

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

Gabriela Descovi Milanesi

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE GRAMÍNEAS NATIVAS DA
AMÉRICA DO SUL SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZINCO**

Santa Maria, RS

2020

Gabriela Descovi Milanesi

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE GRAMÍNEAS NATIVAS DA AMÉRICA DO SUL
SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZINCO**

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS
2020

Milanesi, Gabriela
ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE GRAMÍNEAS NATIVAS DA AMÉRICA
DO SUL SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZINCO / Gabriela
Milanesi.- 2020.
114 p.; 30 cm

Orientador: Fernando Teixeira Nicoloso
Coorientador: Gustavo Brunetto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agrobiologia, RS, 2020

1. Fisiologia de plantas 2. Estresse oxidativo 3.
Metais pesados 4. Estratégias de aquisição de recursos I.
Teixeira Nicoloso, Fernando II. Brunetto, Gustavo III.
Título.

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

©2020

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

E-mail: gabrielamilanesi@hotmail.com

Gabriela Descovi Milanese

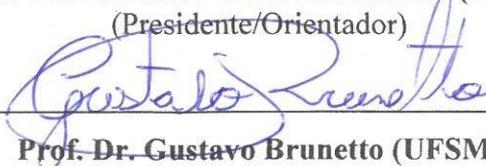
**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE GRAMÍNEAS NATIVAS DA AMÉRICA DO SUL
SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZINCO**

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

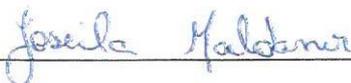
Aprovada em 31 de Agosto 2020:



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



Prof. Dr. Gustavo Brunetto (UFSM)



Dr. Joseila Maldaner (DDPA)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente à Deus,
À minha família e em especial
Aos meus pais, Antonio Moacir Milanesi e Rosemar
Descovi Milanesi e aos meus irmãos Maiksael e
Eduardo (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, em minha vida, é o guia, o caminho e o pilar de sustentação para o alcance dos objetivos.

À minha família, em especial aos meus pais, Rosemar e Antonio Moacir pelo exemplo de vida, me ensinando o caminho correto da honestidade, sinceridade, educação, perseverança e humildade. Pela força e incentivo em todos os momentos. Ao meu irmão Maik, por todo o apoio e ajuda que dedicou a mim ao longo desse período. Minha tia Roselei e minha avó Tereza pelo carinho, companheirismo, confiança e apoio, sempre ajudando no que fosse possível, e incentivando em todos os momentos.

Às minhas amigas de infância Isadora Dalmolin, Jéssica Meneghetti, Eloisa Soldera, Andressa Sartor, Julia Naicin e Julia Veber obrigada pela amizade, por cuidarem de mim e muito obrigada por todas as alegrias proporcionadas em todos esses anos de amizade.

À minha grande amiga-irmã paraense, Liliane Correa Machado, pelo apoio que sempre me deu em todas as minhas atividades, por ouvir meus desesperos e choros e por sempre me dar uma palavra amiga quando eu mais precisava. Com certeza sua presença tornou essa jornada mais alegre e tens um lugar especial em meu coração.

Aos grandes amigos que a pós-graduação me proporcionou em ter Dayvid Oliveira, Edvania Oliveira, Thays Correa, Jéssica Martins, Isley Bicalho, André Somavila e Lincon Stefanello, obrigada pelas alegrias que tive e que pude compartilhar com vocês, em meu coração existe um espaço reservado para cada um de vocês.

Aos meus colegas do laboratório FisioPlant que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigada, Camila Tarouco, Anderson, Liliane Machado, Raíssa Scwalbert, Leonardo Thiesen, Gíllian Fernandes, Leonardo Couto e Francisco Beuter, pelas trocas de conhecimento e diversões juntos.

Ao professor Fernando Teixeira Nicoloso, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e a oportunidade de realizar sob sua orientação o meu mestrado.

À Camila Tarouco pela amizade e toda a colaboração dada ao desenvolvimento do meu trabalho, és uma pessoa maravilhosa de um coração gigantesco.

À Raissa Scwalbet por toda paciência e dedicação que teve comigo e pelos conselhos de vida. Terminei essa jornada com outros pensamentos, graças a você.

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

Ao grupo GEPACES por me acolherem e estarem sempre dispostos a me ajudar.

À banca examinadora por aceitarem o convite para revisão do material, e contribuições realizadas.

À UFSM pela estrutura, e pelo acolhimento nesses 7 anos.

À CAPES pelo incentivo financeiro que tornou o trabalho possível.

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para que fosse possível a elaboração da dissertação!

À TODOS O MEU MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE GRAMÍNEAS NATIVAS DA AMÉRICA DO SUL SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZINCO

AUTORA: Gabriela Descovi Milanesi
ORIENTADOR: Fernando Teixeira Nicoloso

O acúmulo de metais nos solos a exemplo do Zinco (Zn) é observado em vinhedos de vários países, inclusive no Brasil, nos vinhedos da campanha gaúcha. O uso prolongado de fungicidas contendo Zn em sua composição, utilizados para o controle de doenças fúngicas em videiras, ocasionam o acúmulo deste metal no solo. Os efeitos tóxicos deste metal podem causar restrições no processo de absorção de nutrientes, além de promover distúrbios que comprometem a expansão celular e conseqüentemente menor crescimento. O Zn pode ser fator limitante para o desenvolvimento das espécies de gramíneas nativas que coabitam as entrelinhas dos vinhedos quando presente em altas concentrações no meio de crescimento. O objetivo desse trabalho foi caracterizar as respostas fisiológicas de espécies de gramíneas nativas do bioma pampa expostas ao excesso de Zn, bem como avaliar quais as espécies são mais adaptadas para essa condição. O estudo I foi conduzido em sistema de cultivo hidropônico contendo três concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) e quatro espécies de gramíneas (*Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Axonopus affinis* e *Andropogon lateralis*). Aos 40 dias de cultivo, foram determinados as trocas gasosas, massa fresca e seca, parâmetros biométricos do sistema radicular, atributos bioquímicos, concentrações de Zn e nutrientes nos tecidos das plantas. O estudo II foi conduzido com três espécies de gramíneas *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* submetidas a cinco doses de Zn (0, 30, 60, 120 e 180 mg kg^{-1}). Aos 90 dias de cultivo foram determinadas as trocas gasosas da folha, determinação da concentração Zn no solo e no tecido, produção de massa seca, concentração de pigmentos fotossintéticos, proteínas solúveis, concentração de nutrientes nos tecidos, atividade da enzima POD e SOD, concentração de H_2O_2 e de TBARS. No estudo I, o incremento das doses de Zn na solução nutritiva aumentou a concentração de Zn nas raízes e parte aérea das quatro espécies, no entanto, não ocasionou alteração no crescimento em biomassa. A taxa de assimilação líquida de CO_2 foi aumentada com o acréscimo das concentrações de Zn para todas as espécies, principalmente na dose de 300 μM . Os parâmetros bioquímicos, em geral, não foram afetados pelas altas concentrações de Zn. O incremento das doses de Zn influenciou de modo distinto os parâmetros de estresse oxidativo (TBARS e H_2O_2). O balanço nutricional foi afetado nas quatro espécies com o aumento crescente das doses de Zn. Apesar das alterações fisiológicas observadas, as quatro espécies deste estudo apresentaram grande adaptação ao aumento da disponibilidade de Zn. No estudo II o teor de Zn no solo aumentou linearmente com a aplicação de Zn bem como a concentração de Zn nas raízes e parte aérea das três espécies. Os parâmetros bioquímicos, em geral, foram afetados pelas altas concentrações de Zn. O incremento das doses de Zn influenciou de modo distinto os parâmetros de estresse oxidativo (H_2O_2 e TBARS), sendo que os aumentos das atividades da SOD e POD foram correlacionados com a diminuição do estresse oxidativo. As avaliações fisiológicas analisadas indicam que a espécie *Axonopus affinis* é mais tolerante ao excesso de Zn.

Palavras-chave: Toxidez. Fotossíntese. Nutrientes. Pastagens naturais.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF NATIVE SOUTH AMERICAN GRASS SUBMITTED TO EXCESSIVE ZINC

AUTHOR: Gabriela Descovi Milanesi
ADVISOR: Fernando Teixeira Nicoloso

The accumulation of metals in soils such as Zinc (Zn) is observed in vineyards from several countries, including Brazil, in the vineyards of the Rio Grande do Sul campaign. The prolonged use of fungicides containing Zn in its composition, used to control fungal diseases in grapevines, cause the accumulation of this metal in the soil. The toxic effects of this metal can cause restrictions in the nutrient absorption process, in addition to promoting disturbances that compromise cell expansion and, consequently, lower growth. Zn can be a limiting factor for the development of native grass species that coexist between the rows of vineyards when present in high concentrations in the growth medium. The objective of this work was to characterize the physiological responses of grass species native to the pampa biome exposed to excess Zn, as well as to evaluate which species are more adapted to this condition. Study I was carried out in a hydroponic cultivation system containing three Zn concentrations (2, 150 and 300 μM) and four grass species (*Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Axonopus affinis* and *Andropogon lateralis*). At 40 days of cultivation, gas exchange, fresh and dry mass, biometric parameters of the root system, biochemical attributes, concentrations of Zn and nutrients in plant tissues were determined. Study II was conducted with three species of grasses *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum* submitted to five doses of Zn (0, 30, 60, 120 and 180 mg kg^{-1}). At 90 days of cultivation, leaf gas exchange, determination of Zn concentration in soil and tissue, dry mass production, concentration of photosynthetic pigments, soluble proteins, concentration of nutrients in tissue, enzyme activity of POD and SOD, concentration of H_2O_2 and of TBARS. In study I, the increment of Zn doses in the nutrient solution increased the Zn concentration in the roots and shoots of the four species, however, it did not change the biomass growth. The rate of net assimilation of CO_2 was increased with the addition of Zn concentrations for all species, mainly at the dose of 300 μM . Biochemical parameters, in general, were not affected by high Zn concentrations. The increase in Zn doses influenced the oxidative stress parameters (TBARS and H_2O_2) in a distinct way. Nutritional balance was affected in the four species with increasing Zn doses. Despite the physiological changes observed, the four species in this study showed great adaptation to the increased availability of Zn. In study II, the Zn content in the soil increased linearly with the application of Zn as well as the Zn concentration in the roots and shoots of the three species. Biochemical parameters, in general, were affected by high Zn concentrations. The increase in Zn doses influenced the oxidative stress parameters (H_2O_2 and TBARS) in a distinct way, and the increases in SOD and POD activities were correlated with the decrease in oxidative stress. The physiological evaluations analyzed indicate that the species *Axonopus affinis* is more tolerant to excess Zn.

Keywords: Toxicity. Photosynthesis. Nutrients. Natural pastures.

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO I

- Figura 1 - Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raízes (b), massa seca total da planta (c) e relação entre a massa seca de raiz e a massa seca de parte aérea (d) de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μ M) na solução nutritiva. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.....53
- Figura 2 - Comprimento radicular (a), área superficial radicular (b), diâmetro médio radicular (c) e volume radicular (d) de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μ M) na solução nutritiva. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.....55
- Figura 3 - Concentração de Zn nos tecidos da parte aérea e raiz (A); Índice de translocação de Zn para a parte aérea (B) e Índice de acumulação de Zn nas raízes (C) de quatro espécies de gramíneas nativas do bioma pampa submetidas a concentrações crescentes de Zn (2, 150 e 300 μ M Zn) na solução nutritiva do cultivo em hidroponia. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.56
- Figura 4 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (a), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (b), concentração intercelular de CO₂ (c), condutância estomática (d) taxa de transpiração (e) e eficiência do uso da água (f) em de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μ M) na solução nutritiva. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão60
- Figura 5 - Teor de H₂O₂ e peroxidação lipídica (TBARS) em de quatro espécies de gramíneas nativas Teor de H₂O₂ e peroxidação lipídica (TBARS) em de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μ M) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre concentrações de Zn para uma mesma espécie. Letras minúsculas indicam comparação entre cultivares para uma mesma concentração de Zn ($p < 0.05$). As barras verticais representam \pm desvio padrão62
- Figura 6 - Atividade das enzimas POD e SOD em de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μ M) na solução nutritiva. Letras maiúsculas indicam comparação entre concentrações de Zn para uma mesma espécie. Letras minúsculas indicam comparação entre espécies para uma mesma concentração de Zn ($p < 0.05$). As barras verticais representam \pm desvio padrão64

Figura 7 - Relação entre o componente principal 1 (CP 1) e o componente principal 2 (CP 2) dos parâmetros fotossintéticos (A, A/Ci, E, EUA, Gs e Ci), concentração de clorofilas a, b, total e de carotenoides, massa seca (MSPA e MSR), concentração de Zn nas raízes e parte aérea (Zn R e Zn 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 (H₂O₂ R e H₂O₂ PA) e peroxidação lipídica nas raízes e parte aérea (TBARS R E TBARS PA), em quatro gramíneas do bioma Pampa cultivadas em concentrações crescentes de Zn (2; 150 e 300 µM de Zn) 67

MANUSCRITO II

Figura 1 - Concentração de Zn extraído do solo através de Melich-1 referentes as doses aplicadas (0, 30, 60, 120 e 180 mg kg⁻¹ Zn) após 90 dias de cultivo das gramíneas. Letras distintas indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão.87

Figura 2 - Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raízes (b), massa seca total (c) e relação entre a massa seca de raiz e a massa seca de parte aérea (d), em três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), em resposta as doses de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg kg⁻¹) aplicadas no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão..... 87

Figura 3 - Concentração de Zn nos tecidos da parte aérea e raiz (A); Índice de translocação de Zn para a parte aérea (B) e Índice de acumulação de Zn nas raízes (C) de três espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa submetidas a concentrações crescentes de alumínio (0, 30, 60, 120 e 180 mg Zn kg⁻¹ Zn) na solução nutritiva do cultivo em hidroponia. Letras distintas indicam diferenças significativas (P < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão..... 89

Figura 4 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (a), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (b), concentração intercelular de CO₂ (c), condutância estomática (d) taxa de transpiração (e) e eficiência do uso da água (f) de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum*) em resposta as concentrações de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg Zn kg⁻¹) adicionado no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão..... 93

Figura 5 - Concentrações de clorofila a (a), clorofila b (b), clorofila total (c), relação Chl a/ Chl b (d), e carotenoides(e) de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum*) em resposta as doses de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg kg⁻¹) aplicadas no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas (P < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão. 95

Figura 6 - Concentração de H₂O₂ (a,b), peroxidação lipídica (TBARS) (c), atividade das enzimas POD (d) e SOD (e) de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum*) em resposta as concentrações de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg kg⁻¹) no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas (P < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão.96

Figura 7 - Relação entre o componente principal 1 (CP 1) e o componente principal 2 (CP 2) dos parâmetros fotossintéticos (A, A/Ci, E, EUA, Gs e Ci), concentração de clorofilas a, b, total e de carotenoides, massa seca de parte aérea (MSPA) massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST), concentração de Zn nas raízes e parte aérea (Zn R e Zn PA), atividade das enzimas superóxido dismutase na parte aérea (SOD PA), concentração de peróxido de hidrogênio na parte aérea (H₂O₂ PA) e peroxidação lipídica na parte aérea (TBARS PA), em três gramíneas do bioma Pampa cultivadas em concentrações crescentes de Zn (0, 30, 60, 120 e 180 mg Zn kg⁻¹).99

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Tabela 1 - Concentrações de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Mn na parte aérea (PA) e raízes (R) de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva. Os valores foram obtidos a partir das médias de três repetições referente a cada espécie de gramíneas nativas do bioma Pampa 58

Tabela 2 - Concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, Chl *a*/ Chl *b*, carotenoides em de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva. 61

MANUSCRITO II

Tabela 1 - Características físicas e químicas da camada de 0-15 cm em um Argissolo Vermelho (Typic Hapludalf) em condições de campo natural..... 82

Tabela 2 - Concentrações de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Mn na parte aérea e raízes de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum*) em resposta as concentrações de Zn (0,30 60, 120 e 180 mg Zn kg^{-1}) na solução nutritiva 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg - Micrograma
 μL - Microlitro
 μM - Micromolar
 μmol - Micromol
 $^1\text{O}_2$ - Oxigênio singlete
A - Taxa de assimilação líquida de CO_2
A/Ci - Eficiência instantânea de carboxilação da rubisco
ACP - Análise de componentes principais
C - Carbono
Ca - Cálcio
 CaCO_3 - Carbonato de cálcio
Ci - Concentração intercelular de CO_2
Cl - Cloro
cm - Centímetro
 cm^2 - Centímetro quadrado
 cm^3 - Centímetro cúbico
cmolc - Centimol de carga
 CO_2 - Dióxido de carbono
CP - Componente principal
CTC - Capacidade de troca de cátions
Cu - Cobre
DMSO - Dimetilsulfóxido
E - Taxa transpiratória
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs - Espécie reativa de oxigênio
EUA - Eficiência de uso da água
F - Flúor
Fe - Ferro
g - Grama
Gs - Condutância estomática de vapores de água
H - Hidrogênio
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio
HCl - Ácido clorídrico
 HNO_3 - Ácido nítrico
I - Iodo
IA - Índice de acumulação
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IT - Índice de translocação
K - Potássio
kg - Quilograma
L - Litro
m - Metro
 m^2 - Metro quadrado
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA - Malondialdeído
MF - Massa fresca
Mg - Magnésio
mg - Miligrama

MgCO₃ – Carbonato de magnésio
min – Minuto
mL – Mililitro
mm - Milímetro
mM – Milimolar
Mn – Manganês
MOS – Matéria orgânica do solo
MS – Massa seca
MSPA – Massa seca de parte aérea
MSR – Massa seca de raízes
MST – Massa seca total
N – Nitrogênio
NaOH – Hidróxido de sódio
Ni – Níquel
nm – Nanômetro
O₂ – Oxigênio molecular
O₂^{•-} – Ânion superóxido
OH - Hidroxila
OH[•] – Radical hidroxil
P – Fósforo
PA – Parte aérea
PF – Peso fresco
pH – Potencial hidrogeniônico
POD – Guaiacol peroxidase
PSII – Fotossistema II
PVC – Policloreto de vinila
R – Raiz
Rubisco – Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase
RS – Rio Grande do Sul
S – Enxofre
s – Segundo
SFT – Superfosfato triplo
SOD – Superóxido dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TFK – Tampão fosfato citrato
UFMS – Universidade Federal de Santa Maria
W – West
Zn – Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

- °C – Escala de grau Celsius
- ° - Grau
- ' – Minutos
- % - Porcentagem
- ” – Segundos

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A - Perfis das espécies nativas do bioma Pampa transplantados em bandejas plásticas contendo areia como substrato e cultivadas em casa de vegetação para posterior uso nos experimentos em solução nutritiva e em solo 112
- Apêndice B - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa no cultivo em solução nutritiva expostas à concentrações crescentes de Zn. Sistema Hidropônico (A), Avaliação de trocas gasosas (B)..... 112
- Apêndice C - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa: *Axonopus affinis* (A), *Paspalum notatum* (B), *Paspalum plicatulum* (C) e *Andropogon lateralis* (D) aos 40 dias de cultivo em solução nutritiva expostas à concentrações crescentes de Zn. Concentração de 2 μ M (esquerda), 150 μ M (centro), e 300 μ M (direita) 113
- Apêndice D - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa: *Axonopus affinis* (A), *Paspalum notatum* (B), *Paspalum plicatulum* (C) e *Andropogon lateralis* (D) aos 40 dias de cultivo em solução nutritiva expostas à concentrações crescentes de Zn. Concentração de 2 μ M (esquerda), 150 μ M (centro), e 300 μ M (direita).
.....114
- Apêndice E - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa no cultivo em solo expostas à concentrações crescentes de Zn. Sistema de cultivo em solo (A), Avaliação de trocas gasosas (B)..... 116
- Apêndice F - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa: *Axonopus affinis* (A), e *Paspalum notatum* (B) e *Paspalum plicatulum* (C) aos 90 dias de cultivo em solo expostas as maiores concentrações de Zn deste estudo (120 e 180 mg Zn kg⁻¹).
.....117

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 HIPÓTESES	22
1.2 OBJETIVOS	23
1.2.1 Objetivo geral.....	23
1.2.2 Objetivos Específicos	23
2 REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 BIOMA PAMPA	24
2.2 GRAMÍNEAS PERTENCENTES ÀS PASTAGENS NATURAIS DO BIOMA PAMPA	25
2.3 A VITICULTURA NA CAMPANHA GAÚCHA E O ACÚMULO ZINCO EM SOLOS DE VINHEDO.....	27
2.4 ZINCO NO SOLO, TRANORTE E ABSORÇÃO EM PLANTAS	29
2.5 O ZINCO NAS PLANTAS	30
2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	33
2.6.1 <i>Axonopus affinis</i> Chase	33
2.6.2 <i>Paspalum notatum</i> Flügge	33
2.6.3 <i>Paspalum plicatulum</i> Michx	34
2.6.4 <i>Andropogon lateralis</i> Nees	35
REFERÊNCIAS	36
3 MANUSCRITO I	44
RESUMO.....	44
RESPOSTAS FISIOLÓGICOS DE GRAMÍNEAS NATIVAS DA AMÉRICA DO SUL SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZINCO EM HIDROPONIA	44
ABSTRACT	45
PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF NATIVE SOUTH AMERICAN GRASSES SUBMITTED TO ZINC EXCESS IN HYDROPONICS	45
3.1 INTRODUÇÃO.....	46
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.2.1 Descrição do experimento	48
3.2.2 Produção de massa seca	49
3.2.3 Concentração de nutrientes no tecido.....	49
3.2.4 Índice de translocação de Zn para a parte aérea e índice acumulação de Zn na raiz	49
3.2.5 Parâmetros fotossintéticos	50
3.2.6 Parâmetros bioquímicos.....	50
3.2.6.1 Concentração de clorofilas e carotenóides	50
3.2.6.2 Atividade de superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD)	50

3.2.6.3	Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	51
3.2.6.4	Peroxidação lipídica (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)	51
3.2.6.5	Análises estatísticas.....	51
3.3	RESULTADOS.....	53
3.3.1	Produção de massa seca.....	53
3.3.2	Parâmetros morfológicos de raiz	54
3.3.3	Concentração de Zn na parte aérea e raiz, índice de translocação de Zn para a parte aérea e acumulação de Zn na raiz.....	55
3.3.4	Concentrações de nutrientes	57
3.3.5	Trocas gasosas da folha	58
3.3.6	Pigmentos fotossintéticos	61
3.3.7	Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo	61
3.3.8	Análise de Componentes Principais	65
3.4	DISCUSSÃO	68
3.5	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS.....	73
4	MANUSCRITO II.....	77
	ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM TRÊS ESPÉCIES DE GRAMÍNEAS NATIVAS DO BIOMA PAMPA SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZN NO SOLO	77
	RESUMO	77
	PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS IN THREE NATIVE GRASS SPECIES FROM THE PAMPA BIOME SUBMITTED TO THE ZINC EXCESS IN THE SOIL	78
	ABSTRACT.....	78
4.1	INDRODUÇÃO.....	79
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	80
4.2.1	Coleta e incubação do solo.....	80
4.2.2	Descrição do experimento.....	82
4.2.3	Produção de massa seca.....	83
4.2.4	Concentração de nutrientes no tecido	83
4.2.5	Índice de translocação de Zn para a parte aérea e índice acumulação de Zn na raiz	83
4.2.6	Parâmetros fotossintéticos.....	83
4.2.7	Parâmetros bioquímicos	84
4.2.8	Concentração de clorofilas e carotenoides	84
4.2.9	Atividade de superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD)	84
4.2.10	Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	85
4.2.11	Peroxidação lipídica (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)	85
4.2.12	Análise estatística	85

4.3 RESULTADOS	86
4.3.1 Concentração de zn no solo e produção de massa seca	86
4.3.2 Concentração de Zn na parte aérea e raiz, índice de translocação de Zn para a parte aérea e acumulação de Zn na raiz	88
4.3.3 Concentrações de nutrientes	89
4.3.4 Trocas gasosas da folha	91
4.3.5 Concentração de pigmentos fotossintéticos	94
4.3.6 Parâmetros bioquímicos	95
4.3.7 Análise de Componentes Principais	97
4.4 DISCUSSÃO	100
4.5 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	105
5 DISCUSSÃO GERAL	110
6 CONCLUSÕES GERAIS	111
7 APÊNDICES	112

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os campos nativos da América do Sul são caracterizados por possuir uma grande biodiversidade de espécies. Dentre a grande variedade de espécies observadas nas pastagens naturais, as gramíneas são importantes contribuintes para a produção de biomassa desses campos, podendo ser verificadas mais de 450 espécies (BOLDRINI, 1997), fato que caracteriza uma expressiva diversidade. Características como variabilidade e versatilidade de suas formas biológicas, mecanismos adaptativos e as suas relações com as pressões impostas pelo meio que habitam estão relacionadas com a grande representatividade das gramíneas nos campos naturais (BOLDRINI; LONGHI; BOECHAT, 2005). Além disso, a presença das plantas de cobertura, em vinhedos, pode contribuir na redução dos efeitos fitotóxicos do excesso de metais, como o Zn, nas videiras, em decorrência da absorção e acúmulo dos metais nos tecidos destas plantas e também pela exsudação de íons e compostos orgânicos, como ácidos orgânicos de baixo peso molecular, resultando na modificação da concentração de ligantes orgânicos e no valor de pH da solução do solo, fatores estes que influenciam diretamente a solubilidade e distribuição das espécies solúveis de metais como o Zn (KIM et al., 2010; MEIER et al., 2012; DE CONTI et al., 2018).

O acúmulo de metais pesados no solo, ao longo das últimas décadas tem sido foco de diversos estudos pelo mundo. Na região Sul do Brasil um estudo conduzido por Mattias (2006), em solos de Microbacias com histórico de aplicação de dejetos líquidos de suínos foi dos trabalhos pioneiros relacionados ao acúmulo de metais pesados como o cobre (Cu), zinco (Zn), chumbo (Pb), níquel (Ni) e manganês (Mn) no solo. Posteriormente, um estudo sobre o acúmulo de Cu e Zn em um solo Argissolo submetido a sucessivas aplicações de dejetos líquidos de suínos no Rio Grande do Sul (RS), onde foram encontrados expressivos aumentos nas concentrações de ambos os elementos, contribuiu para o início de outros em solos de vinhedos contaminados. Tal estudo fazia parte da Dissertação de Mestrado de Girotto (2007). Em 2010 a Tese de Doutorado de Girotto (2010), estudou os efeitos do Cu em solos contaminados com Cu oriundos da região da Campanha e da Serra Gaúcha sobre plantas de aveia preta em condições controladas. Além disso, foi estudado o efeito do incremento de Cu e Zn em solo com histórico de aplicação de dejetos líquidos de suínos, sobre aspectos bioquímicos e fisiológicos em plantas. Já em 2012, Em, Miotto em sua Tese de Doutorado estudou o acúmulo de Cu no solo e seu efeito em plantas de videiras adultas em produção e plantas que coabitam os vinhedos, tanto em condições de campo, como em condições

controladas, especificamente com solos da região da Campanha Gaúcha do RS. Neste estudo, foi constatado que nos solos com longo histórico de cultivo de vinhedos estava ocorrendo além do acúmulo de Cu no solo, também o incremento dos teores de Zn. Isto motivou o início dos estudos com a combinação de doses (ou teores) de Cu e Zn em solos de vinhedos da região da Campanha Gaúcha. A primeira publicação do grupo de pesquisas sobre o tema foi derivada da Dissertação de Mestrado de Tadeu Luis Tiecher (2014). Neste estudo, foi coletado solo em um vinhedo contaminado com Cu na região da Campanha Gaúcha, onde foram adicionadas doses de Zn e estudados os efeitos da combinação de elevados teores de Cu e Zn sobre plantas de milho. Seguindo esta mesma linha de pesquisa foi elaborado o projeto da presente Tese de Doutorado, com o intuito de avaliar os efeitos da combinação de elevados teores de Cu e Zn em solos de vinhedos, sobre plantas de videiras jovens e plantas que coabitam os vinhedos como a aveia preta. A relevância deste estudo está no seu viés ambiental, visto que os relatos de solos contaminados com metais pesados no mundo têm sido cada vez mais frequentes, bem como pela importância da atividade vitivinícola para o estado do RS. As espécies nativas são observadas como plantas de cobertura de solo, coabitando os vinhedos na região da Campanha Gaúcha. Nas últimas décadas houve uma grande expansão do cultivo de uvas destinadas à elaboração de vinhos e espumantes. Isso ocorreu em áreas anteriormente ocupadas com campo natural do bioma Pampa, anteriormente utilizadas para pecuária extensiva, que a partir da década de 70 foram convertidas a vinhedos (TIECHER et al., 2017). A presença dessas espécies nas entrelinhas pode contribuir na redução dos efeitos fitotóxicos do excesso de zinco (Zn), causado pelas sucessivas aplicações de fungicidas contendo Zn para controle de doenças fúngicas foliares, como o míldio (*Plasmopora viticola*). Visto que as condições edafoclimáticas, principalmente os elevados índices pluviométricos da região da Campanha Gaúcha, favorecem o surgimento de doenças fúngicas. A toxidez de Zn ocasionada nas plantas de cobertura do solo pode causar prejuízos ao cultivo das videiras, uma vez que a redução da biomassa ou, até mesmo, a morte dessas plantas deixa o solo descoberto, ocasionando a menor ciclagem de nutrientes e o aumento do potencial de erosão (SANTOS et al., 2004). Além disso o excesso de Zn pode modificar a composição botânica dos campos nativos.

Espécies nativas do bioma Pampa, como *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum* e *Andropogon lateralis*, que naturalmente coabitam os vinhedos da região da Campanha Gaúcha, apresentam diferentes taxas de crescimento e atributos fisiológicos (QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009). O conhecimento das espécies que compõe as pastagens nativas e as diferentes estratégias de sobrevivência dessas plantas é importante para que futuras estratégias de manejo e restauração das pastagens naturais possam ser traçadas.

Com manejo adequado o uso forrageiro de espécies nativas pode ser altamente produtivo, além de manter a integridade dos ecossistemas campestres e demais serviços ambientais (OVERBECK et al., 2009). Além disso, as espécies nativas do bioma Pampa, em sua maioria, evoluíram em solos quimicamente pobres e ácidos, indicando a presença de mecanismos adaptativos às condições nutricionais adversas, que podem ser expressas quando submetidas a condições de toxidez por Al, mas também podem ser observadas para outros metais, como o Zn (TIECHER et al., 2017).

Portanto, considerando o aumento das contaminações do ambiente pelo excesso de Zn e o fato de, possivelmente, existir diferentes níveis de tolerância entre genótipos ou acessos de uma mesma espécie, torna-se relevante fazer a caracterização do efeito do excesso de Zn sobre os processos fisiológicos das espécies de gramíneas de cobertura do solo mais abundantes nos vinhedos, bem como identificar os possíveis mecanismos adotados pelas mesmas para contornar essa situação de estresse.

1.1 HIPÓTESES

As estratégias de crescimento das gramíneas do bioma Pampa, segundo atributos foliares (captura de recursos ou conservação de recursos), estão relacionadas à tolerância ao excesso de Zn.

Concentrações elevadas de Zn no meio aumentam a concentração de Zn nas plantas causando diminuição da fotossíntese e aumento do estresse oxidativo, sendo as gramíneas de conservação de recursos mais tolerantes ao excesso de Zn.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas fisiológicas de quatro gramíneas do bioma Pampa, caracterizadas por diferentes estratégias de crescimento, em relação ao excesso de Zn.

1.2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar respostas fisiológicas e bioquímicas em gramíneas nativas do bioma Pampa com diferentes estratégias de crescimento expostas a elevados níveis de Zn;

Analisar se a tolerância ao excesso de Zn em gramíneas nativas do bioma Pampa está relacionada aos atributos foliares.

