

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

***RHIZOPHAGUS CLARUS* E FÓSFORO EM
CROTALARIA JUNCEA EM SOLO COM ALTOS
TEORES DE COBRE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Glaucia Regina Zaferi Moser

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

***RHIZOPHAGUS CLARUS* E FÓSFORO EM *CROTALARIA*
JUNCEA EM SOLO COM ALTOS TEORES DE COBRE**

Glaucia Regina Zaferi Moser

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Dinâmica de nutrientes e de elementos tóxicos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência do solo.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Ceretta

Coorientador: Dr. Paulo Ademar Avelar Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Zaferi Moser, Glaucia Regina
Rhizophagus clarus e fósforo em Crotalaria juncea em
solo com altos teores de cobre / Glaucia Regina Zaferi
Moser.-2013.
58 p. ; 30cm

Orientador: Carlos Alberto Ceretta
Coorientador: Paulo Ademar Avelar Ferreira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2013

1. Fitoremediação 2. Fungos micorrizicos arbusculares
3. Cobre 4. Fósforo 5. Fungicidas Cúpricos I. Ceretta,
Carlos Alberto II. Avelar Ferreira, Paulo Ademar III.
Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Glaucia Regina Zaferi Moser. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: glau.agro@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**RHIZOPHAGUS CLARUS E FÓSFORO EM CROTALARIA
JUNCEA EM SOLO COM ALTOS TEORES DE COBRE**

elaborada por
Glauca Regina Zaferi Moser

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA:


Carlos Alberto Ceretta, Dr.
(Presidente/Orientador)


Zaida Ines Antonioli, Dra.(UFSM)


Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Dr.(UFSC)

Santa Maria, 22 de Julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Luiz Calos e Iracema**, por acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos.

Ao **Rodrigo**, meu namorado e melhor amigo, que esteve sempre ao meu lado dando todo seu amor, carinho, apoio e compreensão.

As minhas **Irmãs Queridas**, a **Lucia** e ao **Jorge**.

A **minha Nona** querida (*in memoriam*), por tudo que representa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas oportunidades, pela saúde, e por me cercar de pessoas maravilhosas que sempre ajudaram a vencer os desafios que pareciam intransponíveis.

A **Iracema** minha mãe, o maior exemplo de simplicidade, força, perseverança e amor incondicional.

A **Luiz Carlos**, meu pai, meu exemplo de amor, simplicidade, humildade e respeito para com o próximo.

Ao **Rodrigo**, pelo amor, amizade, companheirismo, força, alegria e apoio nos últimos anos.

A **Rafaela, Roberta, Carla e Édina**, minhas irmãs, pela amizade, carinho e compreensão.

Ao **Felipe**, meu sobrinho lindo, por me fazer lembrar o gosto de ser criança e me fazer mais feliz.

Ao **Jorge** e a **Lucia** por todo o carinho, apoio, aprendizado de simplicidade e amor.

Ao Professor **Carlos Alberto Ceretta**, pela orientação, amizade e conselhos que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao **Paulo**, por ser uma daquelas pessoas especiais que Deus coloca em nosso caminho. Obrigada pela coorientação, ajuda e amizade.

A **Marlise**, muito mais que uma colega, uma amiga e companheira de todas as horas e análises, até de madrugada quando necessário.

A **Hilda**, por toda a ajuda e bom humor contagiante durante os trabalhos na casa de vegetação.

Aos amigos e colegas do grupo de trabalho **Nathalia Haydee Riveros Ciancio, Tadeu Ticher, Lessandro De Conti, Cledimar Rogério Lorenzi, Alcione Miotto, Eduardo Giroto, Gustavo Trentin, Carina Marchezan, Adriana Cancian, Renan Vidal, Lincon Stefanello Silva e Denis Schapanski**, pela convivência, auxílio na execução das atividades laboratoriais, boas conversas e amizade.

Aos Professores **Gustavo Brunetto, Rodrigo Jaques e Zaida Ines Antonioli** pela amizade, pelas sugestões, pelos conselhos, por disponibilizarem material e laboratórios, enfim, pela colaboração fundamental na realização deste trabalho.

Aos demais Professores do Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo por todos os ensinamentos compartilhados, convivência e amizade.

Ao Professor **Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares**, pelos ensinamentos, recepção na UFSC e colaboração fundamental para desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas **Tales Ticher, Janete Denardi Munareto e Rogério Piccin** pelo auxílio na execução de análises.

Aos amigos e colegas da Pós Graduação pela amizade e estudos em grupo

Ao **Finamor** sempre bem humorado e disposto a ajudar quando solicitado.

