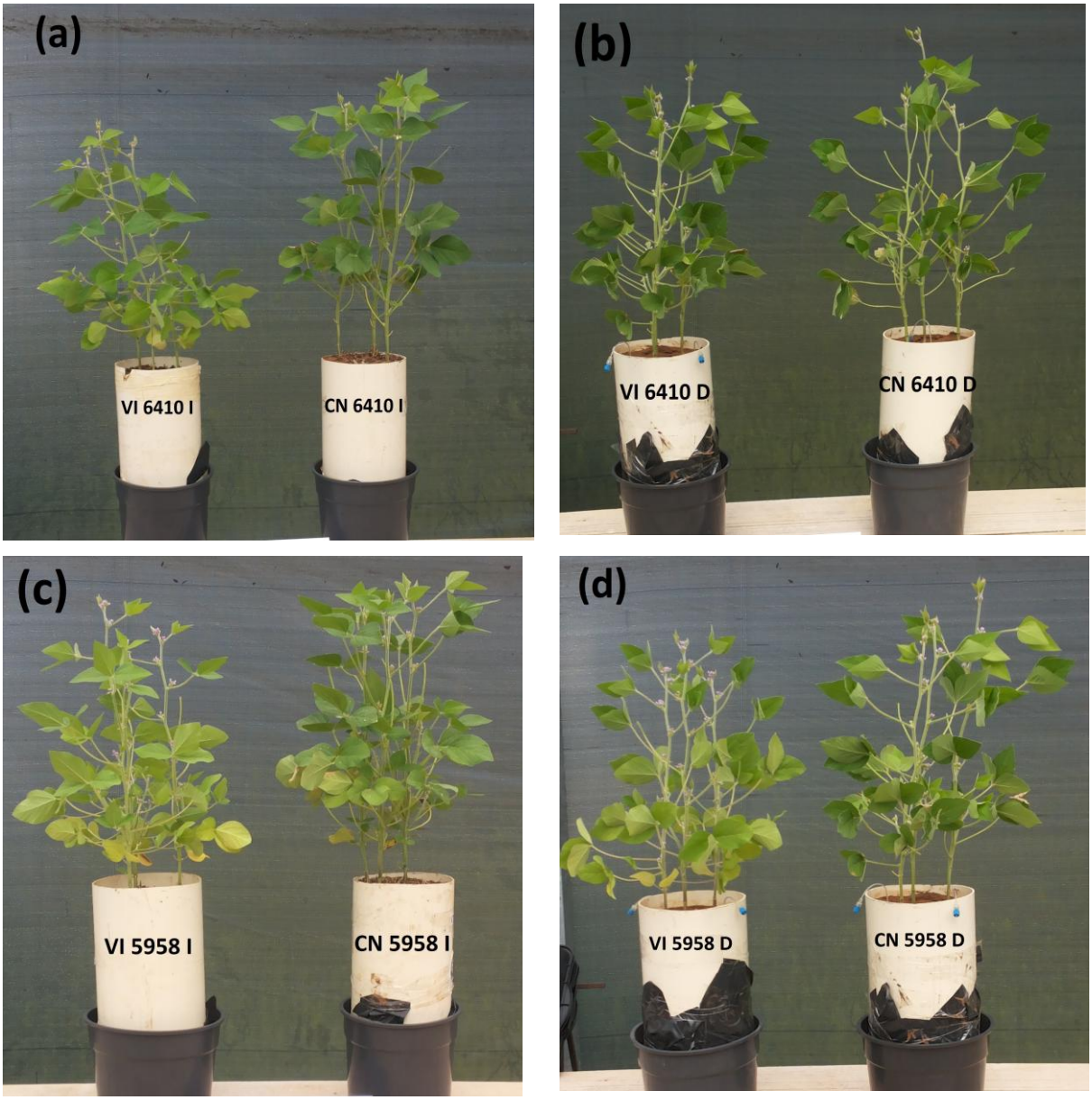
Apêndice 3 – Plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em estágio R2 cultivadas em canos de PVC contendo solo de vinhedo e de campo natural com estrutura de solo deformada e indeformada.

Fonte: Schwalbert, R (2018).

Apêndice 4 – Determinação das trocas gasosas da folha com o ambiente em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em estágio R2 cultivadas em canos de PVC contendo solo de vinhedo e de campo natural com estrutura de solo deformada e indeformada.

Fonte: Schwalbert, R (2018).

Apêndice 5 – Cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) 6410 (a, b) e 5958 (c, d) em estágio R2 cultivadas em canos de PVC contendo solo de vinhedo (VI) e de campo natural (CN) com estrutura de solo e indeformada (I) (a, c) e deformada (D) (b, d).



Fonte: Schwalbert, R (2018).

Apêndice 6 – Crescimento radicular da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivada em colunas de solo de campo natural com estrutura indeformada.

Fonte: Schwalbert, R (2018).