Verificar se a tolerância ao Zn em diferentes espécies de gramíneas está relacionada ao sistema antioxidante das plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOMA PAMPA

O Brasil é mundialmente conhecido pelos seus diversos e extensos ecossistemas e pela alta biodiversidade dos mesmos. A cobertura vegetal natural do país é constituída por seis tipos de vegetações que incluem os seguintes biomas, seguindo uma ordem regressiva de extensão territorial nacional: Amazônia (49,5%), Cerrado (23,3%), Mata Atlântica (13%), Caatinga (10,1%), Pampa (2,3%) e Pantanal (1,8%). Além disso, o bioma Pampa, principal objeto deste estudo, possui extensão territorial em outros países como o Uruguai e Nordeste da Argentina. O Rio Grande do Sul é o estado brasileiro no qual este bioma está presente, recobrando 68,8% da área total do estado (IBGE, 2019).

Os campos nativos pertencentes ao bioma Pampa são caracterizados por possuir uma grande biodiversidade de espécies. Existem mais de 2.200 espécies campestres, muitas delas com alto valor forrageiro (BOLDRINI et al., 2010). Além disso, este bioma ainda guarda uma fauna muito diversificada, na qual estão inclusos insetos, como abelhas melíferas nativas, um grande número de pássaros, mamíferos e répteis, cujo habitat exclusivo são os campos naturais (NABINGER et al., 2009).

A grande diversidade de espécies vegetais encontrada nestes campos está ligada aos diversos tipos de solos e condições climáticas predominantes em cada região fisiográfica do Rio Grande do Sul (CARVALHO, 1997). A diversidade destes campos é evidenciada quando consideramos que a vegetação nativa deste estado faz parte de dois biomas distintos: Campos da metade sul e oeste do RS, com a paisagem dominada pela vegetação campestre e inserida no bioma Pampa e na porção norte do RS que faz parte do bioma Mata Atlântica (QUADROS et al., 2015).

A grande diversidade de espécies forrageiras dos campos naturais fez com que, historicamente, os campos do bioma Pampa apresentem relevância pelo seu uso econômico. Principalmente, em relação à atividade de produção de pecuária extensiva, em que temos um ecossistema onde predominam comunidades vegetais compostas em sua grande maioria por espécies de gramíneas e plantas herbáceas, o que permitiu que esta atividade desempenhasse um importante papel na forma de aproveitamento econômico destes campos (GONÇALVES; GIRARDI-DEIRO; GONZAGA, 1996) e conseqüentemente no desenvolvimento da sociedade.

Além disso, os campos naturais asseguram serviços ecossistêmicos insubstituíveis, como a proteção dos recursos hídricos, solos e a manutenção de espécies da fauna e flora, entre

outros (CAMPONOAE; KUPLICH; COSTA, 2018). Entretanto, históricos de práticas impróprias de manejo dos campos para a exploração de pecuária extensiva (manejo com alta carga animal), introdução de espécies forrageiras exóticas, uso indiscriminado de fogo e de herbicidas ao longo dos anos ameaçam a biodiversidade desses campos (DEVELEY et al., 2008). Sendo que, o principal fator que tem causado a crescente perda de área de campo nativo é a conversão destas áreas para produção de grãos (principalmente lavouras de soja, milho e arroz) ou de silvicultura (eucaliptos, pinus e acácia) (VÉLEZ-MARTIN et al., 2009). Essas mudanças no uso da terra e no uso insustentável dos campos nativos causam descaracterização da paisagem e perda da biodiversidade deste bioma (CARVALHO; BATELLO, 2009).

2.2 GRAMÍNEAS PERTENCENTES ÀS PASTAGENS NATURAIS DO BIOMA PAMPA

A biodiversidade dos campos nativos do Rio Grande do Sul é amplamente reconhecida e raramente encontrada em outros ecossistemas pastoris do planeta (QUADROS et al., 2015). Dentre a grande variedade de espécies encontradas nessas pastagens, as gramíneas (*Poaceae*) são importantes contribuintes para a produção de biomassa desses campos, podendo ser encontradas mais de 450 espécies (BOLDRINI, 1997), fato que caracteriza uma expressiva diversidade dessa família. Características das plantas da família *Poaceae*, como a multiplicação vegetativa acentuada (permitindo a rebrota após fogo ou consumo por animais herbívoros) e a polinização realizada pelo vento são fatores importantes para o desenvolvimento de ecossistemas campestres no mundo (PILLAR et al., 2009).

No entanto, ao mesmo tempo em que o ambiente é enriquecido com a biodiversidade presente nos campos nativos, o manejo pastoril se torna mais complexo devido a essa diversidade dos organismos vegetais, gramíneas, principalmente (QUADROS et al., 2015). Portanto, o conhecimento das espécies que compõe as pastagens nativas e as diferentes estratégias de sobrevivência dessas plantas é importante para que futuras estratégias para manejo e restauração das pastagens naturais possam ser traçadas. Além de que, com manejo adequado, o uso forrageiro de espécies nativas pode ser altamente produtivo, além de manter a integridade dos ecossistemas campestres e demais serviços ambientais (VALLS; POZZOBON, 2009).

Nesse sentido, compreendendo a heterogeneidade dos campos nativos, Quadros et al. (2006; 2008) propuseram a caracterização funcional de algumas espécies de gramíneas, levando em consideração o teor de massa seca das folhas (TMS) e a área foliar específica (AFE). Essa

abordagem leva em consideração que plantas com características morfológicas comuns, tendem a responder de maneira similar ao ambiente. Neste estudo, as diferentes espécies de gramíneas observadas em campos naturais do Rio Grande do Sul foram separadas em grupos de estratégia de conservação ou captura de recursos. Espécies de captura de recursos são caracterizadas por apresentarem maior AFE e menor TMS, o que confere a elas um crescimento mais acelerado e a senescência das folhas ocorre mais rapidamente. Em consequência dessas características, as gramíneas pertencentes a esse grupo reciclam mais rapidamente a biomassa e os nutrientes presentes no solo apresentando maior valor nutricional para os herbívoros (QUADROS et al., 2015).

Como exemplo do grupo de estratégia de captura de recursos destacamos as espécies *Axonopus affinis* popularmente conhecida como grama tapete. Essa espécie é caracterizada por possuir longos estolões e, geralmente, é encontrada em áreas de planície e que apresentam bom teor de umidade, e é beneficiada pelo pastejo pesado (DALL'AGNOL; NABINGER, 2008). Outra espécie classificada dentro do grupo das espécies de captura de recursos é a espécie *Paspalum notatum*. Conhecida como grama de forquilha, esta espécie é responsável pela cobertura de mais de 25% do solo das áreas campestres e base da produção pecuária sul-riograndense (BOLDRINI, 2009). Trata-se de uma espécie rizomatosa (caule subterrâneo), bem próxima à superfície o que confere a elas alta resistência ao pastejo contínuo e ao pisoteio (BOLDRINI; EGGERS, 1996).

O grupo de espécies de conservação de recursos é definido por espécies que formam touceiras e apresentam um maior TMS e menor AFE. Ou seja, esse grupo de espécies cresce mais lentamente, porém como as folhas são mais duradouras, essas espécies podem acumular uma maior reserva de pasto. Entretanto, esse pasto acumulado possui um menor valor nutricional e, conseqüentemente, não é selecionado pelos animais. Exemplo de espécie pertencente a este grupo é a espécie *Andropogon lateralis* conhecida popularmente como capim caninha, e apresenta ampla distribuição geográfica na região dos Campos Sulinos, preferencialmente em solos úmidos. É uma espécie particular pela sua plasticidade e capacidade em se adaptar a diferentes ambientes e é reconhecidamente peculiar por se adaptar a uma ampla gama de intensidades de pastejo (CARVALHO et. al., 2009).

Por exemplo, quando submetida uma baixa intensidade de pastejo essa espécie apresenta hábitos de crescimentos do tipo cespitoso, no entanto, quando a intensidade do pastejo é aumentada ela tende ao hábito de crescimento do tipo prostrado (TRINDADE; ROCHA, 2002). Isso devido ao fato de possuírem pontos de crescimento rente ao solo e assim conseguem

se proteger e se manter e, quando excluída do pastejo, a espécie pode formar touceiras altas (BOLDRINI; OVERBECK; TREVISAN, 2015).

A utilização desse agrupamento funcional, principalmente das gramíneas, pode auxiliar no manejo em cada área, tornando-o menos complexo para o produtor. Sendo assim, a baixa representatividade de áreas protegidas, somada às crescentes ameaças, torna urgente a adoção de ações práticas para a conservação do bioma. Na região da Campanha Gaúcha, principal região deste estudo, há a ocorrência de muitas gramíneas endêmicas e, devido às condições do solo (solos rasos), a vegetação nativa foi pouco transformada para outros usos. Nessa região, as espécies nativas são importantes plantas de cobertura de vinhedos e manutenção da cobertura vegetal, além do uso do campo nativo ou de pastagens, para controlar o crescimento da vegetação, reduzindo ou até mesmo erradicando a aplicação de herbicidas.

No entanto, devido à alta frequência de aplicação de fungicidas contendo metais pesados como princípios ativos e pelo escoamento desses elementos químicos das superfícies das folhas via água da chuva, pode ocorrer acúmulo destes metais a em solos de vinhedos ao longo dos anos.. O acúmulo desses metais ocorre principalmente nas camadas mais superficiais, com consequente aumento da disponibilidade às plantas, que causará toxidez às plantas de cobertura de vinhedos (BRUNETTO et al., 2014; COUTO et al., 2015). A toxidez ocasionada nas plantas de cobertura do solo, também pode causar prejuízos ao cultivo das videiras, uma vez que a redução da biomassa ou, até mesmo, a morte dessas plantas deixa o solo descoberto, ocasionando a menor ciclagem de nutrientes e o aumento do potencial de erosão (SANTOS et al., 2004).

2.3 A VITICULTURA NA CAMPANHA GAÚCHA E O ACÚMULO ZINCO EM SOLOS DE VINHEDO

A viticultura é uma atividade de grande importância econômica no Brasil. O estado do Rio Grande do Sul é o principal estado produtor no Brasil, representando, aproximadamente 70% da área vinícola nacional (EMBRAPA, 2019). Sendo que a principal e mais tradicional região produtora é a Serra Gaúcha (PROTAS, 2016). Porém, além da região serrana, outras regiões estão ganhando lugar de destaque na área vinícola, como a Campanha Gaúcha, que vem apresentando crescimento na produção de uvas para vinhos finos e espumantes de boa qualidade (MANFIO, 2018).

O crescente potencial da viticultura na Campanha Gaúcha está ligado a características edafoclimáticas da região como, por exemplo, os solos bem drenados e a topografia pouco

ondulada (facilitando a mecanização) e o clima por possuir boa incidência solar, invernos rigorosos e a variação da temperatura diária com dias quentes e noites frescas (SARMENTO, 2017). Além disso, é importante destacar que a expansão da atividade vinícola na região da Campanha gaúcha, ocorreu principalmente em grandes áreas anteriormente utilizadas para criação de gado, onde, predomina espécies nativas espontâneas do bioma Pampa (STEFANELLO et al., 2020). Portanto, as espécies pertencentes a esse bioma, desempenham importante papel como plantas de cobertura nas entrelinhas dos vinhedos.

O clima da região da Campanha Gaúcha é caracterizado por ocorrer precipitações anuais consideradas elevadas para a cultura da videira (TIECHER et al., 2017). Tal fato torna essa região favorável a ocorrência de doenças fúngicas nas folhas, principalmente mildio (*Plasmopara viticola*). Isto faz com que os viticultores realizem frequentes aplicações de fungicidas, como a calda bordalesa que tem como base o cobre (Cu) em sua composição (BRUNETTO et al., 2017). Conseqüentemente, as grandes quantidades de Cu destes fungicidas, aliado às sucessivas aplicações, podem ocasionar o acúmulo deste elemento no solo até níveis tóxicos as plantas, o que já acontece em muitas áreas desta região (TIECHER et al., 2017). Como alternativa aos fungicidas cúpricos, os produtores têm buscado produtos alternativos à calda bordalesa, como por exemplo, os fungicidas do grupo ditiocarbamatos, como o mancozeb. No entanto, estes produtos têm como constituinte o Zn. Portanto, tem sido observado também o acúmulo de Zn em solos de vinhedo (TIECHER et al., 2017).

O tipo de solo predominante da Campanha Gaúcha é o Argissolo, derivado de rochas sedimentares (arenito com alto teor de silício), predominando argilominerais do tipo 1:1, textura arenosa e baixo teor de matéria orgânica do solo (MOS) (STRECK et al., 2002). Nestes solos de vinhedos com textura arenosa e baixos teores de MOS, o Zn encontra-se nas camadas mais superficiais (BRUNETTO et al., 2014). Sendo assim, aplicações de fungicidas podem causar acúmulo e modificação de frações de metais pesados no solo, como o Zn (NEILSEN et al., 1986).

O Zn é retido no solo através de ligações físico-químicas e sua labilidade é dependente do ligante e do conteúdo de minerais. Em geral, alguns fatores regulam a sorção e a disponibilidade de Zn no solo. O pH do solo (BRADL, 2004; CHAIGNON et al., 2003), a CTC e a MOS são importantes fatores que regulam a sorção e a biodisponibilidade de Zn no solo (ARIAS et al., 2005; BRUN et al., 2001). Sendo que, o fator dominante que determina a disponibilidade de Zn no solo é o pH. Em ambientes com pH mais baixo esse elemento é mais disponível, especialmente em solos com baixo conteúdo de MOS (BRUN et al., 2001; CHAIGNON et al., 2003; PIETRZAK; MC PHAIL, 2004). A menor disponibilidade de Zn em condições alcalinas

é atribuída à precipitação de Zn como $Zn(OH)_2$ ou $ZnCO_3$ (SAEED, 1977). Além disso, a capacidade de sorção de Zn é maior quanto maior for o conteúdo de argilominerais, óxidos e hidróxidos de Fe, Al e Mn e carbonatos (MCBRIDE, 1994, BRADL, 2004; FERNÁNDEZ-CALVIÑO et al., 2010).

Devido à interação entre estes fatores físico-químicos, o Zn é encontrado em diferentes frações no solo, já que, naturalmente, eles são adsorvidos em diferentes graus de energia (CASALI et al., 2008; TIECHER et al., 2013; BRUNETTO et al., 2014; GIROTTO et al., 2014). Entretanto, no caso dos solos de vinhedos da Campanha Gaúcha, onde são realizadas aplicações frequentes de fungicidas, o teor de Zn no solo pode aumentar, modificando a distribuição das frações, aumentando a toxicidade para as plantas de videira (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010), além das plantas que coabitam os vinhedos.

O aumento das concentrações de Zn no solo, devido às aplicações frequentes de fungicidas, pode interferir na distribuição das suas frações no solo. Normalmente, a sorção do Zn no solo ocorre primeiramente nos sítios de ligação mais ávidos e, em seguida, os íons remanescentes são redistribuídos em frações que são retidas com menor energia e, conseqüentemente, de maior disponibilidade e mobilidade (TIECHER et al., 2013). A absorção de Zn ocorre como um cátion divalente ou como complexos com ligantes orgânicos, tende a ser linear com sua concentração na solução nutritiva ou no solo (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

2.4 ZINCO NO SOLO, TRANORTE E ABSORÇÃO EM PLANTAS

A entrada primária de Zn nos solos é proveniente do intemperismo químico e físico das rochas de origem do solo, além do suprimento através de fertilizantes e corretivos aplicados (BROADLEY et al., 2007). Geralmente a concentração de Zn nos solos varia de 10 a 300 mg kg^{-1} , dependendo do material de origem e da sua utilização, apresentando teor médio de 50 mg kg^{-1} (MOUSAVI, 2011). Por exemplo, solos derivados de rochas ígneas são mais ricos em Zn do que solos derivados de rochas sedimentares (ABREU; LOPES; SANTOS, 2007). Sendo encontrados valores de 70-80 $\mu g Zn g^{-1}$ nas rochas ígneas, enquanto as rochas sedimentares os valores são entre 10-120 $\mu g Zn g^{-1}$ (FRIEDLAND, 1990; BARAK; HELMKE, 1993; ALLOWAY, 1995). As principais formas que o Zn pode ser encontrado no solo são na solução do solo, na forma de íon Zn^{2+} principalmente e complexos solúveis, ou adsorvido pelos minerais de argila também na forma de íon Zn^{2+} , ou ainda fixado em complexos, na matéria orgânica e em minerais primários e secundários (LINDSAY, 1979).

As principais vias de contato íon-raiz são por fluxo de massa, interceptação radicular ou por difusão (SADEGHZADEH, 2013). O transporte de Zn para a superfície da raiz nos solos é feito predominantemente pelo mecanismo de difusão (MARSCHNER, 1993). Na planta, devido a sua natureza eletropositiva, o Zn não ocorre na forma reduzida, (ABREU; LOPES; SANTOS, 2007), portanto, a forma bivalente do Zn (Zn^{2+}) representa a principal forma de absorção deste elemento pelas plantas, o qual pode ser feito via foliar ou radicular (DECHEN; NACHTIGALL, 2006), sendo transportado até a parte aérea através do xilema. Além da forma de absorção da solução do solo como íon (Zn^{2+}), o Zn pode ser absorvido na forma de quelatos, e também via acidificação da rizosfera, decorrente da extrusão de íons H^+ pela planta e consequente acidificação do meio (DAKORA; PHILLIPS, 2002) e ainda pela produção de transportadores de membranas que contribuam para a absorção de Zn do meio externo para dentro da raiz (BROADLEY et al., 2007).

O transporte do Zn da raiz até o xilema pode ocorrer por duas vias. Através do contínuo citoplasmático das células da raiz ligadas por plasmodesmos (via simplasto) ou pode atingir o xilema através dos espaços extracelulares entre as células (via apoplasto) (WHITE et al., 2002). Uma vez no interior da planta, o Zn^{2+} , independente de como foi absorvido, é quelatizado a ligantes de baixo peso molecular, com a finalidade de evitar que ocorram ligações não específicas com moléculas celulares, para então ser transportado. Já no xilema, o Zn é transportado por fluxo de massa até chegar à parte aérea das plantas.

2.5 O ZINCO NAS PLANTAS

O Zn é o metal de número atômico 30 e o 23º elemento mais abundante na terra, sendo encontrado praticamente em todos os ambientes (CHANEY, 1993; BROADLEY et al., 2007). No metabolismo vegetal, a presença deste micronutriente é fundamental, pois o Zn está envolvido em muitos processos biológicos, como defesa antioxidante, síntese proteica, metabolismo de carboidratos, metabolismo de auxinas e estabilidade do material genético (CLEMENS, 2001).

Além disso, como o Zn é necessário para a síntese do triptofano (BROWN et al., 1993; ALLOWAY, 2004), que é um precursor do ácido indol acético (AIA), esse metal também tem um papel ativo na produção de auxina, um hormônio essencial do crescimento (BRENNAN, 2005). Algumas enzimas apresentam o Zn na sua estrutura, tais como, álcool desidrogenase, Cu-Zn superóxido dismutase e anidrase carbônica. Enquanto que outras enzimas utilizam o Zn como cofator como, por exemplo, as aldolases, isomerases, peptidases, transfosforilases e RNA

e DNA polimerases (BUCHANAN et al., 2001). Tais eventos são direta ou indiretamente grandes influenciadores do crescimento vegetal (FAQUIN, 2005).

A integridade das membranas celulares também exige que o Zn preserve a orientação estrutural das macromoléculas e mantenha os sistemas de transporte de íons (CAKMAK, 2000; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; ALLOWAY, 2004; DANG et al., 2010; DISANTE et al., 2010). Portanto, plantas em condições de excesso ou deficiência deste elemento terão suas atividades metabólicas modificadas. Concentrações entre 30 e 100 mg Zn kg⁻¹ de massa seca são suficientes para suportar o adequado desenvolvimento da planta para a maioria das culturas agrícolas (RODRIGUES et al., 1997).

Apesar da deficiência de Zn ser mais difundida do que a toxicidade, a contaminação do solo por Zn tem sido uma das principais preocupações ambientais (ZARCINAS et al., 2004), devido ao crescente incremento deste metal nos solos através, principalmente, das atividades antrópicas como o uso de fertilizantes e fungicidas. As respostas nos níveis bioquímicos e fisiológicos variam de acordo com a espécie, órgão da planta, a concentração do elemento e a tolerância do tecido a altos níveis de Zn (CAMBROLLÉ et al., 2012). Em espécies sensíveis, concentrações nos tecidos entre 150-200 mg Zn kg⁻¹ provocam redução do crescimento das plantas (KABATA-PENDIAS, 2011), embora alguns cultivos apresentem sintomas de toxicidade na folha quando menores que 100 mg Zn kg⁻¹ da massa seca (CHANEY, 1993; MARSCHNER, 1995).

Além do que os limites de toxicidade podem ser altamente variáveis mesmo dentro da mesma espécie. Por exemplo, um estudo realizado com azevém exposto a concentrações de Zn a diminuição do crescimento ocorreu em 1-10 mM, com uma inibição total do crescimento em 50 mM de ZnSO₄ (BONNET et al., 2000). E uma leguminosa como a ervilha (*Pisum sativum*), o crescimento foi inibido após a aplicação de 1000 µM de Zn (DONCHEVA et al., 2001). Em cana de açúcar doses de 65 e 130 mg L⁻¹ podem desencadear redução do crescimento, folhas verde-escuras, número e comprimento de raízes diminuídos e acentuada depressão na atividade mitótica das raízes (JAIN et al., 2010).

O excesso de Zn possui efeito negativo na nutrição mineral e atividades enzimáticas relacionadas ao metabolismo vegetal (VAN ASSCHE; CLIJSTERS, 1986; CHAOUI et al., 1997), principalmente devido à queda do desempenho fotossintético, afetando as reações fotoquímicas (VAN ASSCHE; CLIJSTERS, 1986), atividade da anidrase carbônica (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2005), biossíntese de clorofilas (VAN ASSCHE; CLIJSTERS, 1986). Além disso, ocorrem também efeitos negativos sobre a integridade da membrana (DE MAGALHÃES et al., 2004), conseqüentemente, interferindo na absorção de solutos, transporte e regulação

osmótica (CHERIF et al., 2010), aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e inibem ou incrementam a atividade enzimática (GRATÃO et al., 2005; LIN et al., 2005).

O primeiro sintoma a se apresentar na maioria das espécies que exibem toxicidade ao Zn é uma clorose geral das folhas mais jovens (HARMENS et al., 1993; REN et al., 1993; FONTES; COX, 1995). Dependendo do grau de toxicidade, essa clorose pode progredir para avermelhamento devido à produção de antocianina nas folhas mais jovens (HARMENS et al., 1993; FONTES; COX, 1995; LEE et al., 1996). Nas raízes, a toxicidade do Zn é aparente como uma redução no crescimento da raiz principal, menos e menores raízes laterais e amarelecimento das raízes (REN et al., 1993).

Para proteger suas células dos efeitos tóxicos das ERO, as plantas dispõem de um sistema de defesa antioxidante não enzimático e enzimático, que trabalham em conjunto e em sincronia detoxificando as ERO produzidas e fazendo com que as plantas superem a situação de estresse e recuperem a homeostase celular (MARTINEZ et al., 2010). Dentre os principais metabólitos antioxidantes não enzimáticos, encontram-se o ácido ascórbico (AsA) e a glutatona (GSH), alfa-tocoferol e os carotenoides. Nas plantas, o aumento na concentração dessas moléculas pode indicar um aumento na tolerância ao estresse por metais (DIETZ et al., 1999). Já a defesa antioxidante enzimática compreende a atividade de várias enzimas, destacando-se tais como catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) (ASADA 1987; FOYER; HARBINSON, 1994).

Os sintomas de deficiência de Zn são observados quando o teor do elemento na planta se encontra abaixo de concentrações que variam de 15 a 20 mg Zn kg⁻¹ de massa seca (MS) (SINCLAIR; KRAMER, 2012), sendo que tais sintomas aparecem principalmente nas folhas novas, devido à baixa redistribuição de Zn nas plantas. O aparecimento de manifestações de deficiência pode variar em função das condições ambientais, idade da planta, severidade da deficiência, além da oferta de outros nutrientes (SADEGHZADEH, 2013).

Sua deficiência resulta no desenvolvimento de anormalidades nas plantas como crescimento atrofiado, clorose e folhas menores. O maior dano que a baixa oferta de Zn causa nas plantas está relacionado com o metabolismo das proteínas, pois sua ausência afeta a estrutura do DNA e do RNA, danificando a estabilidade e a função das proteínas sintetizadas e, conseqüentemente, atuando negativamente na expressão e regulação gênica (MARSCHNER, 1995). Além disso, deficiência de Zn afeta o desenvolvimento das raízes (FAGERIA, 2004), prejudicando a absorção de água e de nutrientes dos solos e, conseqüentemente, resultando em redução do crescimento e da produção do cultivo (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

2.6.1 *Axonopus affinis* Chase

O gênero *Axonopus* importante componente da diversidade da vegetação campestre brasileira. A *Axonopus affinis* Chase conhecida popularmente por “grama-tapete” trata-se de uma espécie perene de estação quente, estolonífera, encontrada nos campos nativos do RS. É uma espécie caracterizada por estratégia de crescimento de captura de recursos (QUADROS TRINDADE; BORBA, 2009). Desenvolve-se em áreas com bom teor de umidade (várzeas e baixadas), com baixa fertilidade de solo, no entanto, responde rapidamente a adubação (MARASCHIN, 2009). Além disso, é uma espécie que se beneficia pelo pastejo pesado além de possuir alta tolerância ao pisoteio e rápida recuperação em episódio de fogo (DALL’AGNOL; NABINGER, 2008).

A *A. affinis* faz parte de um grupo de espécies que apresentam alta frequência na vegetação estabelecida e alta taxa de frutificação, o que contribui para a alta frequência no banco de sementes do solo (GARCIA, 2005). Em um sistema de manejo com pastoreio contínuo onde não existem períodos de descanso na pastagem há a influência da composição botânica dos campos, favorecendo espécies prostradas como a *A. affinis* e *Paspalum notatum*. Isso ocorre, pois os rebrotes dessas espécies não dependem de substâncias de reserva, mas sim da área foliar remanescente, sendo mais sensíveis à competição por luz do que espécies eretas (MILLOT, 1991).

2.6.2 *Paspalum notatum* Flügge

O gênero *Paspalum* destaca-se por possuir grande número de espécies e também o maior número de espécies com bom valor forrageiro (VALLS; POZZOBON, 1987). São mais de 400 espécies tropicais e subtropicais pertencentes a esse gênero (STRAPASSON et al., 2000), onde a maioria dessas espécies apresentam modo de reprodução apomítico (QUARÍN; NORMANN, 1990), garantindo a homogeneidade genética das populações.

As espécies de *Paspalum* encontram-se distribuídas em praticamente todos os campos naturais sul-americanos e, muitas vezes, são as espécies predominantes e responsáveis pela maior parte da biomassa produzida (SANTOS, 2005). A espécie *Paspalum notatum* Flügge é

popularmente conhecido como “grama-forquilha” ou “grama batatais”. Trata-se de uma gramínea típica com rizoma, perene e nativa da América do Sul. Seu centro de origem é considerado sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e Paraguai (GATES et al., 2004). No Brasil, a espécie melhor se adapta às condições de clima e solo da região Sul do país (FONTANELI; SCHEFFER-BASSO, 1995), contudo, podem ser cultivadas em quase todos os ecossistemas do país (NABINGER, 2006).

A *P. notatum* caracteriza-se por ser uma planta rústica com adaptações às mais variadas condições de solo e clima além de ser muito resistente ao pisoteio devido ao fato de possuir rizomas bem próximos à superfície (FONTANELI et al., 2012). Desenvolve-se em diferentes tipos de solo, em especial solos mais secos, arenosos e, por vezes, com baixa fertilidade natural (DALL’AGNOL et al., 2006) além de tolerar solos de pH baixo. Devido à posição ocupada pelos pontos de crescimento que frequentemente estão inseridos no solo, são necessários baixos níveis de controle de pragas, além de tolerar cortes baixos e frequentes tornando-os praticamente impossíveis de serem removidos (DALL’AGNOL et al., 2006). Além disso, outra característica desta espécie é sua adaptação ao aumento da intensidade de desfolha, em que, essa espécie modifica seu aparato fotossintético através “miniaturização” de suas estruturas (DÍAZ et al. 1998).

2.6.3 *Paspalum plicatum* Michx

Paspalum plicatum Michx é popularmente conhecida como “grama-colchão” caracteriza-se por ser uma espécie perene e cespitosa, suas lâminas foliares apresentam a nervura principal translúcida na face ventral, enquanto na dorsal é muito saliente (BOLDRINI et al., 2006). As plantas podem chegar a até 120 cm de altura e o pico do crescimento ocorre no verão, sendo lento no início da primavera e diminuindo a partir da floração (SKERMAN; RIVEROS, 1992). Além disso, possui elevado afilhamento e forma touceiras compactas a partir de brotações basais, em hábito tipicamente cespitoso. Apresenta lignificação na base da lâmina folhar, o que poderia dificultar a remoção total das folhas, mas é muito bem aceita e consumida pelos animais (MARASCHIN, 2009).

É uma das gramíneas mais frequentes nos campos do sul do Brasil (DALL’AGNOL; NABINGER, 2008), habitando desde os campos arenosos aos duros e argilosos (ARAÚJO, 1971) além de ser bastante tolerante a seca. De acordo com Maraschin (2009) a *P. plicatum* parece ser uma espécie que se beneficia com o pastejo mais folgado, pois o autor observou incrementos importantes no número de indivíduos e na sua cobertura, após dois a três anos de

pastejo leve. Isso é atribuído à vegetação herbácea mais vigorosa, o que possibilita uma maior produção de sementes e conseqüentemente um maior número de indivíduos na pastagem.

Assim como a *A. lateralis*, a espécie *P. plicatulum* é caracterizada como de conservação de recursos, sendo que em maiores intensidades de desfolha, reduzem o comprimento e a espessura das lamina foliares, reduzindo também a emissão de colmos floríferos, mantendo suas reservas em tecidos meristemáticos próximos à superfície do solo (CARVALHO et al., 2006; NABINGER 2006).

2.6.4 *Andropogon lateralis* Nees

Na América do Sul, o Brasil destaca-se com o maior número de 38 espécies do gênero *Andropogon* sendo que a espécie *Andropogon lateralis* é a mais comuns no estado do RS. Essa espécie é popularmente conhecida como “capim-caninha”, “capim-taquara” ou “taquari” (ARAÚJO, 1971). São plantas perenes, hábito de crescimento cespitoso que formam touceiras características de cor verde acinzentado e apresentam inflorescências plumosas (ARAÚJO, 1971). São encontradas em campos úmidos ou secos e predominam em áreas excluídas do pastejo (BOLDRINI; EGGERS 1996). A máxima produção de forragem dessa espécie ocorre na primavera-verão e o florescimento ocorre em boa parte do ano (exceto no inverno) (ARAÚJO, 1971).

Com base nos tipos funcionais e de acordo com proposição de Cruz et al. (2010), a *A. lateralis* é uma espécie que apresenta elevada plasticidade fenotípica, se enquadrando com hábito de crescimento caracterizado como uma planta conservadora de recursos, dependendo das condições ambientais e do manejo aplicado, pois trata-se de uma planta com ampla capacidade de adaptação (CARVALHO et al., 2009). Por exemplo, submetida a uma baixa intensidade de pastejo apresenta hábito de crescimento cespitoso, porém à medida que aumenta a intensidade de pastejo essa espécie tende ao hábito de crescimento prostrado (SANTOS, 2014).