Ao **Héverton**, secretário do curso de Pós-graduação, pela dedicação e pela competência no seu trabalho.

A **Universidade Federal de Santa Maria** pelo auxílio estudantil (Casa do estudante, RU), pela oportunidade da graduação e mestrado. Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**, pela oportunidade de realização do curso de mestrado. A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os **familiares e amigos** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O conhecimento não muda o mundo.
O conhecimento muda as pessoas e as pessoas mudam o mundo.

(Autor desconhecido).

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

RHIZOPHAGUS CLARUS E FÓSFORO EM CROTALARIA JUNCEA EM SOLO COM ALTOS TEORES DE COBRE

AUTOR: GLAUCIA REGINA ZAFERI MOSER
ORIENTADOR: PROF. Dr. CARLOS ALBERTO CERETTA
COORIENTADOR: Dr. PAULO ADEMAR AVELAR FERREIRA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de Julho de 2013.

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) podem aumentar a tolerância das plantas a metais pesados, bem com sua capacidade de melhorar a aquisição de fósforo (P). O estudo objetivou avaliar como a inoculação com FMA e a aplicação de P podem remediar os efeitos de altos teores de Cu no solo sobre *Crotalaria juncea*. Foram avaliados os efeitos de FMA e P sobre o crescimento de plantas, a atividade enzimática de fosfatase ácida (APases) na planta e no solo, bem como a presença de glomalina. O experimento foi montado em casa de vegetação em esquema fatorial 3 x 2 (teor natural de P, 40 e 100 mg kg⁻¹ de P, com e sem inoculação de *Rhizophagus clarus* com três repetições em um solo com altos teores de Cu (60 mg kg⁻¹). Além destes tratamentos de P e FMA em solo com altos teores de Cu foram avaliados dois tratamentos adicionais em solo com teores naturais de Cu (0.55 mg kg⁻¹) contendo 40 mg kg⁻¹ P, com e sem inoculação de FMA. Os resultados demonstram que a combinação entre fósforo e o FMA (*Rhizophagus clarus*) pode ser uma estratégia interessante para a redução da fitotoxidez de Cu em *Crotalaria juncea*, pois proporcionaram incrementos na produção de matéria seca das plantas e uma diminuição na atividade das enzimas APases ácida no solo e nas plantas. Além disso, foi demonstrado que o aumento nos teores de glomalina produzida pelos FMA pode diminuir a disponibilidade do Cu para as plantas com consequente efeito fitoprotetor.

Palavras-chave: Fitorremediação. Cobre. Glomalina e fosfatase ácida.

ABSTRACT

Master's Dissertation in Soil Science
Postgraduate Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria

RHIZOPHAGUS CLARUS AND PHOSPHORUS IN CROTALARIA JUNCEA IN SOIL WITH HIGH LEVELS OF COPPER

AUTHOR: GLAUCIA REGINA ZAFERI MOSER

SUPERVISOR: Dr. CARLOS ALBRETO CERETTA

Date and Location of Defense: Santa Maria, July 22th, 2013

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) can increase the tolerance of plants to heavy metals, as well as their ability to enhance the acquisition of phosphorus (P). The aim of this study was to evaluate how the inoculation with AMF and P application can remedy the effects of high levels of copper (Cu) in the soil on *Crotalaria juncea*. The effects of AMF and P on the growth of plants, the enzymatic activity of acid phosphatase (APases) in plant and soil as well as the presence of glomalina. The experiment was conducted in a greenhouse in a 3 x 2 factorial arrangement (natural content of P, 40 and 100 mg kg⁻¹ of P, with and without inoculation *Rhizophagus clarus*) with three replications in a soil with high levels of Cu (60 mg kg⁻¹). Besides the treatments of P and AMF in soil with high levels of Cu, were evaluated two additional treatments in soil with natural levels of Cu (0.55 mg kg⁻¹) containing 40 mg kg⁻¹ of P, with and without AMF inoculation. The results showed that the combination of P and AMF (*Rhizophagus clarus*) may be an interesting strategy for the reduction of Cu phytotoxicity in *Crotalaria juncea*, as provided increments in dry matter production of plants and a decrease in the activity of acidic enzyme APases in soil and plants. Furthermore, it was showed that Glomalin produced by AMF can decrease Cu availability to the plants with phytoprotector consequent effect.

Keywords: Phytoremediation. Copper. Glomlin. Acid phosphatase activity.