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. A.; LOPES, A. S.; SANTOS, G. C. G. Micronutrientes. In: NOVAIS, R. F. et al. (eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, SBCS, p.645-736, 2007.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. 2nd ed. London: Springer, 1995.
- ALLOWAY, B. J. **Zinc in Soils and Crop Nutrition**. International fertilizer Industry Association and International Zinc Association, Brussels, Belgium and Paris, 135p, 2004.
- ARAÚJO, A. A. **Principais Gramíneas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Editora Sulina, 1971.
- ARIAS, M. et al. Adsorption and desorption of copper and zinc in the surface layer of acid soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, n.1, p. 21-29, 2005.
- ASADA, K.; The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In: Scandalios JG (ed) **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidante defenses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA, p.715–735, 1987.
- BARAK, P.; HELMKE, P. A. The chemistry of Zinc. In: **Zinc in Soils and Plants**. (ed.) A.D. Robin. Dordecht: Kluwer Academic Publishers, 1993.
- BOLDRINI, I. I.; EGGERS, L. Vegetação campestre do Sul do Brasil: resposta e dinâmica de espécies à exclusão. **Acta Botanica Brasilica**, v.10, n.1, p.37-50, 1996.
- BOLDRINI, I. I. Campos do Rio Grande do Sul: caracterização fisionômica e problemática ocupacional. **Boletim do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.56, 39p, 1997.
- BOLDRINI, I. I.; LONGHI, W. H. M.; BOECHAT, S. C. **Morfologia e Taxonomia de Gramíneas Sul-Rio-Grandenses**. Porto Alegre, Ed. da Universidade/UFRGS, 96p, 2005.
- BOLDRINI, I. I. Biodiversidade dos Campos Sulinos. In: **Simpósio de Forrageiras e Produção Animal - Ênfase: Importância e Potencial Produtivo da Pastagem Nativa** (eds. Dal'Agnol M, Nabinger C, Rosa LMG, Silva JLS, Santos DT & Santos RJ). UFRGS, Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Porto Alegre, pp. 11-24, 2006.
- BOLDRINI, I. I. A Flora dos Campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar, V. P.; Muller, S. C.: Castilhos, Z. M. S.; Jacques, A. V. (Org.). **Campos Sulinos - Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade**. 2 ed. Brasília, DF: MMA, v. 1, p. 63-77, 2009.
- BOLDRINI, I. I. et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre, Ed. Palotti, p.64, 2010.
- BOLDRINI, I. I.; OVERBECK, G.; TREVISAN, R. **Biodiversidade das plantas**. Cap 5. Os Campos do Sul. Rede Campos Sulinos - UFRGS, Porto Alegre, 192 p. 2015.

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

BRENNAN, R. F. **Zinc Application and Its Availability to Plants**. Ph. D. dissertation, School of Environmental Science, Division of Science and Engineering, Murdoch University, 2005.

BROADLEY, M. R. et al. Tansley review Zinc in plants. **Journal compilation - New Phytologist**, v. 173, n.1, p. 677-702, 2007.

BRUN, L. A. et al. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. **Environmental Pollution**, v.111, n.2, p.293-302, 2001.

BROWN, P. K.; CAKMAK, I.; ZHANG, Q. L. **Form and function of Zinc plant**. In Robson A D. Kluwer (ed). Zinc in soil and plants. Dordrecht: Academic Publishers. 93-106, 1993.

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

BRUNETTO, G. et al. Metais pesados em solos de vinhedos e pomares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.39, n.2, e-263, 2017.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, L. J. **Biochemistry and molecular biology of plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1367 p. Parte 1: Compartments. 2001.

CAKMAK, I. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. *The New Phytologist*, v.146, n.2, p.185-205, 2000.

CAMBROLLÉ, J. et al. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, v.86, n.9, p.867-874, 2012.

CARVALHO, P. C. F. A estrutura da pastagem e o comportamento ingestivo de ruminantes em pastejo. In: **Simpósio sobre avaliação de pastagens com 19 animais**, 1, Maringá-PR. p. 25-52, 1997.

CARVALHO, P. C. F.; SANTOS, D. T.; NEVES, F. P. Oferta de forragem como condicionadora da estrutura do pasto e do desempenho animal. In: **II Simpósio de Forrageiras e Produção Animal – Ênfase: Sustentabilidade Produtiva do Bioma Pampa** (eds. Dal’Agnol M, Nabinger C, Sant’ana DM & Santos RJ). Metrópole, Porto Alegre, p.23-59, 2006.

CARVALHO, P. C. F.; BATELLO, C. Access to land, livestock production and ecosystem conservation in the Brazilian Campos biome: The natural grasslands dilemma. **Livestock Science**, v.120, n.1-2, p.158-162, 2009.

CARVALHO, F. P. C. et al. Lotação animal em pastagens naturais: políticas, pesquisas, preservação e produtividade. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009.

CASALI, C. A. et al. Copper forms and desorption in soils under grapevine in the Serra Gaúcha of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.32, n.4, p.1479-1487, 2008.

CHAIGNON, V. et al. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. **Environmental Pollution**, v.123, n.2, p.229-238, 2003.

CHAOUI, A. et al. Indução de cádmio e zinco da peroxidação lipídica e efeitos nas atividades de enzimas antioxidantes no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v.127, n.2, p.139-147, 1997.

CHANEY, R. L. **Plant uptake of inorganic waste constituents**. In: Parr JF, Marsh PB, Kla JM, eds. Land treatment of hazardous wastes. Park Ridge, NJ, USA: Noyes Data Corporation, p.50-76, 1993.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v.212, n.4, p.475-486. Mar. 2001.

COUTO, R. R. et al. Accumulation of copper and zinc fractions in vineyard soil in the midwestern region of Santa Catarina, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v.73, n.10, p.6379-6386, 2015.

DAKORA, F. D.; PHILLIPS, D. A. Exsudatos de raiz como mediadores da aquisição de minerais em ambientes de baixo nutriente. **Plant and Soil**, v.245, n.2, p.35-47, 2002.

DALL'AGNOL, M.; NABINGER, C. Principais gramíneas nativas do RS: características gerais, distribuição e potencial forrageiro. In: **Simpósio de forrageiras e produção animal**, 3, Anais... Porto Alegre: UFRGS. p.7-54, 2008.

DALL'AGNOL, M. et al. Perspectivas de lançamento de cultivares de espécies forrageiras nativas: o gênero *Paspalum*. In: **I Simpósio de Forrageiras e Produção Animal**. Anais... Porto Alegre UFRGS, p. 149-162. 2006.

DANG, H. R. et al. Absorption, accumulation and distribution of zinc in highly-yielding winter wheat. **Agricultural Sciences in China**, v.9, n.7, p.965-973, 2010.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.327-354, 2006.

DE MAGALHÃES, C. C. P. et al. Physiological and photosynthetic responses of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) to elevated levels of zinc. **Journal of Phycology**, v.40, n.3, p.496-504, 2004.

DEVELEY, F. P. et al. Conservação das aves e da biodiversidade no bioma Pampa aliada a sistemas de produção animal. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.16, n.4, p. 308-315, 2008.

DÍAZ, S.; CABIDO, M.; CASANOVES, F. Plant functional traits and environmental filters at a regional scale. **Journal of Vegetation Science**, v.9, n.1, p.113-121. 1998.

DIETZ, K. J.; BAIER, M.; KRÄMER, U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: PRASAD, M. N. V.; HAGEMEYER, J. (Eds.). **Heavy metal stress in plants: from molecule to ecosystems**. Berlin: Springer, p.73-97,1999.

DISANTE, K. B.; FUENTES, D.; CORTINA, J. Response to drought of Zn-stressed *Quercus suber* L. Seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.70, n.1, p.96-103. 2010.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives**. Sinauer Assoc, 2005.

FAGERIA, N. K. Dry matter yield and nutrient uptake by lowland rice at different growth stages. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.6, p.947-958, 2004.

FAQUIN, V. *Nutrição Mineral de Plantas / Valdemar Faquin*. Lavras: UFLA / FAEPE. p.: il. - Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente. 2005.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D. et al. Influence of humified organic matter on copper behavior in acid polluted soils. **Environmental Pollution**, v.158, n.12, p.3634-3641, 2010.

FONTANELI, R. S.; SCHEFFER-BASSO, S. M. **Cadeia forrageira para o Planalto Médio**. In: FEDERACITE. Cadeias forrageiras regionais. Porto Alegre, p. 43- 83, 1995.

FONTANELI, R. S. et al. **FORAGEIRAS PARA INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA-FLORESTA NA REGIÃO SUL-BRASILEIRA**. Embrapa Trigo. 2. ed. Brasília, DF, 544p, 2012.

FONTES, R. L. F.; COX, F. R. Effects of sulfur supply on soybean plants exposed to zinc toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, n.9, p.1893-1906, 1995.

FOYER C. H.; HARBINSON J. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Foyer CH, Mullineaux PM, ed. **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. CRC Press, Boca Raton, p.1-42. 1994.

FRIEDLAND A. J. 1990. The movement of metals through soils and ecosystems. In: Shaw AJ, ed. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 7–19.

GARCIA, E. **Subsídios à conservação de campos no norte da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil**. Tese de doutorado, PPG Botânica, UFRGS, Porto Alegre, p. 110, 2005.

GATES, R. N.; QUARÍN, C. L.; Pedreira, C. G. S. 2004. Bahiagrass. In L. E. Moser, B. L. Burson & L. E. Sollenberger (eds.). *Warm-Season (C 4) Grasses*. **Agronomy Monographs 45**. Madison, Wisconsin: ASA-CSSA-SSSA. p. 651-680, 2004.

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

GONÇALVES, J. O. N.; GIRARDI-DEIRO, A. M.; GONZAGA, S. S. **Efeito do diferimento estacional sobre a produção e composição botânica de dois Campos naturais, em Bagé, RS.** EMBRAPA Pecuária Sul, Bagé, 1996.

GRATÃO P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.

HARMENS, H. et al. Uptake and transport of zinc in zinc-sensitive and zinc-tolerant *Silene vulgaris*. **Journal of Plant Physiology**, n.141, n.3, p.309-315. 1993.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Os biomas continentais do território brasileiro (2019). Acesso em: 19 fev 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/estudos-ambientais/15842biomas.html?edicao=16060&t=sobre>

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 Physio Plant**, v.32, n.1, p979-986, 2010.

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

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants.** CRC Press, Boca Raton-London - New York, 2001.

LEE, C. W. et al. Induced micronutrient toxicity in 'Towndown' Kentucky bluegrass. **Crop Science**, v.36, n.1, 705-712, 1996.

LIN, C. W.; CHANG, H. B.; HUANG, H. J. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. **Plant Physiol Biochem**, v.43, n.1, p.963-968, 2005.

LINDSAY, W. L. **Chemical Equilibria in Soils.** John Wiley and Sons, New York. 1979.

MANFIO, V. **Vitivinicultura e associativismo: a dinâmica da associação vinhos da campanha na formação de um território no rio grande do Sul, Brasil.** Tese (doutorado em geografia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 260p, 2018.

MARASCHIN, G. E. Manejo do campo nativo, produtividade animal, dinâmica da vegetação e adubação de pastagens nativas do sul do Brasil. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável de biodiversidade.** Brasília: MMA, 403p, 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants.** Academic Press, Hohenheim, 889p, 1993.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants.** 2ed. Academic Press, London, 1995.

MARTINEZ, C. A.; SORIANI, H. H.; FAVARETTO, V. F. Mecanismos de defesa das plantas a estresses. In: PRADO, R. M. et al. (Eds.) **Nutrição de plantas: diagnose foliar em hortaliças.** Jaboticabal: FCAV/FAPESP/CAPES/Fundunesp, p.63-90, 2010.

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

MILLOT, J. C. **Manejo del pastoreo y su incidencia sobre la composición botánica y productividad del campo natural: Pasturas y producción animal em áreas de ganadería extensiva**. Montevideo, Uruguay: INIA, (Série técnica, 13), 266p, 1991.

MOUSAVI, S. R. Zinc in crop production and interaction with phosphorus. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, n.9, p.1503-1509. 2011.

NABINGER, C. Manejo e produtividade das pastagens nativas do subtropico brasileiro. In: **I Simpósio de Forrageiras e Produção Animal** (Anais...). UFRGS, Porto Alegre, p. 25-76, 2006.

NABINGER, C. et al. **Produção animal com base no campo nativo: aplicações de resultados de pesquisa**. In: PILLAR, V. P. et al. (Ed.). Campos Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: MMA, p.175-198, 2009.

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

NEILSEN, D.; HOYT, P. B.; MacKENZIE, A. F. Distribution of soil Zn fractions in British columbia interior orchard soils. **Canadian Journal Soil Science**, v.66, n.1, p.445-54, 1986.

OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C.; FIDELIS, A. **Os Campos Sulinos: um bioma negligenciado**. In: V.D.P. PILLAR, ET AL. 2009.

PIETRZAK, U.; Mc PHAIL, D. C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. **Geoderma**, v.122, n.2-4, p. 151-166, 2004.

PILLAR, V. D. et al. **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p.403, 2009.

PROTAS, J. F. S. A dinâmica evolutiva da vitivinicultura brasileira Cenários 2004- 2014. **Revista de Política Agrícola**, v. 25, n. 1, p. 47-54, 2016.

QUADROS F. L. F. et al. Uso de tipos funcionais de gramíneas como alternativa de diagnóstico da dinâmica e do manejo de campos naturais. In: **Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Sociedade Brasileira de Zootecnia, João Pessoa, pp. 1-4, 2006.

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: JACQUES, V. D. P. P. S. C. M. Z. M. DE S. C. A. V. Á. (Ed.). **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. 1. ed. Brasília: p. 208-215, 2009.

QUADROS, F. L. F.; GAROGORRY, F. C.; ROSSI, G. E. Consistência dos tipos funcionais formados a partir dos atributos morfológicos: área foliar específica e teor de matéria seca. In: **Reunião Técnica do Grupo Campos-Cone Sul** (Anais...). Instituto Nacional de Investigação Agropecuária, Treinta y Tres, Minas, Uruguai, 2008.

QUADROS, F. L. F. et al. Cuidar e fazer diferente. In: PILLAR, V.P.; LANGE, O. **Os Campos Do Sul**. 1ed. Porto Alegre: UFRGS, v.1, p.141-147, 2015.

QUARÍN, C. L.; NORMANN, G. A. Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. **Botanical Gazette**, v.151, n.3, p.366-369, 1990.

REN, F. et al. Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one-year old American ginseng plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.16, n.2, p.393-405, 1993.

RODRIGUES, L. A. et al. Absorção e translocação de Zn em feijoeiro aplicado via foliar. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n. 2, p.111-115, 1997.

SAEED, M.; FOX, R. L. Relation between suspension pH and Zn solubility in acid and calcareous soils. **Soil Science**, v.124, n.4, p.199-204, 1977.

SADEGHZADEH, B. A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of soil science and plant nutrition**, v.13, n.4, p.905-927, 2013.

SANTOS, G. C. G. D. **Comportamento de B, Zn, Mn, e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico**. Tese de Doutorado. Curso de Agronomia, Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 2005.

SANTOS, H. P. et al. **Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho (Comunicado Técnico, 49). 11 p, 2004.

SANTOS, A. B. DOS et al. Morfogênese de gramíneas nativas do Rio Grande do Sul (Brasil) submetidas a pastoreio rotativo durante primavera e verão. **Ciência Rural**, v.44, n.1, p.97-103, 2014.

SARMENTO, M. B. **Diagnóstico da cadeia da vitivinicultura na campanha gaúcha: potencialidades para o desenvolvimento regional**. Bagé: Ediurcamp, 88p, 2017.

SHAHEEN, S. M.; TSADILAS, C. D.; RINKLEBE, J. Immobilization of soil copper using organic and inorganic amendments. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.178, n.1, p.112-117, 2015.

SINCLAIR, S. A., KRÄMER, U. The zinc homeostasis network of land plants. **Biochim Biophys Acta**, v.1823, n.12, p. 1553-1567, 2012.

STRAPASSON, E.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.373-381, 2000.

SKERMAN, P. J.; RIVEROS, F. **Gramíneas tropicales**. FAO, Roma, 866p, 1992.

STEFANELLO, L. O. et al. Nitrogen supply method affects growth, yield and must composition of young grape vines (*Vitis vinifera* L. cv *Alicante Bouschet*) in southern Brazil. **Scientia Horticulturae**, v.261, n.5, p.108910, 2020.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Emater/RS – UFRGS, 126p, 2002.

THORESBY, P.; THORNTON, I. Heavy metals and arsenic in soil, pasture herbage and barley in some mineralised areas in Britain. In: D. D. Hemphill (Ed.). Trace Subst. Environ. Health, Vol. 13. University of Missouri, Columbia, MO, 1979.

TIECHER, T. et al. Forms and accumulation of copper and zinc in a sandy Typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, n.3, p.812-24, 2013.

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, n.1, p. 203-212, 2017.

TRINDADE, J. P. P.; ROCHA, M. G. Rebrotamento de Capim Caninha (*Andropogon Lateralis* Nees) sob o efeito de pastejo e fogo. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.141-146, 2002.

WHITE, G. M.; BOSCHER, D. H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilia* Zuccarini. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.99, n.4, p.2038-2042, 2002.

VALLS, J. F. M.; POZZOBON, M. T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: **Anais do Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de Paspalum**, Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. 15-21p, 1987.

VAN ASSCHE. F.; CLIJSTERS, H. Inibição da fotossíntese em *Phaseolus vulgaris* por tratamento com concentração tóxica de zinco: efeitos no transporte de elétrons e fotofosforilação. **Physiologia Plantarum**. v.66, n.2, p.17-721, 1986.

VÉLEZ-MARTIN, E. et al. **Conversão e fragmentação**. Os Campos do Sul/Editores: Valério De Patta Pillar e Omara Lange. – Porto Alegre: Rede Campos Sulinos - UFRGS, 192p, 2009.

ZARCINAS, B. A. et al. Heavy metals in soils and crops in Southeast Asia 2. **Thailand. Environmental Geochemistry and Health**, v.26, n.1, p. 359-371, 2004.

3 MANUSCRITO I

RESUMO

ESTRATÉGIAS DE CRESCIMENTO DE GRAMÍNEAS NATIVAS DA AMÉRICA DO SUL E AS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO EXCESSO DE ZINCO EM HIDROPONIA

AUTOR: GABRIELA DESCOVI MILANESI
ORIENTADOR: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO

A aplicação de fungicidas contendo Zinco (Zn) utilizados para o manejo das doenças foliares nas videiras (*Vitis vinifera*) aumenta os teores de Zn nos solos de vinhedos. O acúmulo de Zn no solo pode atingir níveis tóxicos às videiras e plantas decobertura do solo que coabitam os vinhedos. Espécies nativas do Bioma coabitam espontaneamente os vinhedos da região da Campanha Gaúcha e são manejadas como plantas de cobertura de solo. Visto que, a expansão da viticultura na região da Campanha Gaúcha ocorreu sobre áreas de pastagem nativa do Bioma Pampa. O zinco (Zn) é um metal pesado que em concentrações excessivas é tóxico para humanos, animais e vegetais. O objetivo do estudo foi caracterizar as respostas fisiológicas de quatro espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa, expostas ao excesso de Zn, bem como avaliar quais as espécies são mais adaptadas para essa condição. O estudo foi conduzido em sistema de cultivo hidropônico contendo três concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) e quatro espécies de gramíneas (*Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Axonopus affinis* e *Andropogon lateralis*). Aos 40 dias de cultivo, foram determinados as trocas gasosas (taxa de assimilação líquida de CO_2 , condutância estomática, concentração intercelular de CO_2 , eficiência do uso da água e eficiência instantânea da carboxilação da rubisco), massa seca, parâmetros biométricos do sistema radicular, atributos bioquímicos (enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, conteúdo de peróxido de hidrogênio, concentração de pigmentos fotossintéticos), concentrações de Zn e nutrientes nos tecidos das plantas. O incremento das concentrações de Zn na solução nutritiva aumentou a concentração de Zn nas raízes e parte aérea das quatro espécies, no entanto, não ocasionou alteração no crescimento em biomassa. A taxa de assimilação líquida de CO_2 foi aumentada com o acréscimo das concentrações de Zn para todas as espécies, principalmente na concentração de 300 μM . Os parâmetros bioquímicos, em geral, não foram afetados pelas altas concentrações de Zn. O incremento das concentrações de Zn influenciou de modo distinto os parâmetros de estresse oxidativo (TBARS e H_2O_2), sendo que os aumentos das atividades da SOD e POD foram correlacionados com a diminuição do estresse oxidativo. O balanço nutricional foi afetado nas quatro espécies com o aumento crescente das concentrações de Zn, no geral as concentrações de P e Cu aumentaram e a concentração de Mg e Mn diminuíram. Apesar das alterações fisiológicas observadas, as quatro espécies deste estudo apresentaram grande adaptação ao aumento da disponibilidade de Zn.

Palavras-chave: Excesso de Zn. Trocas gasosas. Estratégia de Aquisição de Recursos. Nutrição mineral.

ABSTRACT**PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF NATIVE SOUTH AMERICAN GRASSES
SUBMITTED TO ZINC EXCESS IN HYDROPONICS**

**AUTHOR: GABRIELA DESCОВI MILANESI
ADVISOR: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO**

The application of fungicides containing Zinc (Zn) used for the management of leaf diseases in vines (*Vitis vinífera*) increases the levels of Zn in vineyard soils. The accumulation of Zn in the soil can reach toxic levels to the vines and ground cover plants that cohabit the vineyards. Native species of the Biome spontaneously cohabit the vineyards of the Campanha Gaúcha region and are managed as ground cover plants. Since, the expansion of viticulture in the region of Campanha Gaúcha occurred over areas of native pasture of the Pampa Biome. Zinc (Zn) is a heavy metal that in excessive concentrations is toxic to humans, animals and plants. The aim of the study was to characterize the physiological responses of four species of grasses native to the Pampa biome, exposed to excess Zn, as well as to assess which species are more adapted to this condition. The study was conducted in a hydroponic cultivation system containing three Zn concentrations (2, 150 and 300 μM) and four grass species (*Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Axonopus affinis* and *Andropogon lateralis*). After 40 days of cultivation, gas exchanges (net CO_2 assimilation rate, stomatal conductance, intercellular CO_2 concentration, water use efficiency and instant efficiency of rubisco carboxylation) were determined, dry mass, biometric parameters of the root system, biochemical attributes (antioxidant enzymes, lipid peroxidation, hydrogen peroxide content, concentration of photosynthetic pigments), Zn concentrations and nutrients in plant tissues. The increase in the concentrations of Zn in the nutrient solution increased the concentration of Zn in the roots and aerial part of the four species, however, did not change the growth in biomass. The net CO_2 assimilation rate was increased with the addition of Zn concentrations for all species, mainly at the concentration of 300 μM . Biochemical parameters, in general, were not affected by high concentrations of Zn. The increase in Zn concentrations influenced the oxidative stress parameters (TBARS and H_2O_2) in a different way, and the increases in SOD and POD activities were correlated with the decrease in oxidative stress. The nutritional balance was affected in the four species with an increasing increase in Zn concentrations, in general the concentrations of P and Cu increased and the concentration of Mg and Mn decreased. Despite the physiological changes observed, the four species in this study showed great adaptation to the increased availability of Zn.

Key-words: Zn excess. Gas exchange. Mineral nutrition. Resources acquisition strategy.

3.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o bioma Pampa compreende principalmente o estado do Rio Grande do Sul (RS), ocupando cerca de 63% do território gaúcho, estendendo-se por regiões da Argentina e Uruguai (IBF, 2019), e é caracterizado por possuir uma grande biodiversidade (CARVALHO, 2006). Existem 2.200 espécies campestres, muitas delas com alto valor forrageiro, sendo as gramíneas (*Poaceae*) grandes contribuintes para a produção de biomassa desses campos, podendo ser encontradas mais de 450 espécies (BOLDRINI et al., 2010). Nesse sentido, compreendendo a grande heterogeneidade dos campos nativos, a caracterização funcional de algumas espécies de gramíneas, levando em consideração o teor de massa seca das folhas (TMS) e a área foliar específica (AFE), torna-se ferramenta de grande importância para a compreensão dos processos fisiológicos destas gramíneas, auxiliando no manejo dos campos (QUADROS et al., 2006; MACHADO et al., 2013).

Espécies de captura de recursos como a *A. affinis* e *P. notatum* são caracterizadas por apresentarem maior AFE e menor TMS, desse modo apresentam uma maior taxa de crescimento. Além disso, reciclam mais rapidamente a biomassa e os nutrientes presentes no solo, apresentando maior valor nutricional para os herbívoros. Já as espécies caracterizadas como de conservação de recursos como por exemplo a *P. plicatulum* e *A. lateralis* apresentam um maior TMS e menor AFE; ou seja, esse grupo de espécies cresce mais lentamente e apresentam menor valor nutricional (QUADROS et al., 2015).

Na região da Campanha Gaúcha, espécies pertencentes a esse bioma são importantes plantas de cobertura de solos no interior de vinhedos. Entretanto, o clima desta região apresenta elevadas e frequentes precipitações anuais, o que favorece a incidência de doenças fúngicas foliares, principalmente o míldio (*Plasmopara viticola*) (BRUNETTO et al., 2017). Com isso, sucessivas aplicações de fungicidas são necessárias para manter a sanidade das videiras. Como alternativa a fungicidas cúpricos, tem-se usado produtos que possuem o Zn como constituinte ativo. Portanto, tem sido observado também o acúmulo de Zn em solos de vinhedo (TIECHER et al., 2017), podendo isso alcançar níveis tóxicos para as plantas de cobertura de solo e também para as videiras.

O excesso de Zn nas plantas varia bastante entre espécies de plantas, tempo de exposição ao estresse de Zn e pode causar danos em níveis bioquímicos e fisiológicos que variam de acordo com a espécie e órgão da planta, a concentração do elemento e tolerância do tecido aos níveis de Zn (CAMBROLLÉ et al., 2012). Em geral, plantas sob altas concentrações de Zn

podem atrasar ou diminuir o crescimento e o desenvolvimento radicular e causar clorose nas folhas (WANG, 2009).

Além disso, o Zn também pode afetar profundamente a homeostase iônica, interferindo na absorção, transporte e regulação do balanço de íons essenciais, fato que resulta na interrupção de processos metabólicos (ROUT; DAS, 2003), através do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema antioxidante. Para proteger suas células dos efeitos tóxicos das ERO, as plantas dispõem de um sistema de defesa antioxidante não enzimático e enzimático, os quais trabalham em conjunto e em sincronia para detoxificar as ERO produzidas e fazendo com que os vegetais recuperem a homeostase celular (MARTINEZ et al., 2010).

Algumas espécies possuem mecanismos para acumular ou tolerar altas concentrações de metais pesados na rizosfera (PAL; RAI, 2010). Uma estratégia de tolerância consiste em evitar a absorção excessiva e transporte de íons metálicos através da exsudação de substâncias quelantes de metais, reduzindo a absorção e, assim, a toxicidade de metais pesados (KABATA-PENDIAS, 2011). Existe também, o mecanismo intracelular que permite a passagem do íon metálico via simplasto, através da imobilização do mesmo ou captura pelos vacúolos, envolvendo processos de transporte iônico, síntese molecular e indução enzimática (TAIZ; ZEIGER, 2017).

A manutenção de espécies que possuem estratégias como estas são de grande importância para os vinhedos, visto que podem funcionar como fitorremediadoras para as videiras, uma vez no interior da planta, Zn em excesso, podem alterar o equilíbrio fisiológico em locais como os sítios de absorção primária ou nos locais de transporte de nutrientes das raízes (YANG et al., 2011), conseqüentemente, reduzindo a produtividade dos vinhedos.

Portanto, o estudo dos efeitos do excesso de Zn sobre as principais espécies de gramíneas que coabitam os vinhedos torna-se extremamente importante. Bem como avaliar estratégias relacionadas à absorção, acumulação e tolerância de espécies vegetais aos metais, e descobrir quais são as mais adaptadas a ambientes com excesso de Zn. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Zn na produção de massa seca, atividade fotossintética e o estado nutricional de quatro espécies de gramíneas nativas do Bioma Pampa cultivadas em sistema hidropônico contendo elevadas concentrações de Zn.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com quatro espécies de gramíneas (*Andropogon lateralis*, *Axonopus affinis*, *Paspalum plicatulum* e *Paspalum notatum*) de ocorrência frequente nos campos nativos do bioma Pampa, localizados no estado do Rio Grande do Sul, Região Sul do Brasil. A escolha das espécies fundamentou-se na representatividade dos gêneros observados em áreas de pastagens naturais (BANDINELLI et al., 2005, TIECHER et al., 2014) e também nas distinções de características referentes a tipologia funcional das plantas que são usadas no manejo das áreas de pastejo. Essa tipologia funcional está relacionada ao crescimento e adaptabilidade das espécies ao ambiente (QUADROS et al., 2015).

3.2.1 Descrição do experimento

O estudo foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria (29°43' S, 53°42' W), Rio Grande do Sul, Brasil.

As plantas foram coletadas em uma área da pastagem natural, pertencente a Universidade Federal de Santa Maria e coordenado pelo grupo de estudos de forragicultura do Laboratório de Ecologia de Pastagens Naturais (LEPAN) no 15 de julho de 2018. A área escolhida não apresenta histórico de adubação e correção da acidez do solo. Após a coleta das plantas no campo, os perfilhos foram separados, lavados e plantados em bandejas plásticas (capacidade de 15 litros, inclinadas sobre a mesa em ângulo de 20° para evitar acúmulo de solução), contendo areia como substrato.

No processo de padronização, através de cortes, as mudas permaneceram com três raízes e três folhas completamente expandidas por planta. A preparação de mudas foi repetida uma vez por mês, durante 7 meses, em casa de vegetação, permitindo maior uniformidade entre os indivíduos. As bandejas com areia foram irrigadas diariamente com uma solução nutritiva completa contendo (em mg L⁻¹): 149,80 NO₃⁻; 24,80 H₂PO₄; 39,27 SO₄²⁻; 41,31 Mg²⁺; 288,72 Ca²⁺; 234,60 K⁺; 0,03 Mo; 0,26 B; 0,06 Cu; 0,50 Mn; 0,22 Zn e 4 Fe.

Em fevereiro de 2019, as mudas foram retiradas do pré-cultivo em areia, padronizadas com três raízes e três folhas completamente expandidas, lavadas com água destilada e depois acondicionadas em recipientes plásticos. As espécies foram cultivadas em sistema de cultivo hidropônico aerado, onde cada recipiente continha 5 L de solução nutritiva contendo as seguintes concentrações de nutrientes (mg L⁻¹): 85,31 N; 3,77 P; 11,54 S; 97,64 Ca; 23,68 Mg;

104,75 K; 181,08 Cl; 0,27 B; 0,05 Mo; 0,01 Ni; 0,13 Zn; 0,03 Cu; 0,11 Mn e 2,68 Fe. Cinco plântulas de cada espécie de gramíneas nativas: *A. lateralis*, *A. affinis*, *P. plicatulum* e *P. notatum* foram fixadas por esponjas de PVC em placas de isopor colocadas sobre a solução nutritiva, a qual foi aerada constantemente com o auxílio de um compressor (Chiaperini, CJ40 AP3V 360L, Brasil). Após 14 dias de aclimatização das mudas, foram adicionadas as concentrações de Zn (2 µM, correspondente à concentração original da solução nutritiva, 150 e 300 µM) fornecidos na forma de ZnCl₂. Durante o período experimental a solução nutritiva foi substituída a cada sete dias, e o pH mantido a 5,5. Após 40 dias de cultivo foram realizadas a coleta das plantas e as avaliações. A unidade experimental consistiu de cinco plantas por vasos e quatro repetições para cada espécie de gramíneas utilizadas, obtendo distribuição em bancada por meio do delineamento inteiramente casualizado.

3.2.2 Produção de massa seca

As plantas foram seccionadas em folhas e raízes e acondicionadas em sacos de papel pardo e levadas a estufa a 65° até atingir massa constante, para posterior pesagem e obtenção da massa seca de folha (MSF), de raízes (MSR) e do total da planta (MST).

3.2.3 Concentração de nutrientes no tecido

Amostras de massa seca de raízes e parte aérea das plantas foram moídas em moinho do tipo Willey e passadas em peneira com malha de 2 mm. O tecido foi submetido à digestão nitroperclórica (EMBRAPA, 2009). A concentração de P, Mg, K, Ca, Zn Fe e Mn no extrato da digestão foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, AAnalyst 200, Estados Unidos). A concentração de P foi determinada por colorimetria, utilizando a metodologia de Murphy e Riley (1962), em um espectrofotômetro (SF325NM, Bel Engineering, Itália).

3.2.4 Índice de translocação de Zn para a parte aérea e índice acumulação de Zn na raiz

O índice de translocação (IT) de Zn para a parte aérea foi definido através da seguinte equação: $[Zn]_{raiz} \times MS_{raiz} / ([Zn]_{raiz} \times MS_{raiz}) + ([Zn]_{parte\ aérea} \times MS_{parte\ aérea})$.

O índice de acumulação (IA) de Zn na raiz foi definido utilizando a seguinte equação: $[Zn]_{parte\ aérea} \times MS_{parte\ aérea} / [Zn]_{raiz} \times MS_{raiz}$.

3.2.5 Variáveis fotossintéticas

Os parâmetros de trocas gasosas ligados a fotossíntese foram quantificados aos 40 dias após o transplante das plântulas para os tratamentos contendo Zn, as trocas gasosas das folhas com o ambiente foram determinadas utilizando uma radiação de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, por meio de um analisador de gás por radiação infravermelho [Infrared Gas Analyser (IRGA), Mod. Li-COR® 6400 XT]. As medidas foram realizadas durante o período das 08h:00 min às 11h:00 min. Para as medições, foi selecionada a penúltima folha totalmente expandida de três perfilhos por unidade experimental.

As variáveis analisadas foram: a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), concentração intercelular de CO_2 (Ci), taxa de transpiração (E), condutância estomática de vapores de água (Gs), 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 .

3.2.6 Variáveis bioquímicas

Para análise bioquímica, após a coleta das plantas, a parte aérea e raízes foram imediatamente congeladas em N líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C para posterior análises.

3.2.6.1 Concentração de clorofilas e carotenoides

A determinação da concentração das clorofilas e os carotenoides seguiu o método de Hiscox e Israelsstam (1979) e calculados com a ajuda da fórmula de Lichtenthaler (1987). Utilizou-se 0,05 g de material congelado para a determinação. As amostras frescas das folhas foram incubadas a 65°C em dimetilsulfóxido (DMSO) até os pigmentos serem completamente removidos do tecido. Para a determinação da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, a absorbância da solução foi determinada em um espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) nos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm, respectivamente. A concentração dos pigmentos foi expressa em mg g^{-1} massa fresca (MF).

3.2.6.2 Atividade de superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD)

Para a atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase utilizou-se o extrato enzimático bruto obtido a partir de 0,5 g de amostras congeladas e homogeneizadas em 3 mL de solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,8), contendo 1 mM EDTA e 0,5 % Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 rpm durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para ensaio de atividade enzimática e conteúdo protéico (ZHU et al., 2004; BRADFORD, 1976). A concentração de proteína solúvel total de cada amostra foi determinada num espectrofotômetro a 595 nm como descrito por Bradford (1976). A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis e Ries (1977), enquanto a atividade da POD foi determinada de acordo com Zeraik et al. (2008).

3.2.6.3 Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado conforme a metodologia de Loreto; Velikova (2001), sendo que 0,3 g de raízes e parte aérea foram homogeneizadas em 2,0 mL de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA) (p/v). Subsequentemente, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C e 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (10 mM) (pH 7,0) e 1 mL de KI (1M). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Bel Photonics, 1105, Brasil) a 390 nm.

3.2.6.4 Peroxidação lipídica (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)

As TBARS na parte aérea e raízes foram estimados através da metodologia proposta por El-moshaty et al. (1993). Para isso, os danos celulares foram determinados através do acúmulo de malondialdeído (MDA) como produto final da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi expressa em nmol MDA mg⁻¹ proteína.

3.2.6.5 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, usando o programa estatístico SISVAR software, version 4.0 (FERREIRA, 2011). Em

complementação a análise de variância foi realizada uma análise exploratória multivariada de componentes principais (PCA), utilizando o software Canoco versão 4.5 (TER BRAAK; SMILAUER, 2002).

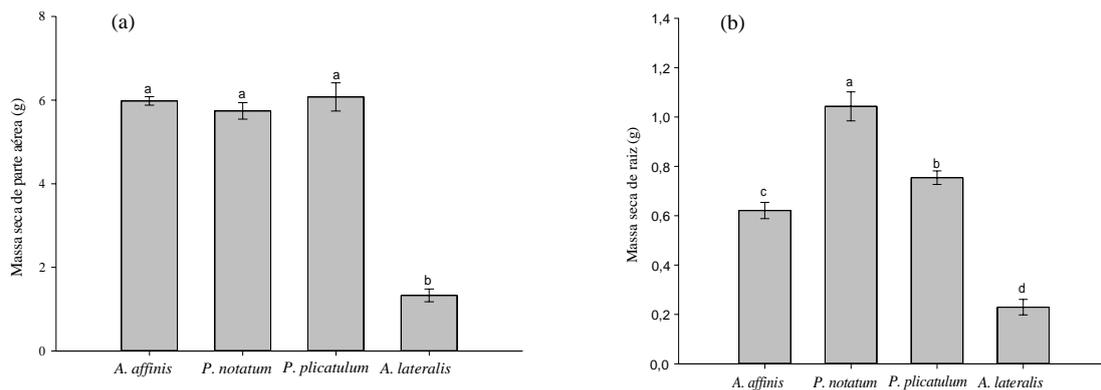
A PCA foi idealizada a partir dos dados de concentração de elementos em raízes e parte aérea (P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn), parâmetros de crescimento das plantas (massa seca de raízes, de parte aérea, total e taxa de crescimento relativo), parâmetros fotossintéticos (clorofilas *a*, *b* e totais, carotenoides, fotossíntese líquida, condutância estomática, concentração intercelular de CO₂, taxa transpiratória, eficiência de uso da água, eficiência instantânea de carboxilação da Rubisco), morfológicos de raízes (diâmetro médio, volume, área superficial específica e comprimento) e de estresse oxidativo (POD, H₂O₂, TBARS). A PCA é realizada de acordo com um conjunto de componentes principais (usamos neste caso apenas os componentes 1 e 2), os quais são o reflexo de um conjunto de combinações lineares padronizadas, ortogonais e que somadas explicam a variabilidade original dos dados.

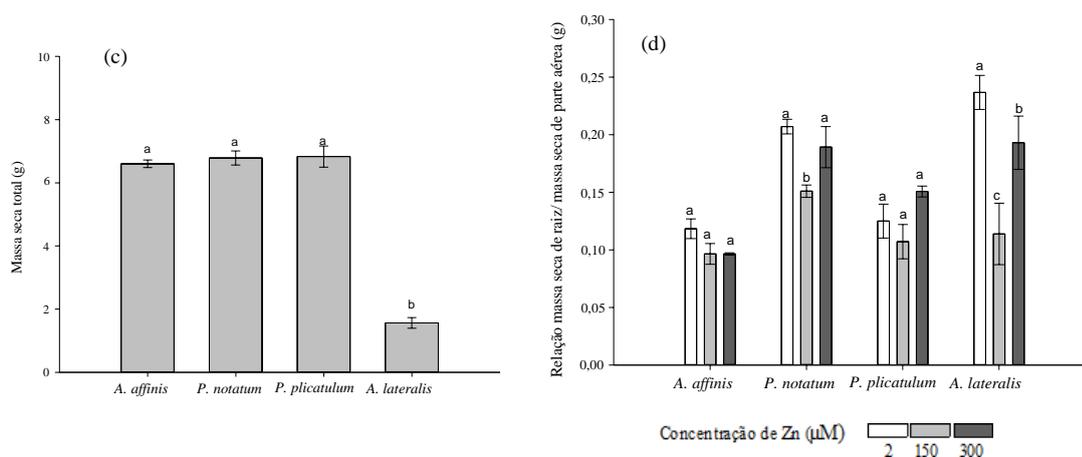
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Produção de massa seca

A produção de massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) das plantas não foram afetadas com o aumento da concentração de Zn na solução nutritiva (Figura 1). Entretanto, a *A. lateralis* foi a espécie que apresentou menor produção de MSPA, MSR e MST (Figura 1 a, b, c), em comparação as demais espécies. Por outro lado, houve efeito da concentração de Zn na relação entre MSR e MSPA (Figura 1 d) para as espécies *P. notatum* e *A. lateralis*. Em *P. notatum* houve redução da MSR/MSPA na concentração de 150 μM Zn, quando comparado ao controle. Por outro lado, em *A. lateralis* houve diminuição da relação MSR/MSPA com o aumento crescente das concentrações de Zn (Figura 1 d).

Figura 1 - Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raízes (b), massa seca total da planta (c) e relação entre a massa seca de raiz e a massa seca de parte aérea (d) de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.





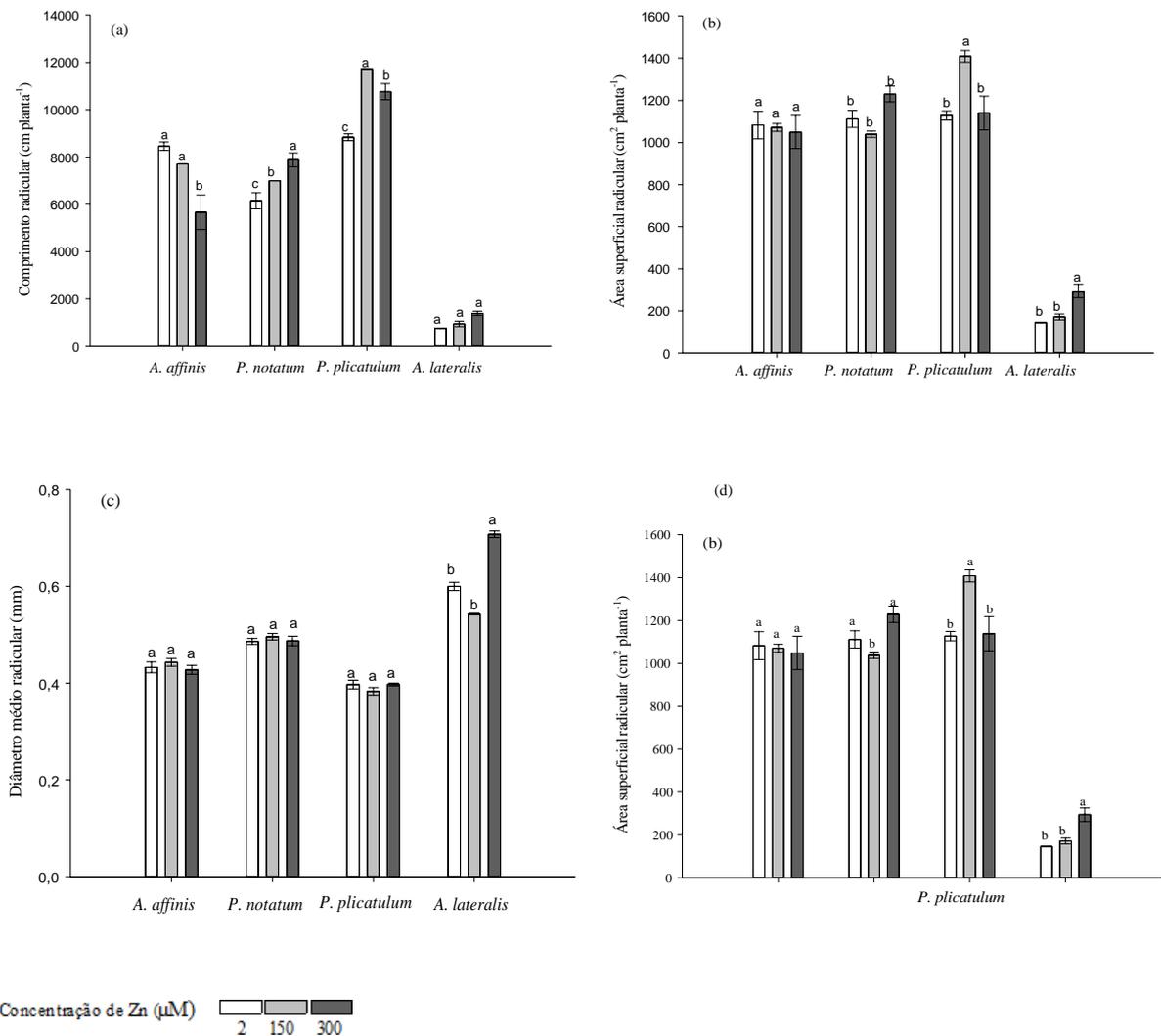
3.3.2 Parâmetros morfológicos de raiz

O comprimento radicular das espécies *P. notatum* e *P. plicatum* aumentou com o incremento da concentração de Zn, em comparação as plantas cultivadas na solução controle. Por outro lado, *A. affinis* apresentou diminuição no comprimento radicular em 300 μM Zn. Já a *A. lateralis* não apresentou alteração neste parâmetro (Figura 2 a).

A espécie *A. lateralis* apresentou incremento da área superficial radicular na maior concentração de Zn (300 μM). A espécie *P. plicatum* apresentou aumento da área superficial apenas na concentração de 150 μM (Figura 2 b) ao contrario de *P. notatum* que apresentou redução nesta concentração. Por outro lado, a *A. affinis* não apresentou alteração nesse parâmetro pelo aumento crescente das concentrações de Zn.

O diâmetro médio das raízes de *A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatum* não foram afetados pelo aumento crescente das concentrações de Zn. Por outro lado, *A. lateralis* apresentou aumento de 20% na maior concentração de Zn (300 μM), quando comparado as plantas cultivadas na solução controle (Figura 2 c). As espécies *P. plicatum* e *A. lateralis* apresentaram aumento do volume radicular com o acréscimo das concentrações de Zn, destacando-se *A. lateralis* que triplicou o seu volume radicular em 300 μM Zn, quando comparado as plantas cultivadas na solução controle (Figura 2 d). Além disso, cabe ressaltar que, a *A. lateralis* apresentou valores de comprimento radicular e área superficial radicular em média quatro vezes menor do que as demais espécies.

Figura 2 - Comprimento radicular (a), área superficial radicular (b), diâmetro médio radicular (c) e volume radicular (d) de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.



3.3.3 Concentração de Zn na parte aérea e raiz, índice de translocação de Zn para a parte aérea e acumulação de Zn na raiz.

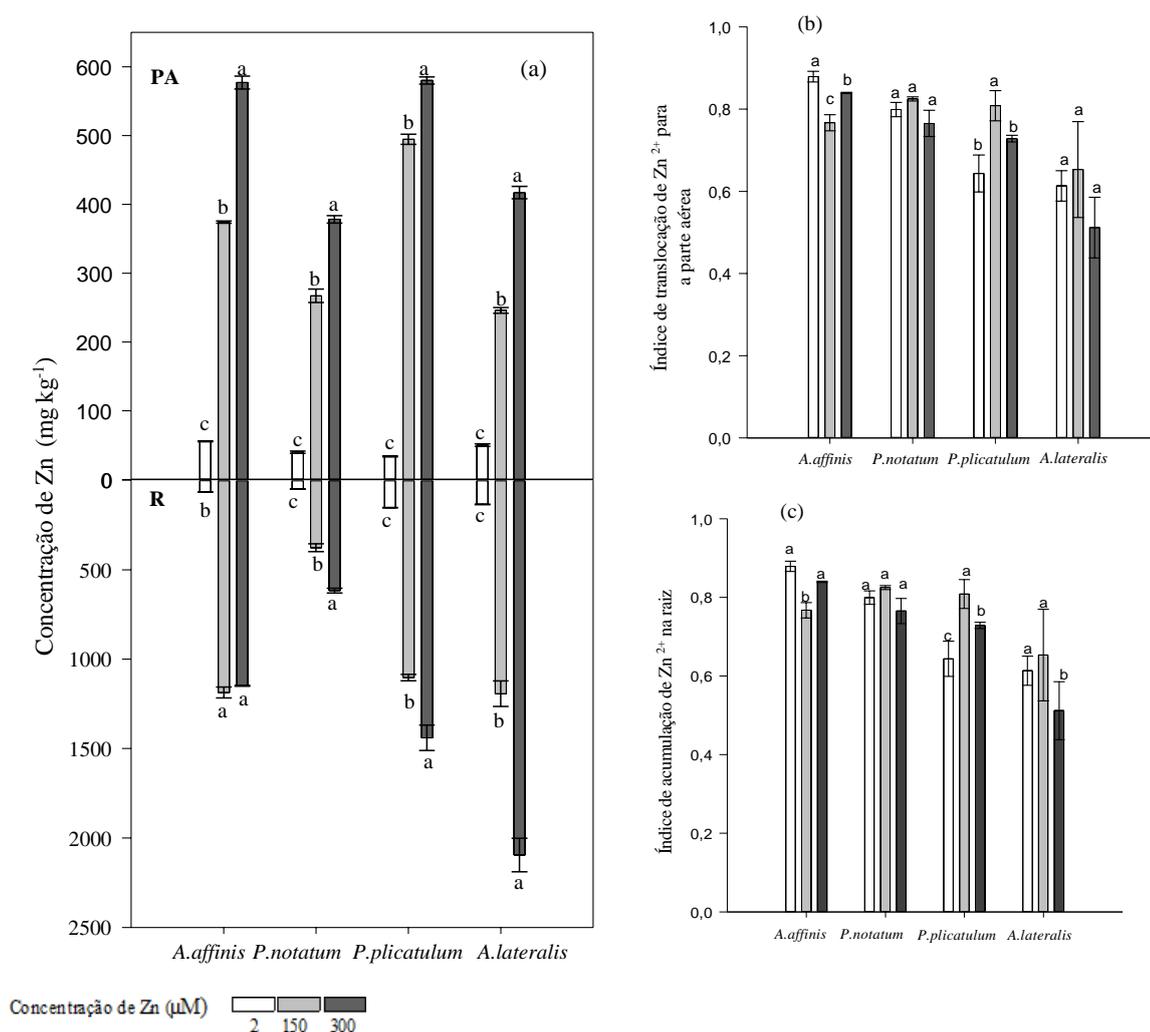
As concentrações de Zn na parte aérea e raízes aumentaram com o aumento das concentrações de Zn na solução. Para as raízes houve efeito semelhante, exceto para a *A. affinis*, que não diferiu entre as concentrações de 150 e 300 μM de Zn (Figura 3 a).

O índice de translocação de Zn (IT_{Zn}) para a parte aérea diminuiu em 12% na espécie *A. affinis* na concentração de 150 μM Zn, quando comparado ao controle. Enquanto que para a

espécie *P. plicatulum* houve aumento do IT_{Zn} em 20% na presença de 150 μM Zn em relação as plantas cultivadas na solução controle. Já as espécies *P. notatum* e *A. lateralis m* não apresentaram alteração nesse parâmetro (Figura 3 b).

O índice de acumulação de Zn (IA_{Zn}) na raiz apresentou comportamento semelhante ao IT_{Zn} para a parte aérea. Exceto para *P. plicatulum*, onde observa-se que os valores obtidos na concentração de 300 μM Zn diferiram daqueles observados nas plantas do controle (Figura 3 c).

Figura 3 - Concentração de Zn nos tecidos da parte aérea e raiz (A); Índice de translocação de Zn para a parte aérea (B) e Índice de acumulação de Zn nas raízes (C) de quatro espécies de gramíneas nativas do bioma pampa submetidas a concentrações crescentes de Zn (2, 150 e 300 μM Zn) na solução nutritiva do cultivo em hidroponia. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.



3.3.4 Concentrações de nutrientes nos tecidos vegetais

O aumento crescente das concentrações de Zn afetaram distintamente as concentrações dos nutrientes nos tecidos das quatro gramíneas. Dessa forma, para os macronutrientes, observou-se que a concentração de P na parte aérea, em geral, apresentou redução com o aumento das concentrações de Zn (Tabela 1). Nas raízes, as espécies *A. affinis* e *P. plicatulum* apresentaram considerável diminuição na concentração de 300 μ M, enquanto que em *P. notatum* e *A. lateralis* houve aumento da concentração de P.

As concentrações de K na parte aérea e raízes aumentaram em *A. affinis* e *A. lateralis* com o acréscimo das concentrações de Zn (Tabela 1). Por outro lado, *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram diminuição da concentração de K na parte aérea e raízes, respectivamente na presença de 150 e 300 μ M Zn.

Verificou-se diminuição da concentração de Ca na parte aérea do *A. affinis* e *A. lateralis*, enquanto em *P. notatum* e *P. plicatulum* não apresentaram alteração. Nas raízes houve aumento da concentração de Ca em *A. affinis* e *P. notatum*, mas redução em *P. plicatulum* e *A. lateralis*.

A concentração de Mg na parte aérea diminuiu nas quatro gramíneas com o aumento das concentrações de Zn. Por outro lado, nas raízes a concentração de Mg aumentou em *P. notatum* e *P. Plicatulum*, enquanto houve diminuição da concentração de Mg em *A. affinis*.

A concentração de Cu na parte aérea aumentou com o aumento das concentrações de Zn em três gramíneas (*A. affinis*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*). Nas raízes, a concentração de Cu diminuiu em *A. affinis* ou aumentou em *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*.

Dentre os micronutrientes, a concentração de Fe foi a menos afetada pelo aumento das concentrações de Zn. Na presença de 300 μ M Zn, em *A. affinis* houve aumento da concentração de Fe na parte aérea, mas redução nas raízes. *P. notatum* apresentou aumento da concentração de Fe com o aumento das concentrações de Zn. Por outro lado, em *A. lateralis* houve diminuição da concentração de Fe nas raízes e parte aérea com o aumento das concentrações de Zn aplicadas.

Um comportamento mais uniforme de resposta ao aumento das concentrações de Zn foi observado para a concentração de Mn nas raízes e parte aéreas, onde houve redução nas quatro espécies de gramíneas, com exceção de *P. plicatulum*, onde houve aumento da concentração de Mn (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Mn na parte aérea (PA) e raízes (R) de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva.

Nutrientes	Concentração de Zn ²⁺ (μM)	Concentração de nutrientes							
		<i>A. affinis</i>		<i>P. notatum</i>		<i>P. plicatulum</i>		<i>A. lateralis</i>	
		Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
		----- g kg ⁻¹ -----							
P	2	6,40 a	4,09 a	4,54 a	2,06 c	4,83 a	4,02 b	6,90 a	11,32 c
	150	5,11 b	1,90 b	4,18 b	3,93 b	4,18 b	4,70 a	5,13 b	16,98 b
	300	4,81 b	1,43 b	4,58 a	5,38 a	4,50 c	1,73c	5,33 b	19,76 a
K	2	24,41 c	26,56 c	25,52 a	21,12 a	26,86 a	31,05 a	11,32 c	10,73 b
	150	33,37 a	28,46 b	23,51 b	18,09 b	26,78 a	24,10 b	16,98 b	11,57 b
	300	34,58 b	33,93 a	24,97 a	19,83 a	24,56 b	21,29 c	19,76 a	13,81 a
Ca	2	4,64 a	1,87 c	3,32 a	1,08 c	4,29 a	2,44 a	4,78 a	2,10 a
	150	4,20 b	2,73 a	3,10 a	1,69 a	4,06a	2,18 b	3,02 b	2,05 a
	300	4,23 b	2,23 b	3,41 a	1,46 b	3,99a	2,00 b	2,02 c	1,61 b
Mg	2	2,19 a	1,90 b	2,01 a	1,20 b	2,73 a	1,56 b	1,52 a	1,33 a
	150	1,97 b	2,86 a	1,60 b	1,60 a	1,88 b	1,60 b	1,17 b	1,53 a
	300	1,87 b	1,40 c	1,39 c	1,46 a	1,91 b	1,83 a	1,20 b	1,36 a
		----- mg kg ⁻¹ -----							
Cu	2	6,71 b	15,74 a	5,30 a	6,33 c	6,06 b	14,91 b	3,52 b	13,61 b
	150	7,24 b	12,04 c	4,58 a	8,49 b	6,23 b	16,75 a	3,27 b	15,80 a
	300	10,08 a	13,77 b	4,98 a	10,57 a	7,03 a	17,28 a	4,19 a	13,21 b
Fe	2	175,79 b	437,89 a	121,44 b	451,81 c	156,59 a	711,37 a	246,03 a	1177,07 b
	150	176,47 b	409,26 a	148,81 a	883,51 a	153,03 a	751,25 a	194,75 b	1390,00 a
	300	198,99 a	338,72 b	132,04 b	706,69 b	143,49 a	678,07 a	132,36 c	1027,75 c
Mn	2	48,08 a	51,23 a	37,58 a	19,27 a	52,47 a	17,06 b	64,04 a	51,02 a
	150	28,65 b	39,77 b	23,10 b	15,21 b	39,25 b	11,04 c	41,07 b	36,39 b
	300	30,91 b	22,91 c	20,66 b	14,59 b	31,96 c	22,03 a	41,10 b	21,02 c

Os valores foram obtidos a partir das médias de três repetições referente a cada espécie de gramíneas nativas do bioma Pampa. *Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn²⁺ para uma mesma espécie.

3.3.5 Trocas gasosas da folha

A taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) das quatro gramíneas aumentou com o incremento da concentração de Zn na solução nutritiva. Nas espécies *A. lateralis* e *P. plicatulum*, caracterizadas como de conservação de recursos, esse aumento foi em média de 85% e 47%, respectivamente, quando cultivadas na maior concentração de Zn (300 μM), em relação as plantas cultivadas na solução controle (Figura 4 a). Em *A. affinis* e *Paspalum*

notatum, espécies de captura de recursos, esse aumento foi de 23% e 8%, respectivamente, na maior concentração de Zn, em relação às plantas cultivadas na solução controle.

Os valores de eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/C_i) no *P. notatum* aumentaram linearmente com o incremento da concentração de Zn. Em *P. plicatum* a presença de Zn ocasionou aumento da A/C_i . Enquanto que, *A. lateralis* apresentou aumento na presença de 300 μM Zn. Já a *A. affinis* não apresentou alteração (Figura 4 b).

A concentração interna de CO_2 (C_i) aumentou linearmente em *A. affinis* com o incremento das concentrações de Zn (Figura 4 c). Para as espécies *A. lateralis* e *P. plicatum* o aumento na C_i foi superior na concentração de 150 μM Zn. A condutância estomática de vapores de água (G_s) nas espécies *A. affinis* e *A. lateralis* aumentou com o incremento com as concentrações de Zn (Figura 4 d). Por outro lado, *P. notatum* e *P. plicatum* apresentaram diminuição de G_s com o aumento das concentrações de Zn.

A eficiência de uso da água (EUA) em *A. affinis* e *A. lateralis* diminuiu com o incremento das concentrações de Zn (Figura 4 f) e em *P. plicatum* houve diminuição apenas na presença de 150 μM Zn. Por outro lado, em *P. notatum* houve aumento deste parâmetro na presença de 300 μM Zn quando comparado às plantas cultivadas na solução controle. (Figura 4 e).

A taxa de transpiração (E) em *A. affinis* e *P. notatum* aumentou respectivamente nas concentrações de 300 e 150 μM Zn, quando comparado as plantas cultivadas na solução controle (Figura 4 f). Em *A. lateralis* houve aumento em E pelo incremento das concentrações de Zn. Por outro lado, em *P. plicatum* houve decréscimo em E na concentração de 300 μM Zn.

3.3.6 Pigmentos fotossintéticos

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides aumentaram na concentração 300 μM Zn quando comparado ao controle (Tabela 1). Já a relação de concentração entre Chl *a*/Chl *b* foi maior em 150 μM Zn, enquanto a concentração 300 μM Zn não diferiu do tratamento controle. As quatro espécies diferiram entre si nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos, sendo *A. affinis* e *P. plicatulum* as espécies com menores concentrações desses pigmentos (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, Chl *a*/ Chl *b*, carotenoides em de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva.

	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl total	Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>	Carotenoides
<i>Axonopus affinis</i>	1,275 c	0,286 c	1,584 b	4,924 a	0,410 b
<i>Paspalum notatum</i>	1,472 a	0,415 a	1,888 a	3,704 b	0,516 a
<i>Paspalum plicatulum</i>	1,393 b	0,344 b	1,753 a	4,043 b	0,437 b
<i>Andropogon lateralis</i>	1,514 a	0,383 a	1,822 a	4,054 b	0,497 a
2 μM	1,379 b	0,325 b	1,665 b	4,178 b	0,446 b
150 μM	1,375 b	0,328 b	1,735 b	4,517 a	0,448 b
300 μM	1,487 a	0,419 a	1,885 a	3,849 b	0,501 a

Os valores foram obtidos a partir das médias de três repetições referente a cada espécie de gramíneas nativas do bioma Pampa. *Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn^{2+} para uma mesma espécie

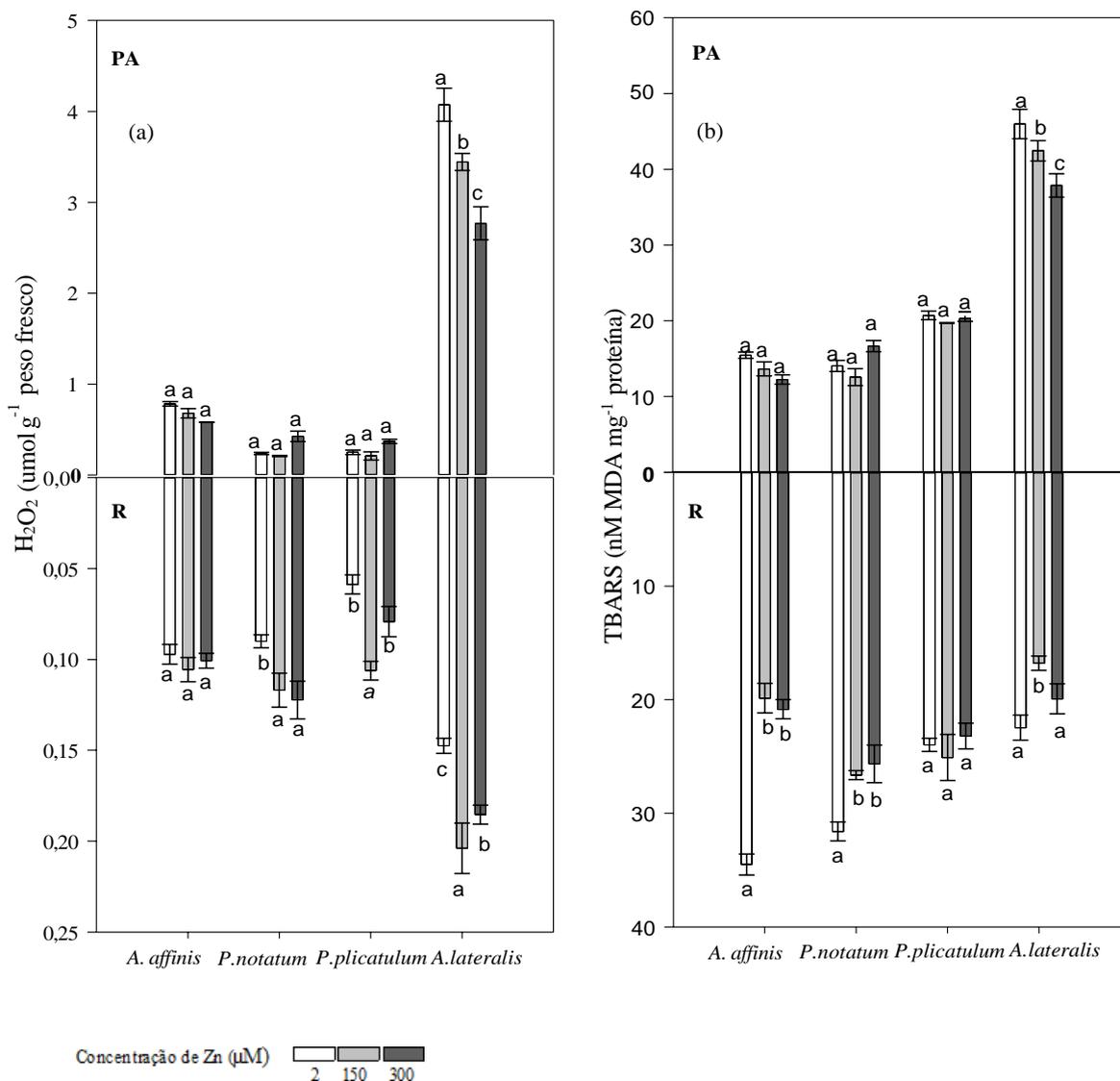
3.3.7 Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo

A concentração de H_2O_2 nas raízes e parte aérea da espécie *A. affinis* não foi alterada pela variação da concentração de Zn na solução nutritiva (Figura 5 a). Para *P. notatum* também não houve alteração na parte aérea, porém aumentou nas raízes. Similarmente, a espécie *P. plicatulum* não apresentou diferença para este parâmetro na parte aérea, contudo, a concentração de H_2O_2 nas raízes aumentou na presença de 150 μM de Zn. A *A. lateralis* apresentou diminuição da concentração de H_2O_2 na parte aérea com o aumento da concentração de Zn na solução nutritiva, enquanto que nas raízes houve aumento na concentração de H_2O_2 (Figura 5 a).