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2 OBJETIVOS.....	18
3 HIPÓTESES.....	19
4 RHIZOPHAGUS CLARUS E FÓSFORO EM CROTALARIA JUNCEA: CRESCIMENTO, TEORES DE GLOMALINA E ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE	20
4.1 ABSTRACT	20
4.2 INTRODUÇÃO	20
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.3.1 Delineamento experimental e análise da solução do solo.....	22
4.3.2 Material biológico	23
4.3.3 Dados experimentais e análises químicas	24
4.3.4 Análise estatística	25
4.4.1 Solução do solo.....	26
4.4.2 Aplicação de P e inoculação de FMA no crescimento da C. juncea em solo com altos teores de Cu	26
4.5 DISCUSSÃO	28
4.6 REFERÊNCIAS	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
ANEXOS	41
APÊNDICES	47

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Metais pesados como o Cobre são essenciais para um bom crescimento e desenvolvimento das plantas, pois são componentes de muitas enzimas, proteínas e catalisam o fluxo de elétrons e as reações de oxidação-redução nas células vegetais, desempenhando papel importante na fotossíntese, respiração, além de atuarem na redução e fixação de nitrogênio que ocorre no interior dos nódulos nas raízes de leguminosas. Porém, as quantidades de Cu requeridas são muito baixas, por este motivo este elemento é considerado um micronutriente. Quando se encontra em altas concentrações na solução do solo, o Cu pode proporcionar algum tipo de estresse às plantas, tornando-se um elemento tóxico ao seu desenvolvimento. Os sintomas de toxidez do Cu podem variar entre as espécies vegetais. Contudo, geralmente se observa alterações drásticas nos tecidos vegetais, em nível bioquímico e fisiológico, os quais podem resultar em perdas consideráveis para o potencial produtivo das plantas. O excesso de cobre reduz o crescimento das raízes, induz à deficiência de Fe na parte aérea, diminuição da biomassa e clorose internerval. Este elemento amplamente distribuído nos solos e rochas onde ocorre naturalmente em baixas concentrações. No entanto a ação antrópica pode alterar os teores naturais elevando suas concentrações e disponibilidade que podem favorecer a contaminação e conseqüentemente, acarretar problemas aos ecossistemas.

A região da Campanha Gaúcha destaca-se como uma importante produtora de uvas viníferas do estado do Rio Grande do Sul-Brasil. Esta região oferece condições edafoclimáticas propícias para o cultivo da videira e, por isso, nos últimos anos tem recebido investimentos para aumentar a área plantada e atualmente ultrapassa os 2.000 ha de área cultivada (PROTAS & CAMARGO, 2011). Desde a década de 70, quando instalaram-se os primeiros vinhedos, ocorreu uma utilização intensiva da calda bordalesa ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$), para o controle e prevenção de doenças fúngicas foliares ocasionadas pela umidade e clima característico desta região considerado úmido, quando comparado a regiões produtoras tradicionais da Europa Argentina e Chile. As aplicações repetidas deste fungicidas à base de Cu, causaram o acúmulo deste elemento nas camadas superficiais de solos (MIOTTO, 2012). Contudo, o teor de Cu em solos de vinhedos pode ser bastante variável em

função da frequência de aplicação de fungicidas cúpricos e das características físico-químicas dos solos (CASALI et al., 2008; NOGUEIROL et al., 2010). A biodisponibilidade de Cu nos solos da Campanha Gaúcha é elevada, pois são verificados baixos valores de pH do solo, baixa CTC, textura arenosa e baixos teores de óxidos e de matéria orgânica (GIROTTI, 2010).

A presença de altos teores do Cu na camada superficial reduz o desenvolvimento de plantas herbáceas espontâneas ou introduzidas que normalmente são cultivadas nas entre linhas dos vinhedos (PANOU-FILOTHEOU et al., 2001). Na ausência dessa cobertura vegetal nas entrelinhas dos vinhedos o transporte de partículas via escoamento superficial é potencializado e a transferência do Cu para as águas superficiais pode ocorrer, assim como sua percolação no perfil do solo (KARATHANASIS, 1999), uma vez que na ausência de raízes não há possibilidade de absorção e ciclagem do cobre no sistema solo-planta.