A concentração de malondialdeído (MDA) na parte aérea não foi alterada pelo aumento das concentrações de Zn nas espécies *A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum* (Figura 7 b). Por outro lado, em *A. lateralis* houve diminuição da concentração de MDA com o aumento das concentrações de Zn. A concentração de MDA nas raízes de *A. affinis* e *P. notatum* diminuiu

com o aumento das concentrações de Zn (Figura 5 b). Por outro lado, não houve alteração do MDA nas raízes de *P. plicatulum* entre as concentrações. A *A. lateralis* apresentou redução na concentração de MDA apenas na concentração de 150 μM Zn.

Figura 5 - Teor de H_2O_2 e peroxidação lipídica (TBARS) em de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatulum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.

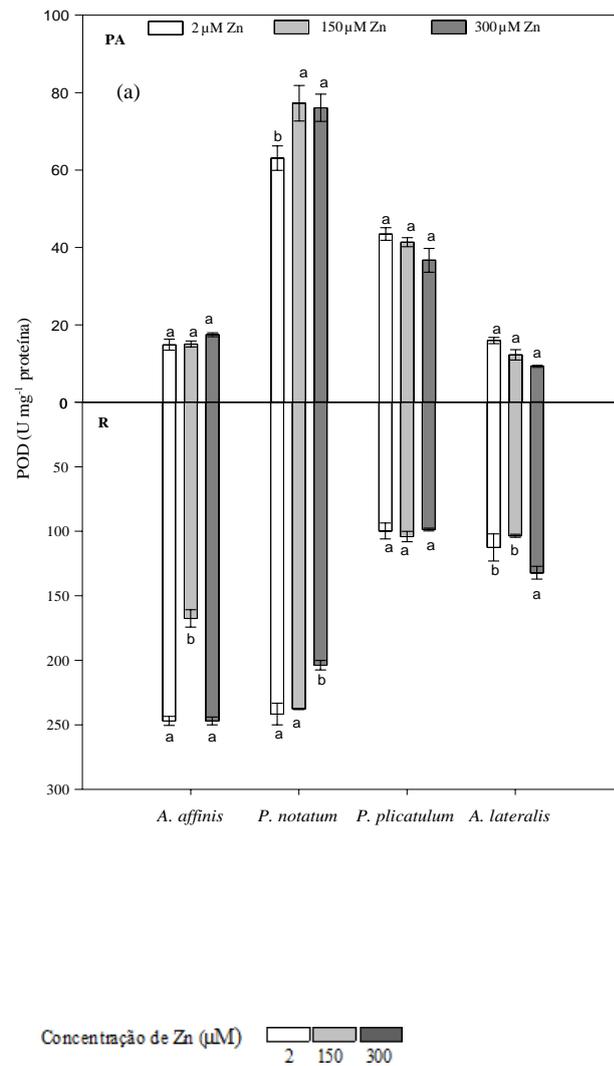


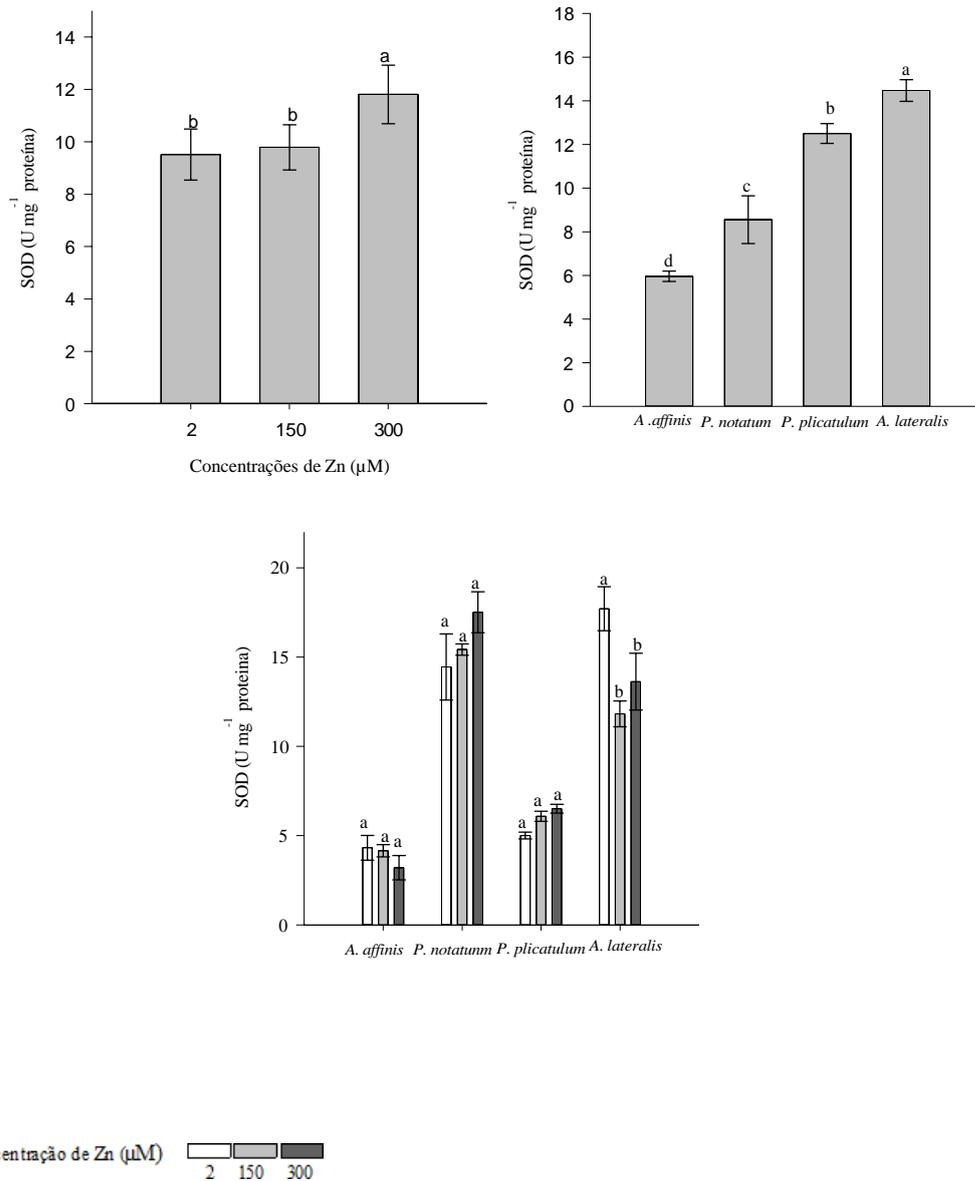
A atividade da POD nas raízes na presença de concentrações crescentes de Zn foi dependente da espécie de gramínea (Figura 6 a). *P. plicatulum* não apresentou alteração. *A. affinis* e *P. notatum* apresentaram diminuição da atividade da POD respectivamente em 150

e 300 μM Zn. Por outro lado, *A. lateralis* apresentou aumento da atividade da POD na presença de 300 μM Zn. Na parte aérea a atividade da POD não foi alterada nas espécies *A. affinis*, *P. plicatum* e *A. lateralis* (Figura 6 a). Enquanto em *P. notatum* houve aumento da atividade da POD com o aumento das concentrações de Zn (Figura 6 a).

A atividade da SOD na parte aérea não apresentou interação entre as espécies e as concentrações de Zn. Entretanto, houve aumento na atividade da SOD na presença de 300 μM Zn (Figura 6 b). Além disso, as quatro gramíneas apresentaram diferenças marcantes na atividade dessa enzima, seguindo a seguinte ordem decrescente: *A. lateralis* > *P. plicatum* > *P. notatum* > *A. affinis* (Figura 6 c). Nas raízes, a atividade da SOD não foi alterada com o aumento crescente das concentrações de Zn nas espécies *A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatum*. Por outro lado, em *A. lateralis* houve redução da atividade da SOD com o aumento das concentrações de Zn (Figura 6 d).

Figura 6 - Atividade das enzimas POD e SOD em de quatro espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum*, *P. plicatum* e *A. lateralis*) em resposta as concentrações de Zn (2, 150 e 300 μM) na solução nutritiva. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.





3.3.8 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada extraíndo os dois primeiros componentes (PC1 e PC2), os quais somados explicaram praticamente 60% da variabilidade original dos dados (Figura 7). O componente principal 1 explicou cerca de 37% da variabilidade, e teve maior influência nas massas secas de raízes e parte aérea, taxa de crescimento relativa (TCR), concentração de K nas raízes e parte aérea, concentração de Fe nas raízes, concentração de H₂O₂ nas raízes e parte aérea, peroxidação lipídica (TBARS) em parte aérea, além de todos parâmetros biométricos radiculares.

O PC1 foi eficiente em separar os tratamentos em dois grandes grupos, um grupo positivo a eixo x (elipse laranja), no qual se agruparam as plantas da espécie *A. lateralis*, independentemente da concentração de Zn aplicada. Já o outro grupo, localizado a esquerda do eixo x (negativo) foi composto pelas demais espécies nativas.

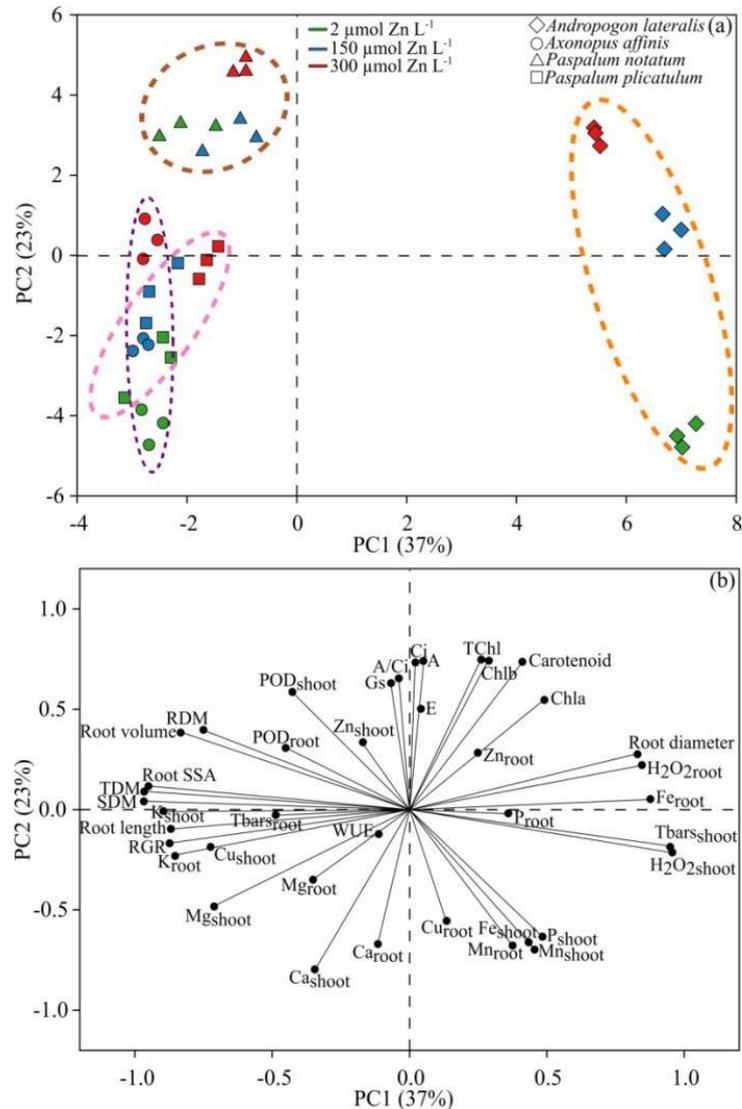
O componente principal 2 explicou aproximadamente 23% da variação dos dados e as variáveis resposta que mais influenciaram foram a concentração de Ca e Mn em parte aérea, concentrações de clorofila *b* e carotenóides, taxa de assimilação de CO₂ e concentração intercelular de CO₂. O PC2 foi moderadamente eficiente em separar os diferentes grupos e demonstrou um comportamento específico para cada espécie de gramínea.

Em *A. lateralis*, as plantas submetidas a 150 e 300 µM Zn comportaram-se de maneira semelhante e de forma distinta as submetidas a 2 µM Zn (elipse laranja). Isso não aconteceu para o *P. notatum*, onde as plantas apresentaram comportamento semelhante independentemente da concentração de Zn a qual foram submetidas (elipse marrom). Já as espécies *A. affinis* (elipse roxa) e *P. plicatulum* (elipse rosa) apresentaram comportamento semelhante entre si (elipses se pertencendo), com menor grau de distinção das concentrações de 2 e 150 µM Zn em relação a 300 µM Zn na solução. Isso pode indicar possíveis similaridades nas características destas espécies nas mesmas concentrações de Zn na solução.

A concentração de Zn na parte aérea apresentou correlação negativa com a concentração de Mn nas raízes, a qual teve correlação positiva com as concentrações de P, Fe e Mn em parte aérea. Os parâmetros fotossintéticos, exceto EUA, se correlacionaram positivamente entre si. As concentrações de clorofilas *b* e totais se correlacionaram de forma negativa com a concentração de Ca na parte aérea.

A concentração de Zn nas raízes apresentou correlação linear negativa com a EUA e concentração de Mg nas raízes. O diâmetro radicular apresentou correlação positiva com a concentração de H₂O₂ nas raízes, e ambos apresentaram correlação negativa com a taxa de crescimento relativo. A concentração de P nas raízes apresentou correlação linear negativa com a produção de massa seca total e a área superficial de raízes, as quais se correlacionaram positivamente com a massa seca de parte aérea. O volume radicular se correlacionou positivamente com a massa seca de raízes. E a concentração de P na parte aérea se correlacionou de maneira negativa com a atividade da POD em parte aérea.

Figura 7 - Relação entre o componente principal 1 (CP 1) e o componente principal 2 (CP 2) dos parâmetros fotossintéticos (A, A/Ci, E, EUA, Gs e Ci), concentração de clorofilas *a*, *b*, total e de carotenoides, massa seca (MSPA e MSR), concentração de Zn nas raízes e parte aérea (Zn R e Zn 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 (H₂O₂ R e H₂O₂ PA) e peroxidação lipídica nas raízes e parte aérea (TBARS R E TBARS PA), em quatro gramíneas do bioma Pampa cultivadas em concentrações crescentes de Zn (2; 150 e 300 μM de Zn).



*Root (raízes), Shoot (parte aérea), RGR (taxa de crescimento relativo), TDM (massa seca total), SDM (massa seca de parte aérea), RDM (massa seca de raiz), Root SSA (área superficial de raízes) WUE (eficiência do uso da água).

3.4 DISCUSSÃO

O crescimento das espécies nativas não foi reduzido pelo excesso de Zn, evidenciado pelo fato de que concentrações de Zn na solução nutritiva não comprometeram a produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) e massa seca total (MST) (Figura 1 a, b, c). A concentração de Zn nos tecidos aumentou linearmente com o incremento do Zn na solução nutritiva (Figura 1 a). Além disso, esse aumento foi maior nas raízes do que na parte aérea das plantas. Isso pode ser devido a imobilização do Zn 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 Zn para a parte aérea parece ser uma estratégia de sobrevivência das plantas mantendo uma menor concentração do metal nos órgãos mais sensíveis fotossinteticamente (YANG et al., 2011).

Neste estudo, a concentração de Zn alcançou valores máximos de 580 mg Zn kg⁻¹ e 2.094 mg Zn kg⁻¹ nas folhas e raízes, respectivamente. Portanto, diferentemente do encontrado na literatura, os limites de toxicidade de Zn nessas espécies de gramíneas, baseando-se nos resultados de produção da massa seca obtidos, indicam que o limite para Zn na parte aérea pode ser maior que 200 mg Zn kg⁻¹. Visto que, apesar dos altos teores encontrados, não foram notados sintomas de toxidez de Zn. Tal fato pode estar relacionado a outra estratégia de sobrevivência das plantas em que o Zn pode estar retido nos vacúolos, complexados com ácidos orgânicos e, portanto, podem prevenir a toxidez (KROTZ et al., 1990).

O quociente entre a biomassa de raízes e da parte aérea não foi alterado em *A. affinis* e *P. plicatulum* (Figura 1 d). Por outro lado, houve diminuição desse quociente em *P. notatum* e *A. lateralis*. Portanto, essas espécies demonstram aparentemente que não foram afetadas negativamente pelo aumento crescente da concentração de Zn no substrato. Espécies sensíveis ao excesso de Zn geralmente apresentam diminuição tanto da produção de massa seca da parte aérea como de raízes (CARNEIRO et al., 2002; LI et al., 2011).

Os parâmetros biométricos radiculares (comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume radicular) indicam que o aumento das concentrações de Zn no substrato foi em geral benéfico para as quatro gramíneas (Figura 2). Por outro lado, alguns dados indicam certo grau de estresse, como aquele observado em *A. affinis* que apresentou redução do comprimento radicular na presença 300 µM Zn (Figura 2 a), enquanto *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram aumento linear no comprimento radicular com o aumento crescente da concentração de Zn.

Em geral, o aumento do diâmetro radicular indica a presença de estresse pelo excesso de

metais (JUANG et al., 2012; AMBROSINI et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2016). Este aumento pode ocorrer pelo acúmulo do metal na endoderme e no periciclo da raiz, alterando a distribuição da auxina ou o equilíbrio hormonal, resultando em alterações no desenvolvimento da raiz devido a diferenciação prematura da endoderme e lignificação dos tecidos corticais, o que causa espessamento das paredes celulares (ARDUINI et al., 1995; GIEHL et al., 2012). Tal fato pode ser uma estratégia de defesa da planta, pois os metais precisam atravessar a endoderme, via transportadores de membrana para alcançar o xilema e depois serem transportados para a parte aérea via apoplasto, o que resulta na redução na translocação destes elementos (TIECHER et al., 2017).

Dentre as quatro espécies estudadas, apenas *A. lateralis* apresentou aumento do diâmetro radicular na presença da maior concentração de Zn (300 μ M). Verificou-se também nessa espécie aumento da área superficial e volume radicular, fato que indica um possível mecanismo para explorar mais volume e diminuir a toxidez. Espécies que apresentaram alta taxa de crescimento, produção de biomassa e alongamento da raiz podem ser utilizadas como fitorremediadoras (LAMEGO; VIDAL, 2007). Portanto, as quatro gamíneas testadas no presente estudo, apesar de possuírem distintas taxas de crescimento (QUADROS et al., 2006), apresentam características interessantes para serem usadas como espécies de cobertura de solo contaminados com Zn. Além disso, outro fato importante é que a espécie *A. Affinis* não apresentou alteração no volume radicular com o incremento de Zn. Enquanto que para as demais espécies o Zn parece ter beneficiado este parâmetro. Tal fato pode estar ligado a maior capacidade de exsudação de ácidos orgânicos e modificação do pH da solução devido ao maior volume de raízes desta espécie.

A concentração de 300 μ M Zn ocasionou aumento na taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) para todas as espécies testadas (Figura 4 a), bem como aumentou a eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/Ci) para três espécies (*P. notatum*, *P. plicatum* e *A. lateralis*) (Figura 4 b). Isso aconteceu porque as espécies estudadas apresentaram aumento dos parâmetros fotossintéticos com o incremento de Zn. Além disso, apesar das quatro espécies diferirem nas concentrações basais de pigmentos fotossintéticos (Tabela 2) as concentrações de clorofilas *a*, *b* e total, bem como de carotenoides, aumentaram na presença de 300 μ M Zn (Tabela 2). Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de que o excesso de Zn pode causar a substituição do Mg central da molécula de clorofila, resultando em clorofilas-Zn mais estáveis, mas com propriedades muito similares (RAU et al., 2001; TAKEUCHI; AMAO, 2005; PETROVIC et al., 2006).

Interessantemente, a concentração de Mg na parte aérea das quatro gramíneas estudadas foi significativamente diminuída pelo aumento crescente da concentração de Zn (Tabela 1). Devido a competição do Zn com o Mg no sítio de ativação da Rubisco, pode ocorrer inibição da fotossíntese pela diminuição da atividade da Rubisco. Além disso, o excesso de Zn pode reduzir a atividade do fotossistema II devido ao deslocamento de Mn da membrana do tilacóide (BONNET et al., 2000; JIN et al., 2008; CHERIF et al., 2010; MARSCHNER, 2012). Apesar disso, não houve redução na produção da biomassa da planta e da taxa de assimilação de CO₂.

Nas quatro gramíneas testadas, as concentrações de H₂O₂ na parte aérea não apresentaram alterações, exceto para a *A. lateralis* que apresentou diminuição (Figura 5 a). Estes resultados apresentaram forte relação com as concentrações de malondialdeído (MDA), que sugerem que o aumento crescente das concentrações de Zn não causou estresse oxidativo na parte aérea das quatro gramíneas (Figura 5 b). Resultados semelhantes foram observados para as concentrações de H₂O₂ e peroxidação lipídica nas raízes. Portanto, concluiu-se que as quatro gramíneas não sofreram estresse oxidativo com o aumento crescente das concentrações de Zn.

Com o objetivo de controlar o nível de espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteger as células do dano oxidativo, as plantas possuem enzimas antioxidantes envolvidas no processo de detoxificação por metais pesados como a superóxido dismutase (SOD) e peroxidases não específicas, como a guaiacol peroxidase (POD) (GRATÃO et al., 2005). Observou-se que o aumento dos níveis de Zn proporcionou aumento na atividade da POD na parte aérea, principalmente em *P. notatum*, indicando que existe atuação desse sistema antioxidante na detoxificação pelo excesso desse metal (Figura 6 a). No entanto, também se observou que a espécie *P. notatum* não apresentou alteração na concentração de H₂O₂ e nem na peroxidação lipídica devido ao excesso de Zn, isso ocorreu porque a POD pode impedir o acúmulo de H₂O₂, sugerindo que para essa espécie existe uma atuação eficiente de enzimas atuando no processo de detoxificação (BHATT; TRIPATHI, 2011).

Os maiores valores da atividade da SOD na parte aérea foram encontrados na *P. plicatulum* (Figura 6 d). Nas raízes, *A. lateralis* apresentou redução nas concentrações de 150 e 300 µM. A SOD converte os radicais superóxido em H₂O₂ o qual pode ser removidos pelas enzimas de captura de H₂O₂, como POD, CAT, GPX e APX em diferentes compartimentos celulares (CAMBROLLÉ et al., 2015). Portanto, pelos resultados observados na produção de H₂O₂ e peroxidação lipídica, pode-se inferir que as atividades destas enzimas foram eficientes em detoxificar os efeitos do excesso Zn presente nas plantas, já que ele não afetou os demais processos fisiológicos das plantas. A interpretação da desintoxicação bioquímica como

estratégia das plantas estudadas contra o estresse oxidativo, induzido pelo acúmulo de metais, é uma chave para otimizar a fitorremediação de metais pesados.

No presente estudo, a concentração de nutrientes nas diferentes partes das gramíneas nativas foi influenciada pelo aumento crescente das concentrações de Zn (Tabela 2). Em que, o aumento das concentrações de Zn, em geral ocasionou diminuição dos nutrientes P, Ca, Mg, Fe e Mn na parte aérea e raízes das espécies. Sendo que destes, os conteúdos de Ca e Mg apresentaram uma relação positiva entre a parte aérea e raízes das espécies e uma relação negativa com o conteúdo de Zn nas raízes. De acordo com Marschner (2012), cátions divalentes, como o Zn^{+2} , competem com outros cátions, como o Ca^{+2} e o Mg^{+2} , caracterizado como antagonismo. Portanto em altas concentrações o Zn pode substituir qualquer um destes cátions e ser preferencialmente absorvido pelas raízes (TEWARU et al., 2008; MARSCHNER, 2012).

As altas concentrações de Zn na solução nutritiva (300 μM Zn) reduziram a concentração de P na parte aérea e raízes das gramíneas (Tabela 2). O que pode ser observado pela correlação negativa entre o P e o Zn nas raízes (Figura 7). Esta redução na absorção de P está associada ao aumento do acúmulo de Zn nas raízes, que induz a planta a absorver menos P (BROADLEY et al., 2010; ROSE et al., 2013). Por outro lado, *P. notatum* se comportou diferentemente, apresentando aumento (38%) na concentração de P tanto na parte aérea quanto nas raízes. Isso pode ter acontecido em razão da precipitação do P em função do excesso de Zn, na forma de fosfato de zinco na planta (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1984).

A concentração de K, na raiz e parte aérea das gramíneas praticamente não foi afetado pela presença de Zn. Tal fato pode ter contribuído para a manutenção dos atributos morfológicos de parte aérea e raízes das gramíneas com o aumento das concentrações de Zn (Figura 2). Visto que, houve uma correlação positiva entre a concentração de K nos tecidos e parte aérea e raiz com a produção de MSPA e MSR das gramíneas estudadas (Figura 7). Tem sido relatado que o estado nutricional, com destaque à concentração de K nos tecidos, reflete na capacidade de perfilhamento e outros atributos morfológicos em gramíneas forrageiras (CABRAL, 2017; MEGDA; MONTEIRO, 2010). O K exerce influência na área foliar das plantas devido esse nutriente impulsionar o crescimento das células e aumento na área foliar (MONTEIRO, 2008; MEGDA, MONTEIRO, 2010).

Nesse estudo observou-se uma relação negativa entre a concentração de Fe e Zn nas raízes das espécies de gramíneas. Isso pode ser explicado, pelo fato de que o excesso de Zn pode afetar a absorção e a translocação de Fe através da inibição competitiva entre os cátions, provavelmente devido à semelhança de raio iônico entre eles. Tal similaridade, entres os dois

íons, faz com que haja competição pelo mesmo sítio do transportador, diminuindo a absorção dos íons que estiverem em menor concentração, neste caso o Fe, sendo que o transportador não consegue distingui-los (KABATA-PENDIAS 2010, MARSCHNER, 2012).

Entretanto, nesse estudo as plantas não apresentaram sintomas de deficiência de Fe, apesar do aumento de Zn em geral ter diminuído as concentrações deste nutriente. Isto pode ser um indicativo de que, elevadas concentrações de Zn não afetam a absorção de Fe, e sim, a translocação do Fe absorvido para a parte aérea (SOARES et al., 2001). Visto que observou-se menores concentrações de Fe na parte aérea em relação as raízes das gramíneas estudadas.

A concentração de Cu na parte aérea aumentou com a aplicação de concentrações crescentes de Zn, bem como houve redução nas raízes, como aconteceram com as espécies *A. affinis* e *A. lateralis*, pode ser explicado pela elevação da sua translocação, à medida que se aumentam as concentrações de Zn na solução nutritiva (PAIVA et al., 2002). Os resultados encontrados mostram que, apesar de algumas concentrações de nutrientes para o metabolismo das plantas terem diminuído com a aplicação de crescentes concentrações de Zn, isso não foi suficiente para afetar o metabolismo das gramíneas estudadas.

Os mecanismos responsáveis pela hiperacumulação de metais ainda não são totalmente compreendidos. As espécies deste estudo apesar de pertencerem a diferentes agrupamentos baseados nos seus atributos fisiológicos (QUADROS et al., 2006), demonstraram uma boa capacidade de acumulação de Zn independentemente da sua estratégia de crescimento (captura ou conservação) sem apresentarem diminuição do crescimento, apesar de que alguns parâmetros fisiológicos tenham sido alterados negativamente.

3.5 CONCLUSÕES

As espécies estudadas são tolerantes ao incremento das concentrações de Zn na solução nutritiva, acumulando altas concentrações de Zn na parte aérea e raiz.

As altas concentrações de Zn não comprometeram a produção de biomassa, fotossíntese e o sistema antioxidante das plantas.

Apesar de todas as espécies apresentarem tolerância ao excesso de Zn, a *Andropogon lateralis* é a mais sensível, tendo em vista seus parâmetros morfológicos de raízes, desse modo refutando a hipótese que espécies de conservação de recursos são mais tolerantes ao excesso de Zn.

REFERÊNCIAS

- AMBROSINI, V. G. et al. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v.96, n.1, p.270-280, 2015.
- ARDUINI, I., GODBOLD, D.L., ONNIS, A. 1994. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pineaster* seedlings. **Physiol. Plant** 92, 675–680.
- BANDINELLI, D. G. et al. Composição florística de pastagem natural afetada por fontes de fósforo, calagem e introdução de espécies forrageiras de estação fria. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.84-91, 2005.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.29, n.6, p.850-859, 2011.
- BOLDRINI, I. I. et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre: ed. Pallotti, 2010. 64 p.
- BONNET, M.; CAMARES, O.; VEISSEIRE P. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo), **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.346, p.945-953, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1, p.248-254, 1976.
- BRUNETTO, G. et al. Metais pesados em solos de vinhedos e pomares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.39, n.2, e-263, 2017.
- CABRAL C.E.A., Pesqueira-Silva LCR, Barros LV, Neto AB, Abreu JG, Cabral CHA, Silva FG, Galati RL, Fiori AMR, Silva CA: Defoliation height and potassium fertilization of Mulato II grass. **Semina Ciências Agrárias** v.38, p.2719-2726, 2017.
- CAMBROLLÉ, J. et al. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, v.86, n.9, p.867-874, 2012.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.11, p.1629-1638, 2002.
- CHERIF, J. et al. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.101, n.3, p.332-339, 2010.
- CARVALHO, P. C. F. et al. Produção animal no Bioma Campos Sulinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.156-202, 2006.

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, n.2, p.109-119, 1993.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants, **Plant Physiology**. v.59, n.1, p.309–314, 1977.

GIEHL, R. F.; LIMA, J. E.; VON WIRÉN, N. Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution. **Plant Cell**, v. 24, p. 33–49, 2012.

GRATÃO P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.

GUIMARÃES, P. R. et al. Black oat (*Avena strigosa* Schreb.) growth and root anatomical changes in sandy soil with different copper and phosphorus concentrations. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.227, n.192, p.1-10, 2016.

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

JIN, X. F. et al. Ultrastructural changes, Zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance, **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, n.11, p.997-1006, 2008.

JUANG, K. W. et al. Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 4, p. 1315-1322, 2012.

KABATA-PENDIAS, A. PENDIAS, H. **Oligoelementos no solo e nas plantas**. BOCA RATON: CRC, 1984.

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

KLOKE, A.; SAUERBECK, D. R.; VETTER, H. **The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains**. In: Nriagu, J. (Ed.), *Changing Metal Cycles and Human Health*. Springer-Verlag, Berlin, 113p, 1984.

KROTZ, R.M. et al. Relationships between cadmium, zinc, Cd-peptide and organic acids in tobacco suspension cells. **Plant Physiol.**, v. 91, p. 780-787, 1990

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.17, n.1, p. 9-18, 2007.

LASAT, M. M. *The use of Plants for the Removal of Toxic Metals from Contaminated Soil*. Washington DC: EPA, 33p. 2002.

LI, T. et al. Rhizosphere characteristics of zinc hyperaccumulator *Sedum alfredii* involved in zinc accumulation. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, n.2-3, p.818-823, 2011.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, n.1, p.350-382, 1987.

MACHADO, J. M. et al. Morphogenesis of native grasses of Pampa biome under nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, n.1, p.22-29, 2013.

MANFIO, V. **Viticultura e associativismo: a dinâmica da associação vinhos da campanha na formação de um território no rio grande do Sul, Brasil**. Tese (doutorado em geografia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 260p, 2018.

MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press ed. p.331-346, 2012.

MARTINEZ, C. A.; SORIANI, H. H.; FAVARETTO, V. F. Mecanismos de defesa das plantas a estresses. In: PRADO, R. M. et al. Ed. **Nutrição de plantas: diagnose foliar em hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FAPESP/CAPES/Fundunesp, p.63-90, 2010.

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

MONTEIRO, F.A., CONSOLMAGNO, NETO, D.: Tanzania guineagrass root system as related to potassium and magnesium fertilization. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.37, p.810-818, 2008.

PAL, R., RAI J. P. Phytochelatin: peptides involved in heavy metal detoxification. **Appl Biochem Biotechnol**. v.3 p.945-963, 2010.

PAIVA, H. N. et al. Teor, conteúdo e índice de translocação de nutrientes em mudas de Cedro (*cedrela fissilis* vell.) Submetidas a doses crescentes de zinco. **Ciência Floresta**, v.13, n.1, p.1-10, 2002.

PETROVIC, J.; NIKOLIC, G.; MARKOVIC, D. *In vitro* complexes of copper and zinc with chlorophyll. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.71, n.4, p.501-512, 2006.

QUADROS, F. L. F. et al. Cuidar e fazer diferente. In: PILLAR, V.P.; LANGE, O. **Os Campos Do Sul**. 1ed. Porto Alegre: UFRGS, v.1, p.141-147, 2015.

QUADROS F. L. F. et al. Uso de tipos funcionais de gramíneas como alternativa de diagnóstico da dinâmica e do manejo de campos naturais. In: **Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Sociedade Brasileira de Zootecnia, João Pessoa, pp. 1-4, 2006.

RAU, H. K. et al. Design, synthesis and properties of synthetic chlorophyll proteins. **European Journal of Biochemistry**, v.268, n.11, p.3284-3295, 2001.

ROUT, G. R.; DAS, P. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. **Zinc Agronomie**. v.23, n.1, p.3-11, 2003.

SOARES, C. R. F. S. et al. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.2, p.339-348, 2001.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Art Med, 2017. 954p.
- TAKEUCHI, Y.; AMAO, Y. Light-harvesting properties of zinc complex of chlorophyll-a from spirulina in surfactant micellar media. **BioMetals**, v.18, n.1, p.15-21, 2005.
- TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. C. **Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)**. Ithaca, Microcomputer Power, 500p, 2002.
- TEWARU, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.171, n.2, p.286-294, 2008.
- TIECHER, T. et al. Phosphorus application and liming effects on forage production, floristic composition and soil chemical properties in the Campos biome, southern Brazil. **Grass and Forage Science**, v.69, n.4, p.567-579, 2014.
- 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, n.1, p. 203-212, 2017.
- IBF- **Instituto Brasileiro de Florestas**. Bioma Pampa. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-pampa.html>>. Acesso em: 25 out. 2019.
- WANG, C. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v.75, n.11, p.1468–1476, 2009.
- YANG, Y. et al. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Combier”) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, n.1, p.1483-1491, 2011.
- 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, n.4, p.731-734, 2008.

4 MANUSCRITO II

RESUMO

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM TRÊS ESPÉCIES DE GRAMÍNEAS NATIVAS DO BIOMA PAMPA SUBMETIDAS AO EXCESSO DE ZN NO SOLO

AUTOR: GABRIELA DESCOVI MILANESI
ORIENTADOR: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO

As condições edafoclimáticas da região da Campanha Gaúcha no Rio Grande do Sul (RS), Brasil, favorecem o surgimento de doenças fúngicas foliares das videiras. A aplicação de fungicidas a base de zinco (Zn) causam aumento dos teores de Zn nos solos de vinhedos. Com isso, o acúmulo de Zn no solo pode atingir níveis tóxicos as espécies nativas deste bioma coabitam espontaneamente os vinhedos e são importantes plantas de cobertura de solo. O estudo objetivou avaliar as alterações fisiológicas em três espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa, submetidas ao excesso de Zn em solo natural de vinhedo. Três espécies de gramíneas *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* foram submetidas a cinco doses de Zn (0, 30, 60, 120 e 180 mg kg⁻¹). Aos 90 dias de cultivo foram determinadas as trocas gasosas da folha, seguido de coletas das plantas para a determinação da concentração Zn no solo e no tecido, produção de massa seca, concentração de pigmentos fotossintéticos, proteínas solúveis, concentração de nutrientes nos tecidos, atividade da enzima POD e SOD, concentração de H₂O₂ e de TBARS. O teor de Zn no solo aumentou linearmente com a aplicação de Zn bem como a concentração de Zn nas raízes e parte aérea das três espécies, causando alteração na produção de biomassa em *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*. A taxa de assimilação líquida de CO₂ aumentou com o acréscimo das concentrações de Zn nas espécies *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*, enquanto que, *Axonopus affinis* apresentou redução na presença de 30 a 120 mg Zn kg⁻¹. Os parâmetros bioquímicos, em geral, foram afetados pelas altas concentrações de Zn. O incremento das doses de Zn influenciou de modo distinto os parâmetros de estresse oxidativo (TBARS e H₂O₂), sendo que os aumentos das atividades da SOD e POD foram correlacionados com a diminuição do estresse oxidativo. As avaliações fisiológicas analisadas indicam que a espécie *Axonopus affinis* é mais tolerante ao excesso de Zn, enquanto, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* são sensíveis ao excesso de Zn.

Palavras-chave: Toxidez por Zn. Trocas Gasosas. Estresse oxidativo.

ABSTRACT**PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS IN THREE NATIVE GRASS SPECIES FROM THE PAMPA BIOME SUBMITTED TO THE ZINC EXCESS IN THE SOIL**

AUTHOR: GABRIELA DESCOVI MILANESI
ADVISOR: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO

The edaphoclimatic conditions of the Campanha Gaúcha region in Rio Grande do Sul (RS), Brazil, favor the emergence of fungal leaf diseases of the vines. The application of fungicides based on zinc (Zn) causes increased levels of Zn in the vineyard soils. As a result, the accumulation of Zn in the soil can reach toxic levels. The native species of this biome spontaneously coexist in the vineyards and are important ground cover plants. The study aimed to evaluate the physiological changes in three species of grasses native to the Pampa biome, subjected to excess Zn in natural vineyard soil. Three grass species *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum* were submitted to five doses of Zn (0, 30, 60, 120 and 180 mg kg⁻¹). At 90 days of cultivation, leaf gas exchange was determined, followed by plant collections to determine the Zn concentration in soil and tissue, dry matter production, concentration of photosynthetic pigments, soluble proteins, concentration of nutrients in tissues, activity of the enzyme POD and SOD, concentration of H₂O₂ and TBARS. The Zn content in the soil increased linearly with the application of Zn as well as the concentration of Zn in the roots and aerial part of the three species, causing changes in the biomass production in *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum*. The net CO₂ assimilation rate increased with the increase of Zn concentrations in the species *P. notatum* and *P. plicatulum*, while *Axonopus affinis* showed a reduction in the presence of 30 to 120 mg Zn kg⁻¹. Biochemical parameters, in general, were affected by high concentrations of Zn. The increase in Zn doses influenced the oxidative stress parameters (TBARS and H₂O₂) in a different way, and the increases in SOD and POD activities were correlated with the decrease in oxidative stress. The physiological evaluations analyzed indicate that the species *Axonopus affinis* is more tolerant to excess of Zn, while *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum* are sensitive to excess of Zn.

Key-words: Zn toxicity. Gas exchange. Oxidative stress.

4.1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade até os momentos mais atuais, a vitivinicultura é praticada em vários locais do mundo. Sendo um elemento de cultura e também econômico (MANFIO, 2018). No Brasil, é uma atividade de grande relevância econômica, especialmente no Estado do Rio Grande do Sul, que contém a maior quantidade de terras cultivadas com videiras no país onde atualmente são cultivados aproximadamente 50.000 ha, representando 71% da área cultivada no país (IBGE 2017). Além da região serrana, reconhecida como a principal e mais tradicional região vitícola do Estado, a região da Campanha Gaúcha vem ganhando destaque e crescendo cada vez mais devido a fatores como o clima mais favorável ao crescimento e desenvolvimento da cultura da videira em relação à região da Serra Gaúcha.

A atividade vitícola nessa região ocorreu principalmente em grandes áreas anteriormente utilizadas para criação de gado, onde, predominam espécies nativas espontâneas do bioma Pampa (STEFANELLO et al., 2020). Portanto, as espécies pertencentes a esse bioma, desempenham importante papel como plantas de cobertura nas entrelinhas dos vinhedos. Com isso, essas espécies contribuem na adição de resíduos orgânicos, garantindo maior proteção do solo com o sistema de cobertura, contribuindo com a conservação do mesmo, além da ciclagem de nutrientes (SANTOS et al., 2013; QUADROS et al., 2009).

As áreas utilizadas para o cultivo da videira na região da Campanha Gaúcha apresentam, em geral, altos índices pluviométricos, com elevada umidade relativa do ar e altas temperaturas durante o ciclo produtivo (TONIETTO, 2007; TIECHER et al., 2017). Tais condições favorecem o desenvolvimento de doenças fúngicas principalmente míldio (*Plasmopara viticola*). Portanto, para prevenir e/ou controlar essas doenças nas videiras, aplicações sucessivas de fungicidas são comuns. Fungicidas cúpricos, como a calda bordalesa [$\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CuSO}_4$] são amplamente utilizados para controle de doenças fúngicas em função do seu custo benefício, e já apresentam problemas em relação a toxidez de Cu em plantas de cobertura e videiras (DE CONTI et al., 2018). Por isso, alguns produtores passaram a utilizar fungicidas à base de Zn em detrimento dos fungicidas cúpricos. Com isso, o fato de fungicidas contendo Zn na sua composição, como o mancozeb, serem utilizados como alternativa a fungicidas cúpricos torna-se necessário antever o que poderá acontecer num futuro próximo às espécies de plantas presentes aos solos dos vinhedos, a partir das sucessivas aplicações de fungicidas que contém Zn na sua formulação (TIECHER et al., 2017). Visto que, os metais presentes nos fungicidas podem ser lavados da superfície das folhas pelas chuvas. Além disso, nas folhas senescentes ou brotos podados podem conter os metais derivados das aplicações, resultando em maiores

concentrações desses elementos no solo ao longo dos anos (KOMAREK et al., 2010; MACKIE et al., 2012; COUTO et al., 2015).

Os solos arenosos encontrados na Região da Campanha Gaúcha são caracterizados por possuírem baixos teores de argila e de matéria orgânica, além de serem naturalmente ácidos. Com isso, existem poucos sítios de troca iônica onde o Zn pode ser adsorvido. Desta forma, as aplicações frequentes de fungicidas contendo metais como princípios ativos aumentam a quantidade de frações solúveis e trocáveis de Zn no solo, potencializando a toxidez às plantas (ROMEU-MORENO; MAS, 1999; NAGAJYOTI et al., 2010; FERNÁNDEZ-CALVIÑO et al., 2012). Assim, a presença de espécies vegetais nativas, que coabitam essas áreas de vinhedos, podem ser consideradas como plantas colaboradoras das videiras por minimizar os efeitos tóxicos causados pelo excesso de metais, como o Zn.

A evolução das espécies nativas do bioma Pampa se deu em grande parte nos solos ácidos e quimicamente pobres, indicando a presença de mecanismos adaptativos às condições de baixos níveis de nutrientes e à presença de elementos tóxicos (RAMPIM; LANA, 2013; QUADROS; TRINDADE; BORBA, 2009). Estes mecanismos podem envolver a maior capacidade de absorção, translocação ou utilização de Zn nas células, bem como estarem relacionados às características bioquímicas e fisiológicas dependentes de Zn (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Com isso, é extremamente importante o conhecimento das implicações causadas pelo excesso destes metais pesados no solo ao estado fisiológico e à morfologia do sistema radicular de plantas que coabitam os vinhedos. Isso pode ajudar no entendimento dos mecanismos adaptativos ao excesso de metais, visto que, essas espécies podem ser potenciais fitorremediadoras e/ou fitoestabilizadoras e, assim, ajudando a diminuir a disponibilidade de metais pesados que reduzem a produtividade das videiras.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta e incubação do solo

O solo utilizado foi um Argissolo Vermelho (EMBRAPA, 2013), Hapludalf Típico (Soil Survey Staff, 2006) de uma área de campo natural não antrópico com concentração naturalmente baixa de Zn, adjacente a vinhedo da região da Campanha Gaúcha, no município de Santana do Livramento (RS), localizado no Rio Grande do Sul, estado do sul do Brasil

(30°47'23.5"S e 55°22'7.0"W). 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).

O solo foi coletado na camada de 0-15 cm em novembro de 2018. Posteriormente, foi seco ao ar e passado em peneira com malha de 2 mm. A caracterização física e química do solo é apresentada na tabela 1. O solo de campo natural foi dividido e adicionado em sacos plásticos contendo 10 kg de solo cada. Adicionou-se 0,230 e 0,300 g kg⁻¹ de CaCO₃ e MgO, respectivamente, para elevar o pH do solo para até 5,5. Os corretivos foram adicionados e misturados com o solo e, em seguida, adicionou-se água destilada para elevar a capacidade de campo a 70%. Todo o conteúdo foi imediatamente homogeneizado e incubado por um período de 30 dias.

Em seguida, o solo foi seco, homogeneizado e foram adicionados 0,403 g kg⁻¹ e 0,833 g kg⁻¹ de superfosfato triplo (SFT 41% de P₂O₅) e KCl (60% K₂O), respectivamente, e irrigado com 100 ml kg⁻¹ de água destilada. Após a adubação, o solo foi submetido a um período de incubação de 30 dias. Durante o período de incubação de corretivos e fertilizantes, 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%.

Os tratamentos de doses de Zn foram adicionados ao solo na forma de ZnSO₄.7H₂O (60%) e ZnCl₂ (40%). O solo foi incubado em sacos plásticos por 180 dias, com a substituição da água evaporada a cada 2 dias para manter a umidade. Após a incubação, as mudas das três espécies de gramíneas nativas foram transplantadas para vasos contendo 5 kg de solo. Foram colocadas três plantas por vaso. Durante o cultivo, o solo foi irrigado diariamente com água destilada para manter a capacidade de campo a 70%.

Tabela 1 - Características físicas e químicas da camada de 0-15 cm em um Argissolo Vermelho (Typic Hapludalf) em condições de campo natural.

Características	Campo natural (0-15 cm)
Argila (g kg^{-1})	9,0
Matéria orgânica (%)	0,8
pH(H_2O)	5,3
P disponível por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	3,7
K disponível por Mehlich-1 ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,215
Al trocável por KCl 1 mol L^{-1} ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,1
Ca trocável por KCl 1 mol L^{-1} ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,93
Mg trocável por KCl 1 mol L^{-1} ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,42
Zn disponível por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	0,75
Cu disponível por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	1,29
CTC efetiva _a ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	1,7
CTC pH7 _b ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	3,6

a Capacidade de efetivamente trocar cátions.

b Capacidade de trocar cátions em pH 7.

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 ($29^{\circ}42'56,44'' \text{ S}$ e $53^{\circ}43'12,57'' \text{ W}$). A temperatura média do ar no interior da casa de vegetação foi 26°C e a umidade relativa do ar 50%. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Os tratamentos consistiram de cinco doses de Zn (0, 30, 60, 120 e $180 \text{ mg Zn kg}^{-1}$) e três espécies de gramíneas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum*). As plantas foram coletadas em uma área da pastagem natural, pertencente a Universidade Federal de Santa Maria e coordenado pelo grupo de estudos de forragicultura do Laboratório de Ecologia de Pastagens Naturais (LEPAN) no 15 de julho de 2018. A área escolhida não apresenta histórico de adubação e correção da acidez do solo. Após a coleta das plantas no campo, os perfilhos foram separados, lavados e plantados em bandejas plásticas (capacidade de 15 litros, inclinadas sobre a mesa em ângulo de 20° para evitar acúmulo de solução), contendo areia como substrato. Os perfilhos das três espécies de gramíneas nativas foram retirados da condição de pré-cultivo em areia pura, com padronização de três raízes e três folhas completamente expandidas e transplantados para vasos contendo 5 kg de solo de campo natural com cinco concentrações

crecente de Zn. Três plântulas uniformes foram mantidas por unidade experimental. Ao longo do desenvolvimento, as plantas foram irrigadas com água destilada. Após 90 dias de cultivo foram realizadas a coleta das plantas e as avaliações.

4.2.3 Produção de massa seca

As plantas foram seccionadas em folhas e raízes e acondicionadas em sacos de papel pardo e levadas a estufa a 65 °C até atingir massa constante, para posterior pesagem para obtenção das massas secas de folhas (MSF), de raízes (MSR) e do total da planta (MST).

4.2.4 Concentração de nutrientes no tecido

Amostras de massas secas de 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 à digestão nitroperclórica (EMBRAPA, 2009). A concentração de P, Mg, K, Ca, Zn Fe e Mn no extrato da digestão foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, AAnalyst 200, Estados Unidos). A concentração de P foi determinada por colorimetria, utilizando a metodologia de Murphy e Riley (1962), em um espectrofotômetro (SF325NM, Bel Engineering, Itália).

4.2.5 Índice de translocação de Zn para a parte aérea e índice acumulação de Zn na raiz

O índice de translocação (IT) de Zn para a parte aérea foi definido através da seguinte equação: $[Zn] \text{ raiz} \times MS \text{ raiz} / ([Zn] \text{ raiz} \times MS \text{ raiz}) + ([Zn] \text{ parte aérea} \times MS \text{ parte aérea})$.

O índice de acumulação (IA) de Zn na raiz foi definido utilizando a seguinte equação: $[Zn] \text{ parte aérea} \times MS \text{ parte aérea} / [Zn] \text{ raiz} \times MS \text{ raiz}$.

4.2.6 Variáveis fotossintéticas

As trocas gasosas foram quantificadas aos 90 dias após o transplante das plântulas, sendo obtidas utilizando uma radiação de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, por meio de um analisador de gás por radiação infra-vermelho [Infrared Gas Analyser (IRGA), Mod. Li-COR® 6400 XT]. As medidas foram realizadas durante o período

das 08h:00 às 11h:00 hs. As medições foram feitas na penúltima folha totalmente expandida de três perfilhos por vaso.

As variáveis analisadas foram: taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), concentração intercelular de CO₂ (C_i), taxa de transpiração (E), condutância estomática de vapores de água (G_s), eficiência do uso da água (EUA), obtida pela relação entre quantidade de CO₂ 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 CO₂ fixado pela fotossíntese e a concentração intercelular de CO₂.

4.2.7. Variáveis bioquímicas

Para análise bioquímica fez-se a coleta da parte aérea das plantas e imediatamente congeladas em N líquido e armazenadas em ultrafreezer -80 °C para posterior análise.

4.2.8 Concentração de clorofilas e carotenoides

A determinação da concentração das clorofilas e os carotenoides seguiu o método de Hiscox e Israelslam (1979) e calculados com a ajuda da fórmula de Lichtenthaler (1987). Utilizou-se 0,05 g de material fresco para a determinação. As amostras frescas das folhas foram incubadas a 65 °C em dimetilsulfóxido (DMSO) até os pigmentos serem completamente removidos do tecido. Para a determinação da clorofila a, clorofila b e carotenoides, a absorbância da solução foi determinada em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 663 e 645 nm e 470 nm, respectivamente. A concentração dos pigmentos foi expressa em mg g⁻¹ de massa fresca (MF).

4.2.9 Atividade de superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD)

Para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase foram utilizadas 0,5 g de amostras frescas da parte aérea. As amostras de raízes e folhas foram maceradas e homogeneizadas utilizando 3 ml de solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,8), contendo 1 mM EDTA e 0,5 % Triton X-100. O homogeneizado foi centrifugado a 13 000 rpm durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para ensaio de atividade enzimática e concentração de proteínas solúveis (ZHU et al., 2004; BRADFORD, 1976). A concentração de proteína solúvel total de cada amostra foi determinada num

espectrofotômetro a 595 nm como descrito por Bradford (1976). A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis e Ries (1977), enquanto a atividade da POD foi determinada de acordo com Zeraik et al. (2008). A atividade das enzimas foi expressa em U mg⁻¹ proteína.

4.2.10 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado conforme a metodologia de Loreto; Velikova (2001), sendo que 0,3 g da parte aérea foram homogeneizadas em 2,0 mL de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA) (p/v). Após, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C e em 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (10 mM) (pH 7,0) e 1 mL de KI (1M). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro à 390 nm. A concentração de H₂O₂ foi expressa como µmol g⁻¹ peso fresco.

4.2.11 Peroxidação lipídica (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)

As TBARS na parte aérea foram estimadas através da metodologia proposta por El-moshaty et al. (1993), medindo os danos celulares através do acúmulo de malondialdeído (MDA) como produto final da peroxidação lipídica, pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). A peroxidação lipídica foi expressa em nmol MDA mg⁻¹ proteína.

4.2.12 Análise estatística

Em complementação a análise de variância foi realizada uma análise exploratória multivariada de componentes principais (PCA), utilizando o software Canoco versão 4.5 (Ter Braak and Smilauer, 2002). A PCA foi idealizada a partir dos dados de concentração de elementos em raízes e parte aérea (P, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn), parâmetros de crescimento das plantas (massa seca de raízes, de parte aérea, total), parâmetros fotossintéticos (clorofilas *a*, *b* e totais, carotenoides, fotossíntese líquida, condutância estomática, concentração intercelular de CO₂, taxa transpiratória, eficiência de uso da água, eficiência instantânea de carboxilação da Rubisco), e de estresse oxidativo na parte aérea (POD, H₂O₂, TBARS).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Concentração de Zn no solo e produção de massa seca

A concentração de Zn disponível no solo aumentou linearmente com o aumento das doses de Zn aplicadas no solo (Figura 1). A produção de massa seca de parte aérea (MSPA), de raiz (MSR) e total (MST) das plantas foram alteradas distintamente entre as espécies de gramíneas pelo aumento da concentração de Zn no solo (Figura 2 a, b, c, d). As espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* diminuíram a produção de MSPA e MSR com o aumento das doses de Zn no solo.

Para MSPA, observou-se uma redução de 64% e 67%, respectivamente, em *P. notatum* e *P. plicatulum*, na maior dose de Zn em relação ao controle (Figura 2 a). Para MSR houve redução de 79% para *P. notatum* e 86% para *P. plicatulum* (Figura 2 b). A espécie *A. affinis* apresentou incremento de MSPA e MSR na presença de 120 mg Zn kg⁻¹, quando comparadas ao controle. Para MSPA o aumento foi de 51% e para a MSR 66% na maior dose em relação ao controle.

Para a MST, as espécies apresentaram um comportamento semelhante ao observado para MSPA e MSR, sendo o aumento das concentrações de Zn prejudicial para as espécies *P. notatum* e *P. plicatulum*. Já para a espécie *A. affinis* o aumento das doses de Zn aumentaram a MST (Figura 2 c). A relação MSR/MSPA em *A. affinis* diminuiu com o aumento da concentração de Zn no solo. Contudo, *P. notatum* a MSR/MSPA aumentou quando cultivada em solo com 30 e 60 mg Zn kg⁻¹. A espécie *P. plicatulum* apresentou redução de 60% na MSR/MSPA na presença da maior dose de Zn (Figura 2 d).

Figura 1 - Teor de Zn extraído do solo (extrator Melich-1) submetido as doses aplicadas (0, 30, 60, 120 e 180 mg Zn kg⁻¹) após 90 dias de cultivo das gramíneas. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.

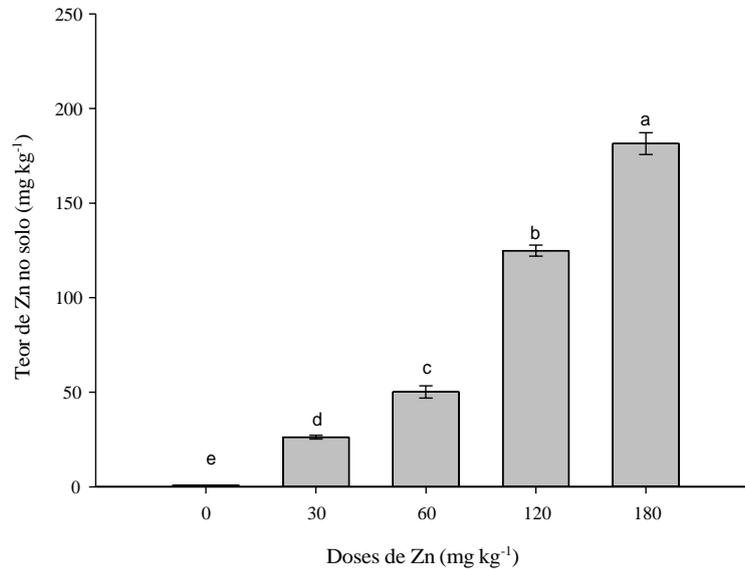
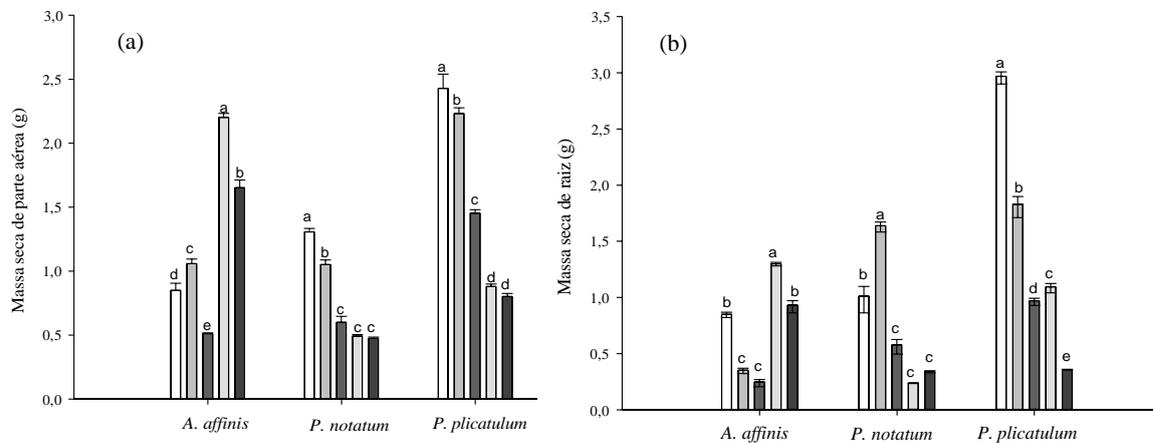
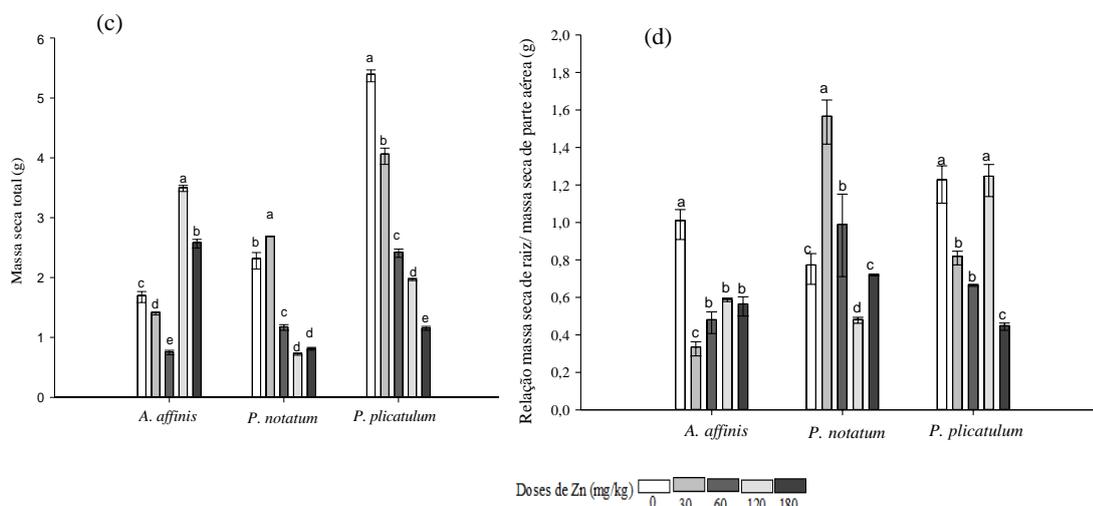


Figura 2 - Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raízes (b), massa seca total (c) e relação entre a massa seca de raiz e a massa seca de parte aérea (d), em três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum*), em resposta as doses de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg kg⁻¹) aplicadas no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.



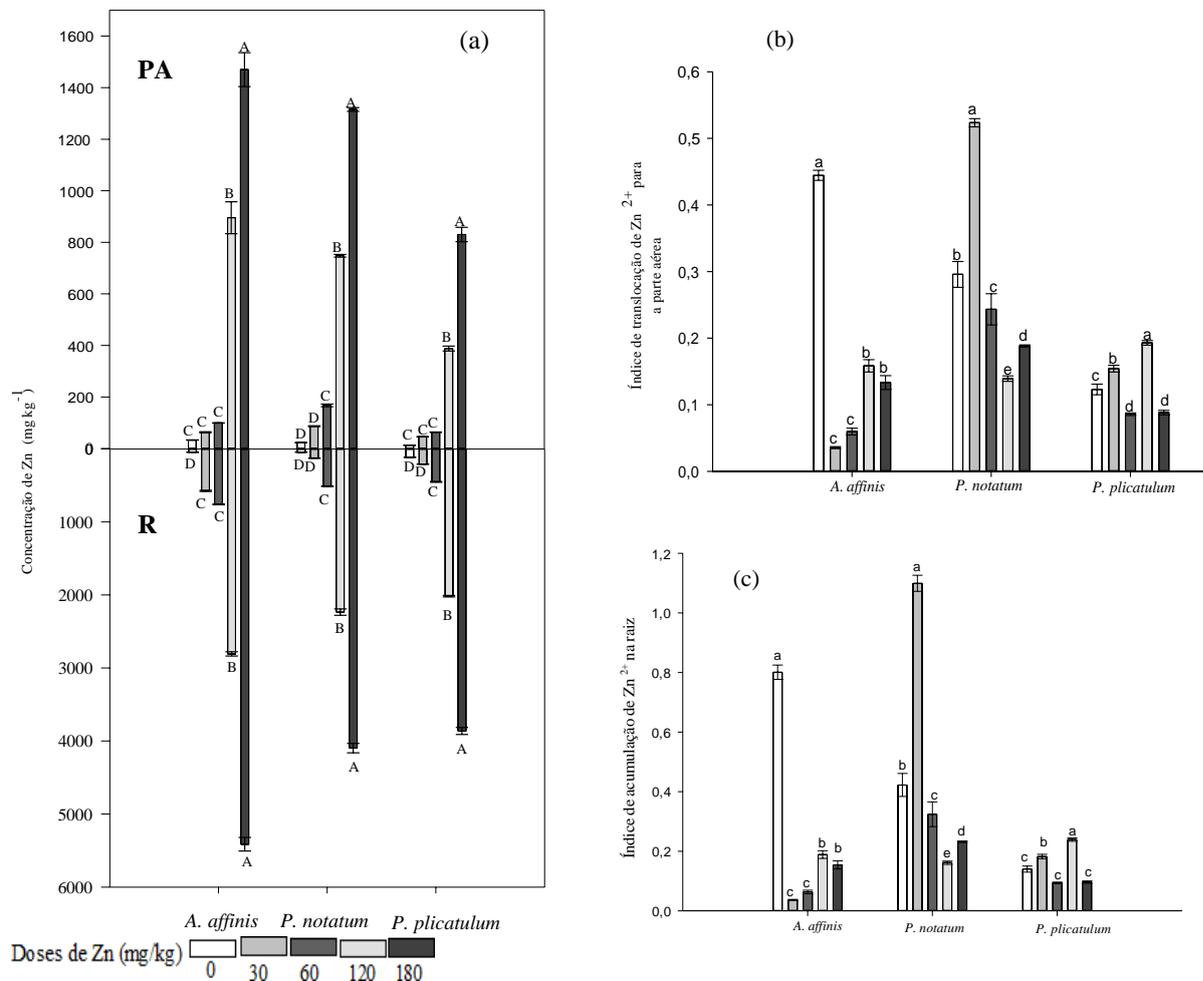


4.3.2 Concentração de Zn na parte aérea e raiz, índice de translocação de Zn para a parte aérea e acumulação de Zn na raiz.