Uma estratégia para reabilitar estas áreas contaminadas com Cu é a introdução de plantas de cobertura tolerantes, visando o aporte de matéria orgânica neste solo. A crotalária (*Crotalaria juncea*) vem sendo utilizada como cobertura vegetal bem adaptada às áreas tropicais e subtropicais e tem se destacado devido à tolerância à seca e adaptação às condições edafoclimáticas dessas regiões. Inicialmente era considerada uma planta daninha, mas atualmente ela tem importância econômica tanto pelo seu uso no controle de nematoides, quanto pela produção de forragem, produção de fibras, adubação verde, e controle da erosão do solo. A *Crotalaria juncea* é muito eficiente como produtora de massa vegetal e como fixadora de nitrogênio, além de possuir um sistema radicular muito bem desenvolvido. A produção de biomassa de plantas forrageiras pode ser favorecida pelo o estabelecimento de simbioses radiculares como as bactérias fixadoras de nitrogênio e as micorrizas. Especificamente, a *C. juncea* apresenta estes dois tipos de simbioses, mas é necessário mais estudos quanto ao papel destas na proteção das plantas ao excesso de metais pesados, como o Cu, e seu consequente efeito na produção de biomassa.

Microrganismos do solo em simbiose com as plantas podem desempenhar importante papel na proteção destas ao excesso de metais pesados. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) têm papel amplamente reconhecido no estabelecimento de espécies vegetais em áreas degradadas pela ação antrópica, inclusive naquelas contaminadas por metais pesados, auxiliando na nutrição e no

aumento da tolerância das plantas a essas condições adversas (Soares et al., 2006). Os FMAs podem melhorar o equilíbrio da nutrição mineral, especialmente para nutrientes essenciais. Quando estes estão em falta a sua absorção pode ser estimulada, e quando estão presentes em excesso, a sua absorção pode ser inibida. Deste modo pode ocorrer um efeito de diluição de metais pesados na parte aérea em decorrência do maior crescimento da planta. Além disso, mecanismos envolvidos na menor absorção de metais tóxicos podem incluir a precipitação ou quelação dos elementos na rizosfera, elevação do pH na micorrizosfera afetando a mobilidade e biodisponibilidade destes metais (CHRISTIE et al., 2004), aprisionamento de grandes quantidades de metais nas estruturas fúngicas como micélio e hifas (Cabral et al., 2008), com conseqüente redução na translocação para a parte aérea.

Trabalhos recentes indicam ainda que a produção de glicoproteínas insolúveis denominadas “glomalinas” que são sintetizadas em grande quantidade pelas hifas de FMAs, além de exercer um importante papel na agregação do solo e ser um importante contribuinte para o carbono orgânico do solo, vem sendo associada á estabilização de metais contaminantes do solo tais como Cu, Cd, Pb (González-Chávez et al., 2002). A estrutura da glomalina ainda não foi completamente definida, mas esta molécula parece ser um complexo de estruturas monoméricas repetidas, reunidas por interações hidrofóbicas, que contém ferro fortemente aderido. Evidências preliminares sugerem que cátions são aderidos a glomalina em quantidades que variam de acordo para diferentes solos (WRIGHT e UPADHYAYA, 1998). Estudos mostraram que a glomalina extraída de dois solos contaminados continha 1,6 e 4,3 mg de Cu g⁻¹ de glomalina confirmando que esta glicoproteína sequestra Cu por reações reversíveis e, possivelmente, por complexação forte (GONZALES-CHAVES et al., 2004). Esta capacidade de FMA para seqüestrar e acumular metais pesados em uma forma não tóxica pode ajudar a aumentar a adaptação das plantas e a qualidade do solo em áreas poluídas.

Dentre os vários mecanismos de proteção, ainda é possível que as micorrizas possam contribuir para reduzir a fitotoxidez dos metais em decorrência da melhor nutrição do aumento da aquisição de P pela planta hospedeira (CHRISTIE et al., 2004). Alguns estudos indicam que o suprimento adequado de P possibilita também o aumento da retenção de metais pesados nas raízes das plantas, restringindo, assim, o transporte desses elementos para a parte aérea (SOARES et al., 2006). Isto acontece devido ao metal formar complexos com o P e ficar retido nas raízes

(VAN STEVENINCK et al., 1994). Trabalhos nesta área demonstraram que mesmo em concentrações tóxicas de Zn, a adição de altas doses de P possibilitou maior produção de matéria seca das plantas em comparação àquelas com baixo fornecimento de P. O aumento de P ainda retardou o aparecimento de sintomas de toxidez de Zn e elevou a dose crítica de toxidez, indicando que o aumento no fornecimento de P à solução teve efeito amenizante da fitotoxidez de Zn (SOARES et al., 2006).