O aumento das doses de Zn no solo provocou aumento da concentração de Zn tanto na parte aérea quanto nas raízes das três espécies. Sendo que, *A. affinis* apresentou maior concentração de Zn na parte aérea e raízes em comparação as demais espécies (Figura 3 a). O índice de translocação de Zn (IT_{Zn}) na parte aérea diminuiu em 70% na espécie *A. affinis* na maior dose de Zn em relação ao controle. Enquanto, para a espécie *P. notatum*, houve aumento do IT_{Zn} em 79% na presença de 30 mg Zn kg⁻¹ em relação ao controle. Já *P. plicatulum* apresentou aumento de 37% no IT_{Zn} na presença de 120 mg Zn kg⁻¹ em relação ao controle.

O índice de acumulação de Zn (IA_{Zn}) na raiz apresentou comportamento semelhante ao IT_{Zn} para a parte aérea. Em que *A. affinis* diminuiu o IA_{Zn} nas doses de 30 e 60 mg Zn kg⁻¹ e posteriormente aumentou nas maiores doses (120 e 180 mg Zn kg⁻¹). Já a espécie *P. notatum* apresentou maior IA_{Zn} na dose de 30 mg Zn kg⁻¹ e a espécie *P. notatum* apresentou tal comportamento na dose de 120 mg Zn kg⁻¹. Sendo que *P. plicatulum*, em que as doses 60 e de 180 mg Zn kg⁻¹ não diferiu do controle (Figura 3 c).

Figura 3 - Concentração de Zn nos tecidos da parte aérea e raiz (A); Índice de translocação de Zn para a parte aérea (B) e Índice de acumulação de Zn nas raízes (C) de três espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa submetidas a doses crescentes de Zn (0, 30, 60, 120 e 180 mg Zn kg⁻¹) na solução nutritiva do cultivo em hidroponia. Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.



4.3.3 Concentrações de nutrientes

O acréscimo das concentrações de Zn no solo afetou distintamente as concentrações dos nutrientes nos tecidos das três espécies de gramíneas estudadas. A concentração de P na parte aérea nas três gramíneas apresentou aumento com o acréscimo das doses de Zn (Tabela 1). Já nas raízes, a espécie *A. affinis* apresentou diminuição na concentração de P com o aumento das doses de Zn. Por outro lado, *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram aumento da concentração com o aumento da presença de Zn.

Em relação à concentração de K na parte aérea, verificou-se aumento para as três espécies com o acréscimo das doses de Zn, exceto para a espécie *P. plicatulum*, na dose de 180 mg Zn kg⁻¹ (Tabela 1). Nas raízes, a concentração de K aumentou para as espécies *P. notatum* e *P. plicatulum*, enquanto em *A. affinis* houve diminuição com o aumento das doses de Zn. Quanto às concentrações de Ca na parte aérea verificou-se aumento nas espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* ou diminuição na espécie *A. affinis* com o aumento das doses de Zn (Tabela 1). Nas raízes houve diminuição da concentração de Ca em *A. affinis* nas maiores doses (120 e 180 mg Zn kg⁻¹). Para *P. notatum* e *P. plicatulum* a concentração de Ca aumentou com o acréscimo das doses de Zn. A concentração de Mg na parte aérea aumentou nas três espécies de gramíneas pelo aumento das doses de Zn. Nas raízes, no geral houve aumento na concentração de Mg nas três espécies de gramíneas estudadas.

A concentração de Cu na parte aérea aumentou para a espécie *A. affinis* e diminuiu para as espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* com o aumento das concentrações de Zn aplicadas no solo. Já nas raízes, a concentração de Cu diminuiu em *A. affinis* até a dose de 120 mg Zn kg⁻¹, sendo que na maior dose houve um aumento da concentração de Cu. Em *P. notatum* e *P. plicatulum* houve aumento nas concentrações de Cu com o aumento das doses de Zn no solo.

O aumento das concentrações de Zn no solo provocou aumento da concentração de Fe na parte aérea das três gramíneas. No entanto, nas raízes a concentração de Fe aumentou em *A. affinis*, mas diminuiu em *P. notatum* e *P. plicatulum*. Já para a concentração de Mn nas raízes e parte aérea, houve aumento nas três espécies de gramíneas, com exceção de *P. plicatulum*, onde houve diminuição da concentração de Mn nas raízes com o aumento das concentrações de Zn (Tabela 1).

Tabela 2 - Concentrações de P, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Mn na parte aérea e raízes de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum*) em resposta a concentrações de Zn (0, 30, 60, 120 e 180 mg kg⁻¹) na solução nutritiva.

Nutrientes	Concentração de Zn ²⁺ (mg kg ⁻¹)	Concentração de nutrientes					
		<i>A.affinis</i>		<i>P.notatum</i>		<i>P.plicatulum</i>	
		Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
		g kg ⁻¹					
P	0	1,25 c*	1,44 a	1,26 b	0,64 c	0,98 b	1,01 c
	30	1,26 c	1,36 b	1,25 b	0,66 c	0,97 b	0,94 d
	60	1,25 c	1,08 c	1,21 b	0,75 b	1,16 a	1,12 a
	120	1,68 a	0,96 d	1,44 a	0,93 a	1,23 a	1,16 a
	180	148 b	0,92 d	1,43 a	0,93 a	1,24 a	1,06 b
K	0	16,26 c	16,33 a	18,25 c	7,18 c	21,08 b	16,63 c
	30	16,16 c	14,36 b	19,28 b	8,46 b	20,69 b	16,82 c
	60	16,28 c	14,19 b	19,29 b	14,64 a	22,65 a	17,61 b
	120	20,38 a	13,64 c	19,90 a	14,69 a	22,16 a	17,81 b
	180	21,16 a	13,62 c	20,11 a	14,56 a	21,09 b	18,35 a
Ca	0	5,84 a	0,95 a	2,40 d	0,35 b	2,39 c	0,74 d
	30	5,90 a	0,94 a	2,92 d	0,35 b	3,49 b	0,99 c
	60	6,03 a	0,90 a	4,46 c	0,42 a	3,55 b	1,44 a
	120	3,21 b	0,34 b	5,29 b	0,41 a	3,53 b	1,28 b
	180	3,20 b	0,35 b	5,55 a	0,41 a	4,61 a	1,28 b
Mg	0	1,52 c	0,77 b	0,86 e	0,26 c	0,99 c	0,68 d
	30	1,85 b	0,82 a	1,10 d	0,21 c	1,12 c	0,80 c
	60	2,28 a	0,83 a	1,38 c	0,32 b	1,15 c	1,14 a
	120	2,47 a	0,87 a	2,72 b	0,31 b	1,43 b	0,97 b
	180	2,54 a	0,76 b	2,65 a	0,41 a	1,70 a	0,81 c
		mg kg ⁻¹					
Cu	0	7,36 c	12,59 b	10,95 a	7,06 c	7,59 a	8,42 c
	30	7,30 c	12,36 b	7,42 b	7,47 c	7,87 a	8,59 c
	60	7,46 c	9,14 d	6,51 c	7,36 c	7,24 b	11,55 b
	120	8,76 b	10,79 c	6,28 d	8,64 b	6,38 c	13,35 a
	180	9,30 a	14,44 a	6,08 d	9,18 a	6,15 c	13,18 a
Fe	0	264,16 c	1010,57 d	164,42 c	2487,04 a	123,79 c	1871,38 a
	30	312,81 b	1486,20 c	182,81 b	2354,91 b	123,11 c	1848,87 a
	60	314,94 b	1693,37 b	183,90 b	1885,45 c	127,61 c	1851,69 a
	120	333,42 a	2427,62 a	225,30 a	1644,63 d	142,85 b	1549,68 b
	180	334,14 a	2452,40 a	225,06 a	1686,90 d	165,99 a	1960,10 a
Mn	0	52,56 d	71,85 e	47,25 e	111,12 d	71,16 e	92,38 a
	30	51,55 d	98,66 d	83,07 d	116,97 c	90,20 d	94,05 a
	60	74,36 c	108,05 c	89,07 c	119,58 c	98,25 c	87,62 b
	120	82,14 b	143,80 b	116,20 b	135,66 b	165,30 b	82,07 c
	180	109,06 a	194,14 a	156,43 a	159,70 a	213,92 a	81,97 c

Os valores foram obtidos a partir das médias de três repetições referentes às espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa. *Letras distintas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos com Zn²⁺ para uma mesma espécie.

4.3.4 Trocas gasosas da folha

A taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) das gramíneas apresentou diferentes comportamentos com o incremento da concentração de Zn no solo. A *A. affinis* apresentou uma redução de 33% na presença de 30 a 120 mg Zn kg⁻¹ aplicado, quando comparada as plantas

cultivadas no solo controle, mas ocorreu uma recuperação da A na maior dose (180 mg Zn kg⁻¹) aplicada (Figura 4 a). As espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram redução na A respectivamente de 90% e 72%, na maior dose de Zn, em relação às plantas cultivadas no solo controle.

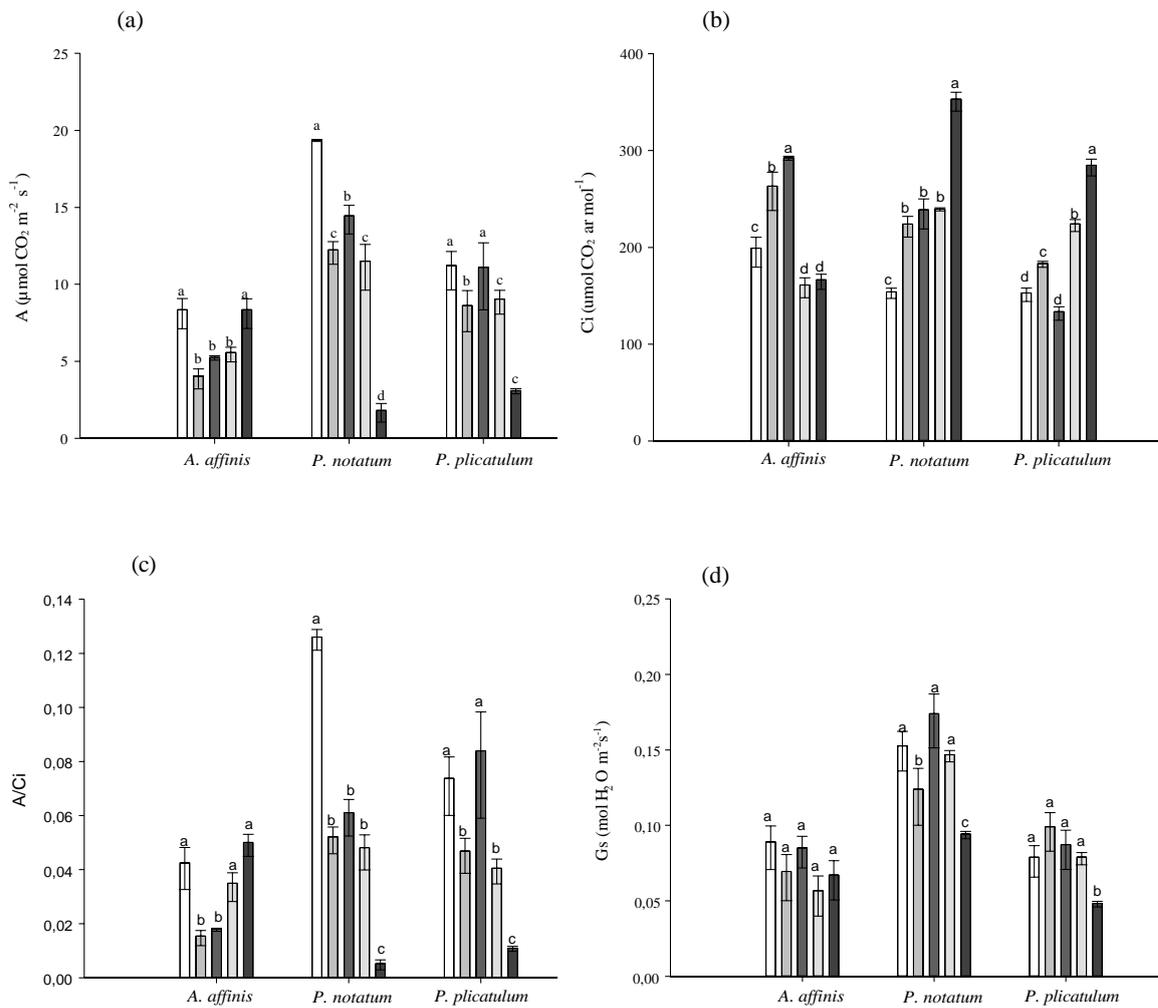
A concentração interna de CO₂ (Ci) apresentou aumento nas maiores concentrações de Zn para as espécies *P. notatum* e *P. plicatulum*. Esse aumento foi de 56% e 46% na maior dose, em relação às plantas cultivadas no tratamento controle. Para a espécie *A. affinis* ocorreu aumento em Ci na presença de 30 e 60 mg Zn kg⁻¹ e, por outro lado, redução na Ci nas doses de 120 e 180 mg Zn kg⁻¹.

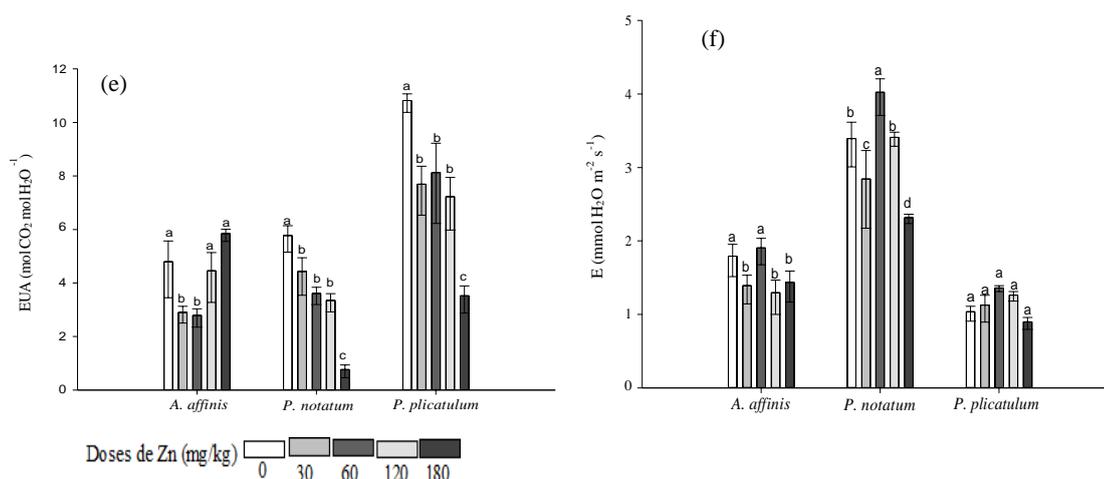
Para o parâmetro de eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/Ci), a espécie *A. affinis* não apresentou alteração nas doses de 120 e 180 mg Zn kg⁻¹. No entanto, nas doses de 30 e 60 mg Zn kg⁻¹ houve decréscimo neste parâmetro. As espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram decréscimo em A/Ci de 95% e 85% respectivamente, na presença de 180 mg Zn kg⁻¹ (Figura 4 b).

Para a condutância estomática de vapores de água (Gs) as espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram redução na maior dose de Zn (180 mg Zn kg⁻¹). Em geral, até a dose de 120 mg Zn kg⁻¹ a Gs não foi afetada em ambas as espécies (Figura 3 d). A espécie *A. affinis* não apresentou alteração nesse parâmetro com o aumento das doses de Zn.

A taxa transpiratória (E) das espécies *A. affinis* e *P. notatum* foi diminuída na presença da maior dose de Zn aplicada (Figura 4 e). Enquanto que para a *P. plicatulum* o aumento das doses de Zn não causou redução na E. Para as espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* a eficiência de uso da água (EUA) apresentou alteração com o aumento das doses de Zn. Enquanto para *A. affinis* houve aumento deste parâmetro nas maiores doses (120 e 180 mg Zn kg⁻¹) e uma diminuição nas doses intermediárias (30 e 60 mg Zn kg⁻¹) em relação ao tratamento controle (Figura 4 f).

Figura 4 - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (a), eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (b), concentração intercelular de CO₂ (c), condutância estomática (d) taxa de transpiração (e) e eficiência do uso da água (f) de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatum*) em resposta as doses de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg Zn kg⁻¹) adicionado no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam \pm desvio padrão.

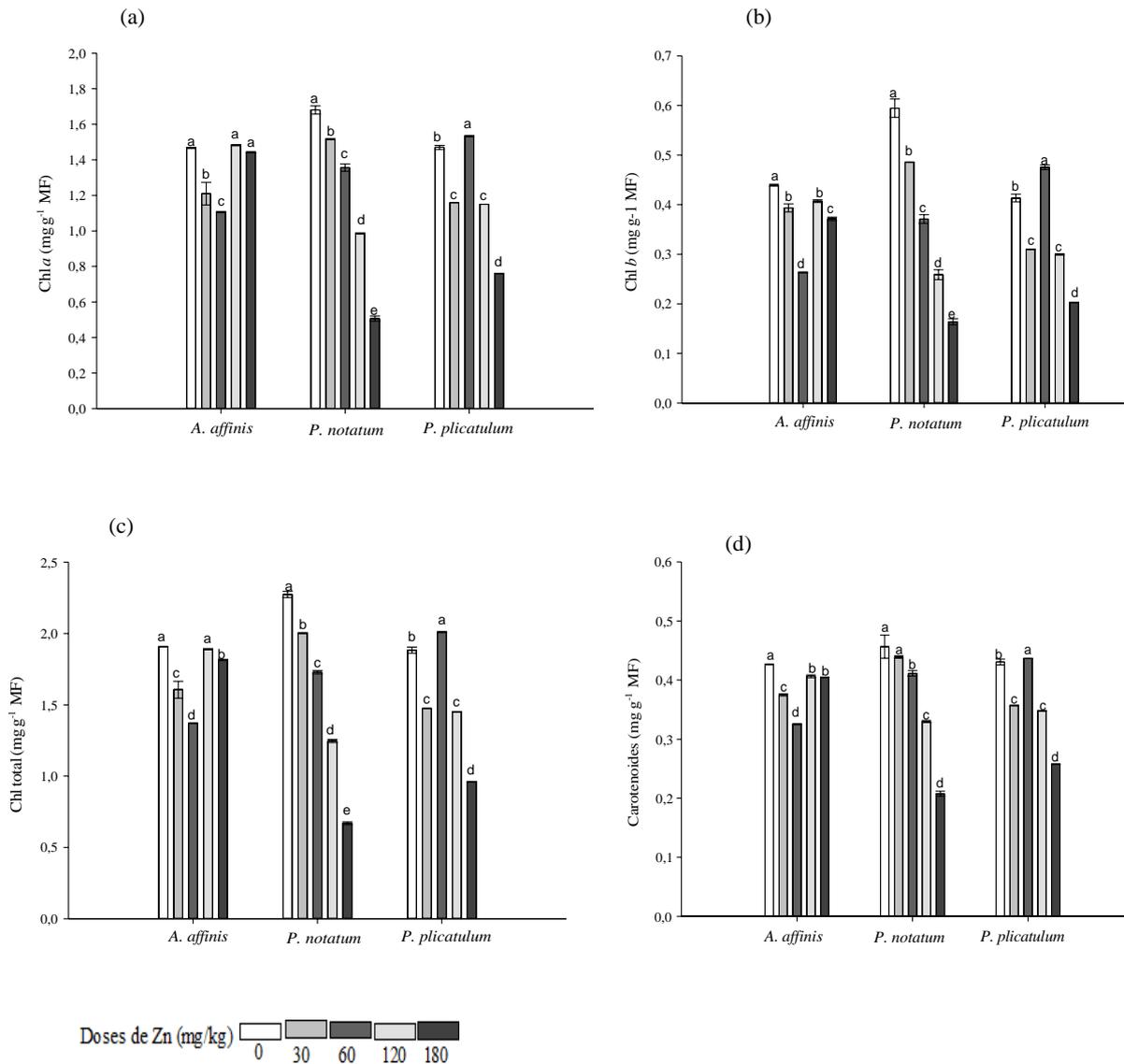




4.3.5 Concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides das três gramíneas sofreram alterações distintas na presença de crescentes doses de Zn (Figura 5 a, b, c, d). Na espécie *A. affinis*, as maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos foram observadas no controle e maiores doses de Zn (120 e 180 mg Zn kg⁻¹). A concentração de 60 mg Zn kg⁻¹ causou maior redução das concentrações dos pigmentos fotossintéticos para esta espécie. Na espécie *P. notatum*, as concentrações de 120 e 180 mg Zn kg⁻¹, causaram redução na concentração dos pigmentos fotossintéticos (Figura 5 a, b, c, d). Na espécie *P. plicatum* as maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos foram observadas nas plantas cultivadas no solo com 60 mg Zn kg⁻¹, mas, por outro lado, apresentou redução nas concentrações dos pigmentos nas doses de 30, 120 e 180 mg Zn kg⁻¹.

Figura 5 - Concentrações de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c), relação Chl *a*/ Chl *b* (d), e carotenoides (e) de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatum*) em resposta as doses de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg Zn kg⁻¹) aplicadas no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas (P < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão.



4.3.6 Variáveis bioquímicas

A concentração de H₂O₂ na parte aérea das três gramíneas apresentou efeito isolado entre dose e espécie. Sendo que a *A. affinis* apresentou maior concentração de H₂O₂ que as

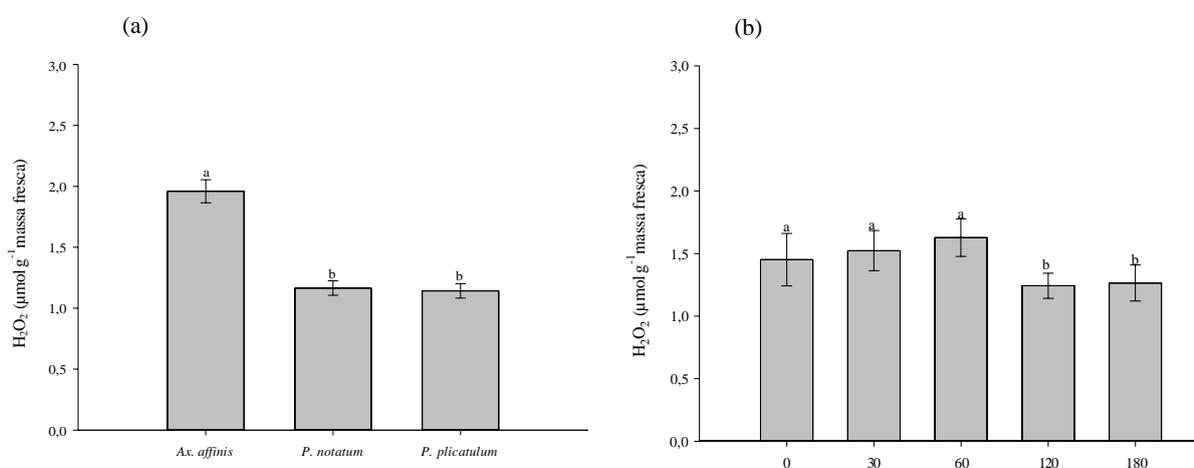
demais espécies (Figura 6 d). Na presença de 120 e 180 mg Zn kg⁻¹ houve diminuição na concentração de H₂O₂ (Figura 6 a, b).

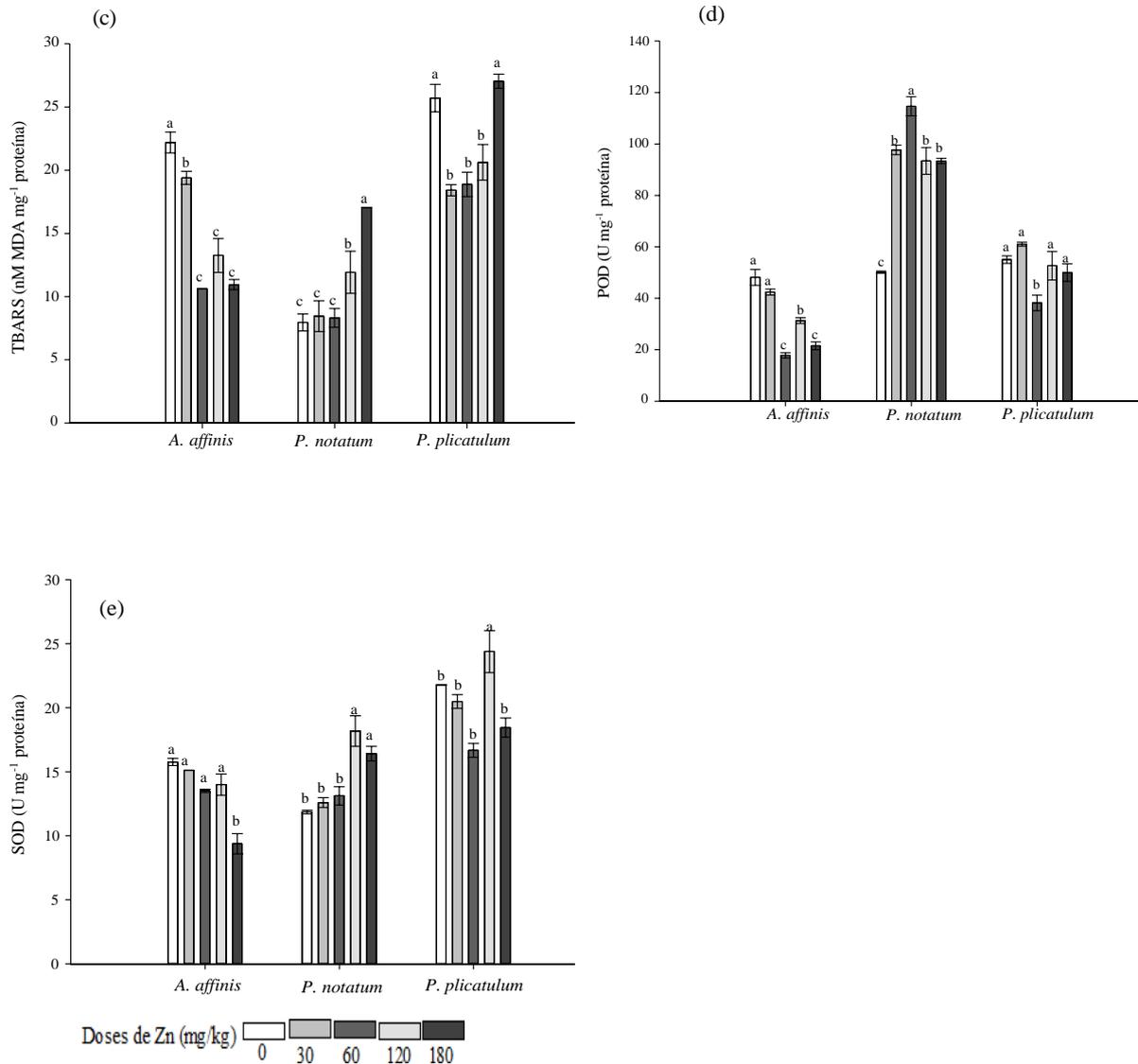
A concentração de malondialdeído (MDA) na parte aérea apresentou diferenças marcantes entre as espécies. A espécie *A. affinis* apresentou diminuição da concentração de MDA com o aumento da dose de Zn. A concentração de MDA na parte aérea da espécie *P. notatum* aumentou na presença de 120 e 180 mg Zn kg⁻¹, já *P. plicatulum* apresentou redução na concentração de MDA no intervalo de doses de 30 a 120 mg Zn kg⁻¹, por outro lado, na maior dose (180 mg Zn kg⁻¹) não diferiu do tratamento controle (Figura 6 c).

A atividade da enzima POD das plantas de *A. affinis* foi reduzida com o aumento das concentrações de Zn. A espécie *P. notatum* apresentou aumento da atividade da enzima POD com o aumento das doses de Zn, sendo que, na concentração de 60 mg Zn kg⁻¹ ocorreu a maior atividade da enzima. A espécie *P. plicatulum* apresentou redução da atividade da POD na dose de 60 mg Zn kg⁻¹ e nas demais doses não apresentou alteração na atividade desta enzima (Figura 6 d).

Em relação à SOD, *A. affinis* apresentou redução na atividade da enzima apenas na maior concentração de Zn. Já a espécie *P. notatum* apresentou maior atividade de SOD nas maiores doses (120 e 180 mg Zn kg⁻¹). Enquanto que a *P. plicatulum* apresentou aumento da atividade da SOD, na presença de 120 mg Zn kg⁻¹ quando comparado ao controle (Figura 6 e).

Figura 6 - Concentração de H₂O₂ (a,b), peroxidação lipídica (TBARS) (c), atividade das enzimas POD (d) e SOD (e) de três espécies de gramíneas nativas (*A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum*) em resposta as concentrações de Zn (0, 30, 60, 120, 180 mg kg⁻¹) no solo. Letras distintas indicam diferenças significativas (P < 0,05) entre os tratamentos com Zn para uma mesma espécie. As barras verticais representam ± desvio padrão.





4.3.7 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada extraindo apenas os dois primeiros componentes (PC1 e PC2), os quais somados explicaram praticamente 60% da variabilidade original dos dados (Figura 7). O componente principal 1 explicou cerca de 34% da variabilidade, e teve maior influência na concentração de clorofilas, carotenoides, bem como, na fotossíntese e eficiência de carboxilação da Rubisco. O PC1 foi eficiente em separar os pontos a partir das doses de Zn aplicadas ao solo (Figura 7 a). Assim, os pontos localizados em valores negativos do PC1 (a esquerda de zero), foram oriundos da aplicação de 0, 30 e 60 mg Zn kg⁻¹ no solo para o cultivo de *P. notatum* e *P. plicatulum*. Além das aplicações de 0 e 120

mg Zn kg⁻¹ no cultivo de *A. affinis*. O grupo a direita de zero do PC1 foi formado por pontos da aplicação de 120 e 180 mg Zn kg⁻¹ no solo para o cultivo de *P. notatum* e *P. plicatulum*. E também, das aplicações de 30, 60 e 180 mg Zn kg⁻¹ no cultivo de *A. affinis*. O componente principal 2 explicou aproximadamente 23% da variação dos dados, e as variáveis resposta que mais influenciaram foram a concentração de Ca, TBARS e a taxa de transpiração. O PC2 foi muito eficiente em separar o comportamento de cada espécie nativa (Figura tal a). Assim, mesmo comportando-se de maneira semelhante frente a aplicação de todas as doses de Zn no solo, *P. notatum* (elipse roxa) e *P.plicatulum* (elipse laranja) foram agrupadas separadamente no PC2. Neste sentido, também foi possível identificar as plantas de *A. affinis* (círculo marrom), as quais ocuparam ambos os lados do eixo y (PC2). As concentrações de clorofila a, b, totais e carotenoides se correlacionaram positivamente entre si e negativamente com a concentração de H₂O₂ em parte aérea (Figura 7 b). A fotossíntese líquida teve correlação linear negativa com a concentração de manganês em parte aérea. A concentração de Fe em raízes apresentou correlação negativa com a concentração de Cu em raízes. A Gs também apresentou correlação linear negativa com as concentrações de P e K em raízes. As concentrações de Ca e Mg em raízes correlacionaram-se positivamente entre si e com a atividade da SOD em parte aérea, e negativamente com a E. As concentrações de Zn e Mg correlacionaram positivamente entre si e de forma negativa com as massas secas de raiz e parte aérea. Além disso, as concentrações de Zn no solo se correlacionaram positivamente com as concentrações de Zn nas raízes, Ci, Ca, Mg e Zn em parte aérea.

4.4 DISCUSSÃO

A redução na produção de massa seca pode ser proveniente da inibição do alongamento e divisão celular das raízes causada pelas altas concentrações de Zn na solução do solo (HEWIT, 1983; ARDUINI et al., 1994; JAIN et al., 2010). Portanto, a diminuição de MSPA, MSR e MST nas espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* pelo aumento das doses de Zn no solo pode estar relacionada a sensibilidade dessas espécies ao excesso de Zn. Visto que, a produção de massa seca está, diretamente, associada à tolerância da espécie ao contaminante, pois efeitos tóxicos podem ser atribuídos ao acúmulo de Zn nas folhas e raízes, podendo afetar a homeostase da planta ao interferir na absorção, transporte e regulação de íons (WANG et al., 2000; CHERIF et al., 2011), resultando no desequilíbrio dos processos, como a transpiração e fotossíntese, e consequentemente na redução do crescimento (SAGARDOY et al., 2009).

Entretanto, a espécie *A. affinis* apresentou aumento na produção de MSPA, MSR e MST com o aumento das concentrações de Zn no solo, sugerindo que essa espécie possui mecanismos de tolerância ao excesso de Zn (Figura 2 a, b, c, d). Esses mecanismos podem estar ligados, a retenção de uma quantidade do metal na parede celular da raiz ou ainda contar com mecanismos de compartimentação e complexação de Zn com ácidos orgânicos nos vacúolos (GODBOLD et al., 1984). Além disso, houve uma correlação positiva entre a concentração de Zn no solo, na raiz e na parte aérea das espécies, sendo que, a concentração de Zn foi maior nas raízes (Figura 3 a). O maior acúmulo de Zn nas raízes indica que as gramíneas complexaram o Zn em excesso na raiz para evitar o dano oxidativo na parte aérea (CAKMAK; MARSCHNER, 1987).

Altas concentrações de metais pesados potencialmente tóxicos, como o Zn, podem causar redução das concentrações de pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides de plantas (CAMBROLLÉ et al., 2015). Esse comportamento pode ser atribuído ao efeito adverso do excesso de Zn na cadeia de transferência de elétrons na fotossíntese, bem como diminuição da síntese de clorofila ou mesmo aumento da sua degradação (CAMBROLLE et al., 2012).

Para este estudo, a adição de 30 mg Zn kg⁻¹ provocou diminuição das concentrações de pigmentos em *P. plicatulum*. A redução se acentuou com o aumento das doses de Zn, porém na dose de 60 mg Zn kg⁻¹ a espécie *P. plicatulum* apresentou aumento na concentração dos pigmentos. Tiecher et al. (2017) também observaram comportamento semelhante nas concentrações de pigmentos fotossintéticos em aveia preta na presença de doses crescentes de Cu e Zn.

O aumento da concentração de pigmentos fotossintéticos na presença de algum metal tóxico pode estar associado a menor expansão foliar e, assim, maior concentração de pigmentos por unidade de massa (RAMPIM; LANA, 2013; BOSE et al., 2011; CHEN et al., 2005). Ou ainda, neste caso, devido ao fato de que o Mg central pode ser quimicamente substituído por Zn, resultando em clorofilas [Zn] mais estáveis, com propriedades muito similares (RAU et al., 2001; TAKEUCHI; AMAO, 2005; PETROVIC et al., 2006), contribuindo para a recuperação da clorofila nas doses mais altas de Zn. Tal fato pode explicar também, o aumento das concentrações de pigmentos fotossintéticos com o aumento das doses de Zn na espécie *A. affinis*. A redução da concentração de pigmentos nas espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* principalmente nas doses de 120 e 180 mg Zn kg⁻¹, pode ser a causa da redução da MSPA, MSR e MST (Figura 4 a, b, c, d). A concentração de carotenoides apresentou uma correlação negativa com o conteúdo de H₂O₂ na parte aérea das plantas (Figura 7) podendo indicar que os carotenoides desempenham um papel importante no controle de radicais livres e peróxidos, uma vez que estão envolvidos diretamente na proteção das membranas fotossintéticas (APEL; HIRT, 2004).

A concentração de 180 mg Zn kg⁻¹ ocasionou redução da taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) e na eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A/Ci) em *P. notatum* e *P. plicatulum*. Isso pode ter sido causado pelo comprometimento do aparelho fotossintético causado pela alta concentração de Zn nos tecidos. O efeito negativo do excesso de Zn na fotossíntese pode ser devido a diminuição da atividade da RuBP carboxilase/oxigenase (Rubisco), causada, provavelmente, pela competição de Zn com Mg no sítio de ativação da Rubisco. A redução da atividade do fotossistema II pode ser devida ao deslocamento de Mn, na membrana do tilacóide pelo excesso de Zn (MARSCHNER, 1995, KAYA, BURTON; HIGGS, 2001)

Por outro lado, em *A. affinis* o aumento de A na maior dose de Zn pode ser indicativo que o excesso de Zn não afetou a fotossíntese dessa espécie. Isso corrobora com o fato de que as concentrações testadas também não alteraram a concentração de pigmentos fotossintéticos (Figura 4 a, b, c, d). Além disso, ocorreu restrição na Gs para *P. notatum* e *P. plicatulum* na maior dose e aumento da Ci, em relação as plantas cultivadas no solo controle para ambas espécies (Figura 3 d). A diminuição de Gs na presença de 180 mg Zn kg⁻¹ em *P. notatum* e *A. affinis* possivelmente foi responsável pela diminuição E apenas em *P. notatum*.

A redução da A e Gs, juntamente com o aumento de Ci, em *P. plicatulum* e *P. notatum*, em virtude da exposição ao excesso de Zn, indica que o decréscimo em A não está associado a menor absorção de CO₂ pelos estômatos, e sim à diminuição da fixação dessa molécula no

mesófilo (RIZWAN et al., 2019). Ou seja, a redução de A pode estar associada à limitações fotoquímicas ou bioquímicas que ocorrem no sequestro de CO₂ nos cloroplastos, devido à inibição de enzimas ligadas ao ciclo de Calvin, como a Rubisco que são responsáveis pela fixação do carbono. A diminuição da atividade da rubisco conseqüentemente provoca uma redução da A. Essa inibição, é causada, provavelmente, pela competição de Zn com Mg no sítio de ativação da Rubisco. Sendo que, a redução da atividade do fotossistema II (PS II) pode ser devida ao deslocamento de Mn, na membrana do tilacóide pelo excesso de Zn (MATEOS-NARANJO et al., 2018).

Quanto à redução da EUA, houve uma correlação negativa com as concentrações de Zn na planta e no solo, sendo que as espécies *P. notatum* e *P. plicatum* apresentaram redução com o aumento das concentrações de Zn. Isso indica que, o estresse por Zn pode ter causado distúrbios no balanço hídrico, em virtude da menor A e à inibição da absorção e transporte de água, acarretando em menor produção de fotoassimilados (ROMEO et al., 2017; MATEOS-NARANJO et al., 2018).

As espécies *P. notatum* e *P. plicatum* foram as que tiveram seus parâmetros fisiológicos mais afetados a medida que se aumentou as doses de Zn. Isso pode ter ocorrido devido a redução da concentração de pigmentos fotossintéticos pelo excesso de Zn, afetando o transporte de elétrons na fase fotoquímica causando redução da eficiência fotossintética das plantas (CAMBROLLÉ et al., 2012; CHEN; et al., 2008; DHIR et al., 2008; TIECHER et al., 2016).

Em adição, houve aumento no conteúdo de MDA (Figura 5 c), sugerindo que o excesso de Zn causou desorganização dos cloroplastos e, portanto, alteração da fotossíntese (Figura 3 a). A redução da concentração de pigmentos fotossintéticos, pelo excesso de Zn, pode afetar o transporte de elétrons na fase fotoquímica causando redução na eficiência fotossintética (CAMBROLLÉ et al., 2012; CHEN; et al., 2008; DHIR et al., 2008; TIECHER et al., 2016).

Para controlar o nível de ERO e proteger as células do dano oxidativo, as plantas possuem enzimas antioxidantes envolvidas no processo de detoxificação por metais pesados como a SOD e a POD (GRATÃO et al., 2005). As ERO, incluindo H₂O₂ e os radicais HO[•] e O₂⁻ são formadas naturalmente dentro das células, principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias (FERREIRA et al., 2015). Assim, a absorção excessiva de Zn nas plantas pode causar estresse oxidativo devido a um desequilíbrio entre respostas antioxidantes e aumento da produção de ERO (GIROTTO et al., 2013). Tal fato indica que altas concentrações de metais pesados, como Zn, potencializam danos ao estresse oxidativo, resultando em menores taxas fotossintéticas e redução total da biomassa da planta.

Das três espécies estudadas, observou-se que a *A. affinis* foi aquela que apresentou maior concentração de H_2O_2 . No entanto, observou-se também que o aumento das doses de Zn não ocasionou aumento na concentração de H_2O_2 . O grau de peroxidação lipídica das membranas é estimado pelos altos níveis de TBARS. Na presença altas concentrações de Zn, *P. notatum* apresentou aumento na peroxidação lipídica, evidenciando que o sistema antioxidante não foi eficiente para controlar a peroxidação das membranas (Figura 6 c). Por outro lado, em *A. affinis* o aumento das doses de Zn não ocasionou aumento da peroxidação lipídica. Portanto, a ação do sistema antioxidante foi efetiva para manter a produção das ERO. No entanto, a manutenção da homeostase tem um custo para a planta quando está estressada. Esse custo pode ser verificado na redução da produção de massa seca de *P. plicatulum* e *P. notatum* (Figura 2 a, b, c).

A SOD age na dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e sua atividade geralmente é aumentada sob condições de altas concentrações de Zn (ZHANG et al., 2017), como o que ocorreu nesse estudo com as espécies *P. notatum* (120 e 180 mg Zn kg^{-1}) e *P. plicatulum* (120 mg Zn kg^{-1}) (Figura 4 d). O H_2O_2 é a ERO menos danosa para a célula, entretanto, na presença de um metal de transição como o Zn pode formar $OH\bullet$ que é altamente reativo, 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). Em *A. affinis* só houve redução na atividade da SOD na maior dose de Zn utilizada. Desse modo, foi a espécie que demonstrou ter o melhor sistema de defesa, visto que, houve incremento de MSPA e MSR na presença de 120 e 180 mg Zn kg^{-1} .

Neste estudo, o aumento da atividade de POD em *P. notatum* a partir da concentração de 60 mg Zn kg^{-1} , sugere a ativação de uma resposta enzimática para prevenir o dano oxidativo causado pela toxicidade de Zn. No entanto, a diminuição na atividade da POD em *A. affinis* indica que nem todas as enzimas antioxidantes podem proteger suficientemente as plantas, o que aumenta a ERO nos tecidos e aumenta o dano oxidativo (TIECHER et al., 2017).

No presente estudo, a concentração de nutrientes nas diferentes partes das gramíneas nativas foi influenciada pelo aumento crescente das doses de Zn (Tabela 2). Em geral, as concentrações de macro e micronutrientes foram distintamente afetadas pelo incremento de Zn no solo. Apesar de vários estudos relatando o efeito antagônico entre o P e o Zn (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), as concentrações de P encontradas nos tecidos destas gramíneas, em geral, não diminuíram com o aumento das concentrações de Zn no solo. A precipitação do P em função do excesso de Zn, na forma de fosfato de zinco (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1984) pode explicar a diminuição da concentração de P em *A. affinis*. Além disso, a maior

concentração de Mn na parte aérea encontrado nas espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* pode estar relacionado aos parâmetros morfológicos de raízes destas espécies, podendo ocorrer grande liberação de ácidos orgânicos e solubilizando compostos insolúveis de Mn.

4.5 CONCLUSÃO

Axonopus affinis é a espécie mais tolerante ao excesso de Zn, apresentando um sistema antioxidante enzimático eficiente em minimizar o estresse oxidativo provocado pelo excesso de Zn e uma maior taxa de assimilação líquida de CO₂ quando comparada às demais.

REFERÊNCIAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review **Plant Biotechnology**, v.55, p.373-399, 2004.
- ARDUINI, I.; GODBOLD, D. L.; ONNIS, A. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pineaster* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.92, n.4, p.675-680, 1994.
- BOSE, J. et al. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 85, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1, p.248-254, 1976.
- CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v.120, n.3, p.171-178, 2015.
- CAMBROLLÉ, J. et al. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, v.86, n.9, p.867-874, 2012.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Mechanism of phosphorus-induced zinc deficiency in cotton. III. Changes in physiological availability of zinc in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 70, n. 1, p. 13-20, 1987
- COUTO, R. R. et al. Accumulation of copper and zinc fractions in vineyard soil in the midwestern region of Santa Catarina, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v.73, n.10, p.6379-6386, 2015.
- CHANEY, R. L. **Plant uptake of inorganic waste constituents**. In: Parr JF, Marsh PB, Kla JM, eds. Land treatment of hazardous wastes. Park Ridge, NJ, USA: Noyes Data Corporation, p.50-76, 1993.
- CHEN, L. S. et al. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. **Annals of Botany**, v.96, n.1, p.35-41, 2005.
- CHEN, W. et al. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, v.132, n.1, p.89-101, 2008.
- CHERIF, J. et al. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Environmental Sciences**, v,23, n.5, p.837-844, 2011.
- CHOUDHARY, M. et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.204–209, 2007.

DE CONTI, L. **Plantas de cobertura do solo e videiras: Toxidez, fitorremediação e mecanismos de tolerância ao excesso de cobre.** Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em ciência do solo, RS. p.170, 2018.

DHIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, n.1, p.61-70, 2008.

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, n.2, p.109-119, 1993.

FAGERIA, N. K. Dry matter yield and nutrient uptake by lowland rice at different growth stages. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.6, p.947-958, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, P. A. A. et al. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Applied Soil Ecology**, v.91, n.2, p.37-47, 2015.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants, **Plant Physiology**, v.59, n.2, 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, n.12, 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, n.1, p.145-155, 2013.

GODBOLD, D.L.; HORST, W.K.; COLLINS, J.C.; THURMAN, D.A.; MARSCHNER, H. Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. **J. Plant Physiol.** v. 116, p. 59-69, 1984.

GRATÃO P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.

HEWITT, E. J. **Essential and functional methods in plants.** In: ROBB, D. A.; PIERPOINT, W. S. ed. Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants. Academic Press, New York, p.313-315, 1983.

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

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

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, n.5, p.979-986, 2010.

JIANG, X.; WANG, C. Zinc distribution and zinc-binding forms in *Phragmites australis* under zinc pollution. **Journal of Plant Physiology**, v.165, n.7, p.697-704, 2008.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. CRC Press, Boca Raton-London - New York, 2001.

KAYA, C.; HIGGS, D.; BURTON, A. Plant growth, phosphorus nutrition and acid phosphatase enzyme activity in three tomato cultivars grown hydroponically at different zinc concentrations. **Journal of Plant Nutrition**, v.23, n.5, p.569-579, 2000.

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

LAMBERS H, MARTINOIA E, RENTON M. Plant adaptations to severely phosphorus-impooverished soils. **Curr Opin Plant Biol**. v. 25p.23-31, 2015.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n.1, p.350-382, 1987.

MACKIE, K. A.; MÜLLER, T.; KANDELER, E. Remediation of copper in vineyards - A mini review. **Environmental Pollution**, v.167, n.3, p.16-26, 2012.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2ed. Academic Press, London, 1995.

MATEOS-NARANJO, E. et al. Salinity alleviates zinc toxicity in the saltmarsh zinc accumulator *Juncus acutus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 478-485, 15 nov. 2018.

MELLO, L. M. R. **Viticultura Brasileira: Panorama 2011**. Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf>>. Acessado em: 22 de agosto de 2017.

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

PETROVIC, J.; NIKOLIC, G.; MARKOVIC, D. *In vitro* complexes of copper and zinc with chlorophyll. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.71, n.4, p.501-512, 2006.

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: JACQUES, V. D. P. P. S. C. M. Z. M. DE S. C. A. V. Á. (Ed.). **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. 1. ed. Brasília: p. 208-215, 2009.

RAU, H. K. et al. Design, synthesis and properties of synthetic chlorophyll proteins. **European Journal of Biochemistry**, v.268, n.11, p.3284-3295, 2001.

RAMPIM, L.; LANA, M. C. Mecanismo de tolerância interna das plantas ao alumínio. **Colloquium Agrariae**, v.9, n.2, p.72-89, 2013.

RIZWAN, M. et al. A critical review on the effects of zinc at toxic levels of cadmium in plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6279–6289, 11 mar. 2019.

ROMEO, S. et al. High Zn concentration does not impair biomass, cutting radial growth, and photosynthetic activity traits in *Populus alba* L. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, n. 5, p. 1394–1402, 2017.

ROMEU-MORENO, A.; MAS, A. Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.7, p.2519-2522, 1999.

SANTOS, H. P.; CHAVARRIA, G. **Cultivo de videira em ambiente protegido**. In: CHAVARRIA, G.; SANTOS, H. P. Ed. Fruticultura em ambiente protegido. Brasília: Embrapa, 278p, 2012.

SAGARDOY, R. et al. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v.11, n.3, 339-350, 2009.

SOIL SURVEY STAFF. Soil taxonomy. **A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys**. 2nd ed. Washington, DC: US Government Printing Office, 2006.

STEFANELLO, L. O. et al. Nitrogen supply method affects growth, yield and must composition of young grape vines (*Vitis vinifera* L. cv *Alicante Bouschet*) in southern Brazil. **Scientia Horticulturae**, v.261, n.5, p.1089-10, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 858p, 2017.

TAKEUCHI, Y.; AMAO, Y. Light-harvesting properties of zinc complex of chlorophyll-a from spirulina in surfactant micellar media. **BioMetals**, v.18, n.1, p.15-21, 2005.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. C. **Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)**. Ithaca, Microcomputer Power, 500p, 2002.

TIECHER, T. L. et al. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v.262, n.2, p.52-61, 2016.

TIECHER, T. L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v.222, n.1, p.203-212, 2017.

TONIETTO, J. Evaluación climática global de las zonas vitícolas. **Revista Enología**, v.4, n.2, p.24-35, 2007.

WANG, C. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v.75, n.11, p.1468-1476, 2009.

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, n.4, p.731-734, 2008.

ZHANG, K. et al. Physiological properties and chlorophyll biosynthesis in a Pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) yellow leaf mutant, pylm. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 1, 2017.

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

5 DISCUSSÃO GERAL

A utilização de fungicidas que possuem o Zn na sua composição para o controle de doenças fúngicas em vinhedos como alternativa aos fungicidas cúpricos, ocasiona aumento nos teores deste metal pesado no solo. O acúmulo do Zn pode desencadear uma série de respostas nas plantas de cobertura de solo que se desenvolvem nas entrelinhas dos vinhedos.

Desta forma, torna-se extremamente importante conhecer os efeitos de elevadas concentrações de Zn no solo e como isso influenciará as plantas cultivadas em solos de vinhedos contaminados, em especial, as plantas de cobertura que são utilizadas nas entrelinhas dos vinhedos.

No primeiro estudo a presença de Zn foi considerada prejudicial apenas para a espécie *A. lateralis*. Enquanto as outras espécies apresentaram tolerância ao excesso de Zn. As concentrações de Zn não afetaram a produção de massa seca, fotossíntese e nem comprometeram o sistema antioxidante das plantas. As espécies estudadas foram tolerantes ao incremento das concentrações de Zn na solução nutritiva, sendo capazes de acumular altas concentrações de Zn na parte aérea e raízes. As concentrações de macro e micronutrientes nos tecidos de parte aérea e raízes das espécies variaram em relação ao incremento de Zn. Os resultados encontrados indicam que, apesar de algumas concentrações de nutrientes terem diminuído com a aplicação de crescentes doses de Zn, isso não foi suficiente para afetar o metabolismo das espécies estudadas.

No segundo estudo, as espécies *A. affinis*, *P. notatum* e *P. plicatulum* cultivadas em doses crescentes de Zn no solo apresentaram diferentes respostas fisiológicas, sendo que, *A. affinis* mostrou-se mais tolerante ao excesso de Zn enquanto *P. notatum* e *P. plicatulum* são sensíveis. Para essas duas gramíneas o excesso de Zn contribuiu negativamente para as trocas gasosas. Por outro lado, *A. affinis* foi a espécie que obteve maior taxa de assimilação líquida de CO₂ quando submetida a maior dose de Zn. Sendo que o sistema antioxidante enzimático da *A. affinis* foi efetivo para minimizar o estresse oxidativo induzido pelo excesso de Zn.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O incremento das concentrações de Zn nos sistemas de cultivo estudados promoveu aumento crescente na concentração de Zn nos tecidos das gramíneas, sendo que a *A. lateralis* se mostrou mais sensível que as demais e *A. Affinis* mais tolerante. A tolerância às elevadas concentrações Zn das espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa pode ter ocorrido, devido à retenção deste metal nas suas raízes diminuindo a translocação para a parte aérea, onde os efeitos tóxicos poderiam ser mais severos.

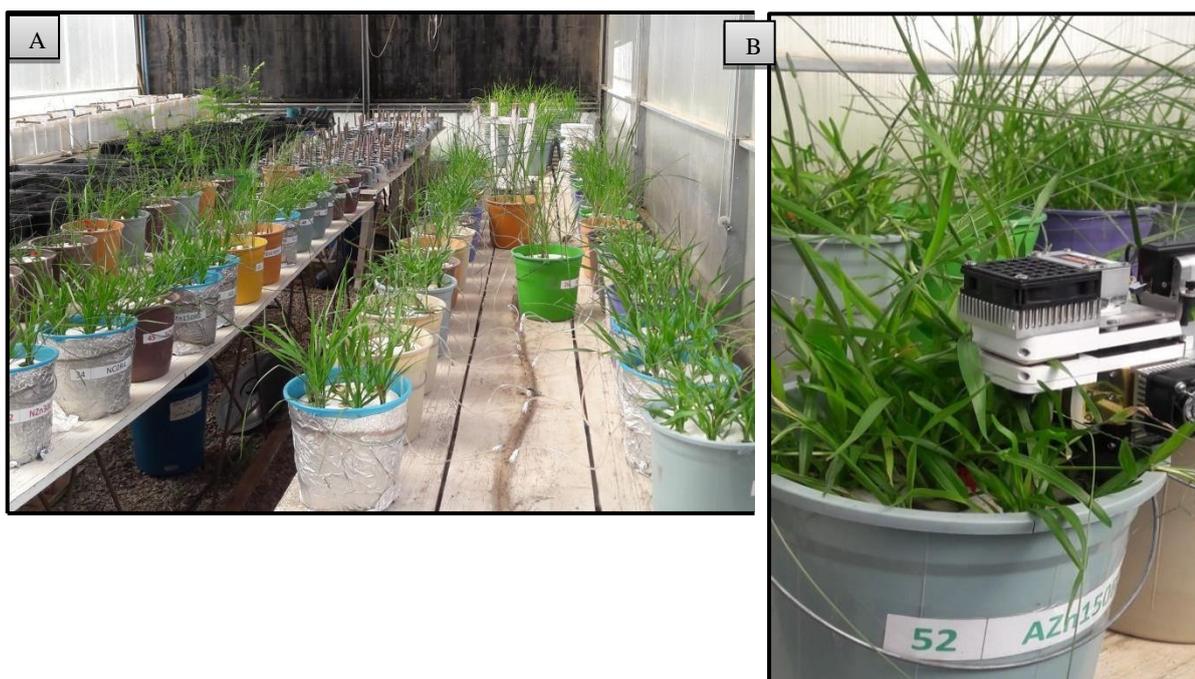
7 APÊNDICES

Apêndice A - Perfis das espécies nativas do bioma Pampa transplantados em bandejas plásticas contendo areia como substrato e cultivadas em casa de vegetação para posterior uso nos experimentos em solução nutritiva e em solo.



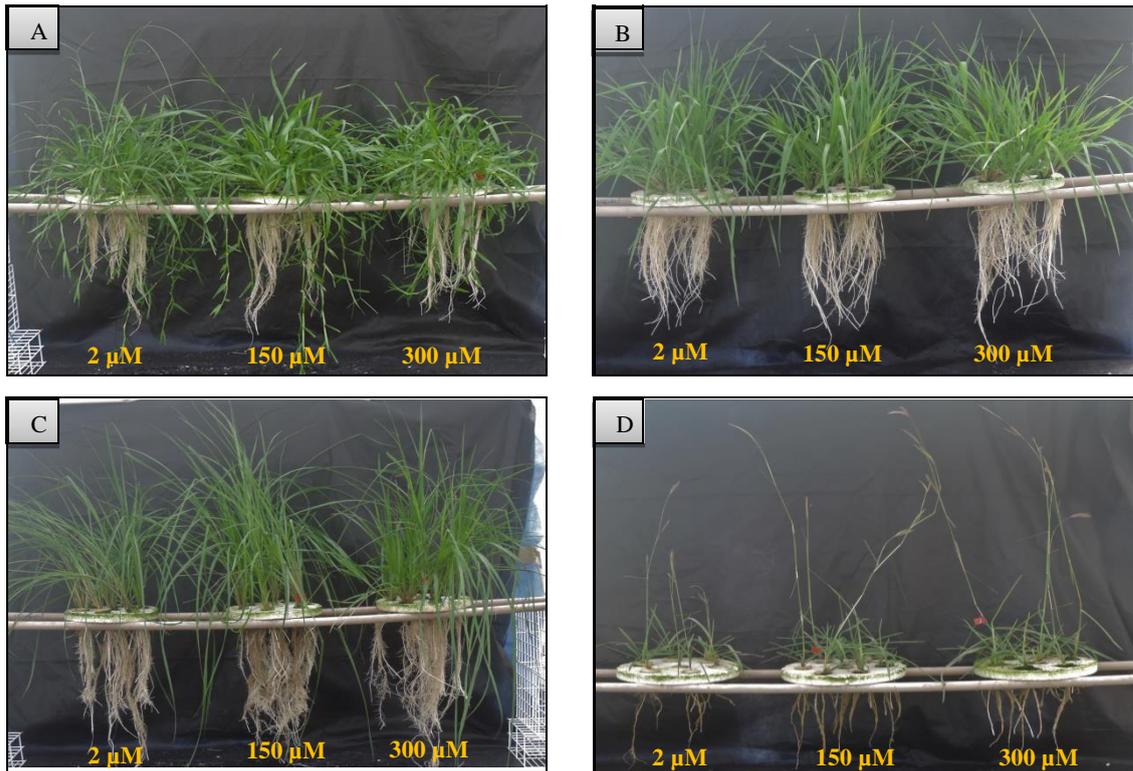
Fonte: Milanesi, G. D. (2018).

Apêndice B - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa no cultivo em solução nutritiva expostas a concentrações crescentes de Zn. Sistema Hidropônico (A), Avaliação de trocas gasosas (B).



Fonte: Milanesi, G. D. (2018).

Apêndice C - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa: *Axonopus affinis* (A), *Paspalum notatum* (B), *Paspalum plicatulum* (C) e *Andropogon lateralis* (D) aos 40 dias de cultivo em solução nutritiva expostas à concentrações crescentes de Zn. Concentração de 2 μM (esquerda), 150 μM (centro), e 300 μM (direita).



Fonte: Milanesi, G. D. (2019).

Apêndice D - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa: *Axonopus affinis* (A), *Paspalum notatum* (B), *Paspalum plicatulum* (C) e *Andropogon lateralis* (D) aos 40 dias de cultivo em solução nutritiva expostas à concentrações crescentes de Zn. Concentração de 2 μ M (esquerda), 150 μ M (centro), e 300 μ M (direita).



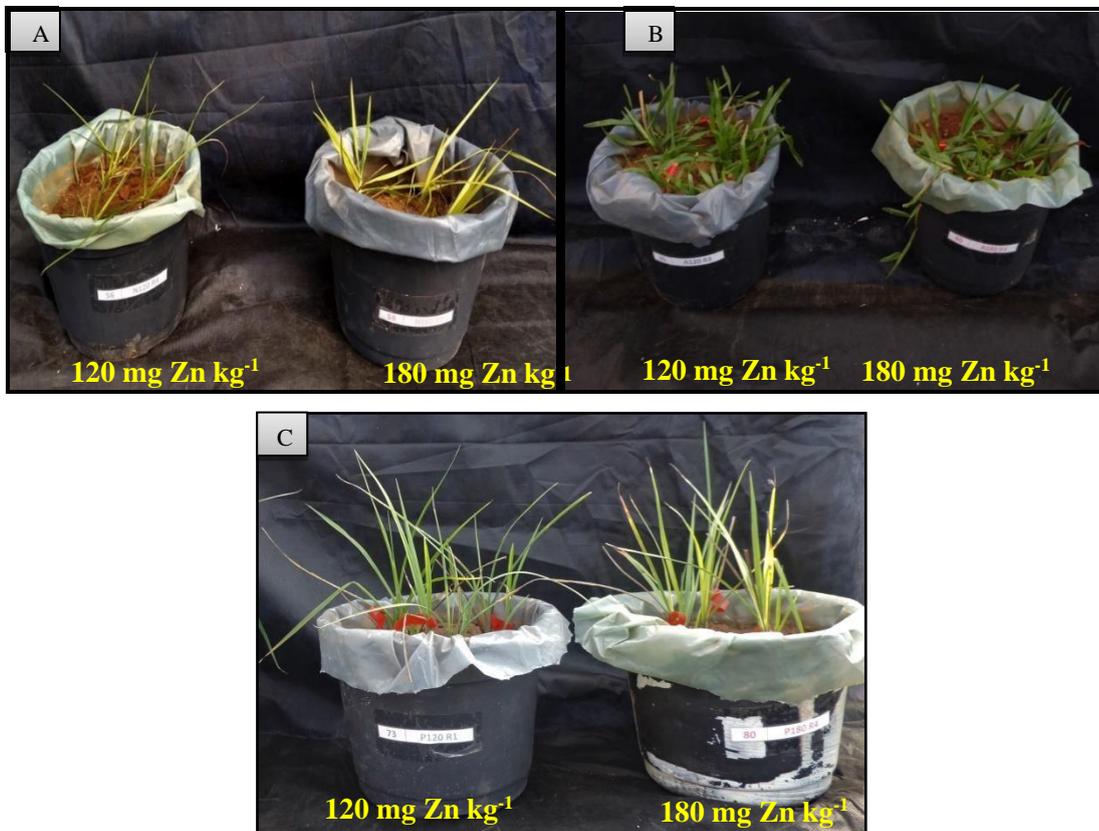
Fonte: Milanesi, G. D. (2019)

Apêndice E - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa no cultivo em solo expostas à concentrações crescentes de Zn. Sistema de cultivo em solo (A), Avaliação de trocas gasosas (B).



Fonte: Milanesi, G. D. (2019)

Apêndice F - Espécies de gramíneas nativas do bioma Pampa: *Axonopus affinis* (A), e *Paspalum notatum* (B) e *Paspalum plicatulum* (C) aos 90 dias de cultivo em solo expostas as maiores concentrações de Zn deste estudo (120 e 180 mg Zn kg⁻¹).



Fonte: Milanesi, G. D. (2019)