Além dos FMA, o aumento do teor de P no solo, derivado de adubações ao longo dos ciclos das videiras, pode reduzir a disponibilidade de Cu na solução através da adsorção do fosfato por colóides do solo adicionando carga negativa à superfície das partículas absorventes, e assim, tende a aumentar a sua afinidade por cátions como o Cu, potencializando a formação de complexos ternários do tipo óxido-fosfato-metal (BARROW, 1999; PÉREZ-NOVO et al., 2009). Ainda é possível que o Cu possa se ligar ao fosfato na solução formando complexos insolúveis, (AYATI & MADSEN, 2001; CAO et al., 2003), o que diminui a disponibilidade do Cu na solução e, por consequência, a sua fitotoxicidade. Desta forma, solos com elevadas concentrações de Cu podem reduzir a presença do P na solução do solo, reduzindo assim a disponibilidade para as plantas. Com isso, as plantas podem desenvolver mecanismos fisiológicos para aumentar a aquisição deste nutriente. Dentre os mecanismos destaca-se a fosfatase ácida do solo que hidrolisa o éster-fosfato preso ao P-orgânico do solo, liberando o fosfato na solução do solo para absorção pelas raízes próximas ou pelos microrganismos (TRESSEDER & VITOUSEK, 2001; PANT & WARMAN, 2000), permitindo à planta explorar nutrientes orgânicos na solução do solo.

A atividade de fosfatase ácida pode fornecer uma parcela significativa de fósforo para as plantas (JONER et al., 2000). Estas enzimas extracelulares estão presentes em superfícies radiculares e são exudadas pelas raízes para a rizosfera. As hifas dos FMAs também produzem fosfatases extracelulares colaborando para a aquisição de P (JONER et al., 2000). Assim como as proteínas, a fosfatase tem relativamente altas concentrações de N, e pode representar um investimento significativo de nitrogênio. A atividade extracelular de fosfatase aumenta substancialmente com adubação nitrogenada (PANT & WARMAN 2000). Deste modo, o aumento da disponibilidade de nitrogênio através da melhor nutrição obtida

como um efeito indireto pela associação micorrizica, pode elevar a atividade extracelular de fosfatase de plantas.

Nas folhas a fosfatase ácida está presente no apoplasto e em diferentes compartimentos celulares (YONEYAMA et al. 2007), sugerindo que esta enzima está envolvida em várias vias metabólicas, além de ser importante para a produção, transporte e reciclagem de Pi (GARCÍA et al., 2004). A presença de metais tais como o mercúrio e Zn pode afetar a atividade da fosfatase ácida, mas a deficiência de fósforo em plantas superiores (TABALDI et al. 2007), tem sido indicada como o principal fator para o aumento da atividade de fosfatase ácida. Entretanto, este aspecto tem sido pouco investigado em solos contendo excesso de metais em condições tropicais.

REFERÊNCIAS

AYATI, M., MADSEN, H. E. L.. Crystallization of some heavy metal phosphates alone and in the presence of calcium ion. **Journal of Crystal Growth**. v. 208, 579-591, 2001.

BARROW, N. J. The four laws of soil chemistry: the Leeper lecture 1998. **Australian Journal of Soil Research**. v. 37, 787-830, 1999.

CABRAL, L.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; PINTO, J. E. B. P. Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. **Química Nova**. v. 33, 25-29, 2010.

CAO, R. X.; MA, L. Q.; CHEN, M.; SINGH, S. P.; HARRIS, W. G.. Phosphate-induced metal immobilization in a contaminated site. **Environmental Pollution**. v. 122, p. 19-28, 2003.

CASALI, C. A.; MOTERLE, D. F.; RHEINHEIMER, D. S.; BRUNETTO, G.; MELLO, A. L. C.; KAMINSKI, J.; MELO, G. W. B.. Formas de cobre e dessorção em solos sob videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 32, 1479-1487, 2008.

CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B.. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**. v. 261, 209-217, 2004.

GARCIA, N. A. T.; OLIVEIRA, M.; IRIBARNE, C.; LLUCH, C.. Partial purification and characterization of a non-specific acid phosphatase in leaves and root nodules of *Phaseolus vulgaris*. - **Plant Physiol. Biochem.** v. 42, 585-591, 2004.

GIROTTI, E. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas cultivadas em solos com acúmulo de cobre e zinco**. 2010. 147f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; WRIGHT, S. F.; NICHOLS, K. A.. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution**. v. 130, 317-323, 2004.

GONZALEZ-CHAVEZ, C.; D'HAEN, J.; VANGRONSVELD, J.; DODD, J. C.. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**. v. 240, 287- 297, 2002.

JONER, E. J.; BRIONES, R.; LEYVAL, C.. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. **Plant and Soil**. v. 226, 227-234, 2000.

KARATHANASIS, A. D.. Subsurface migration of copper and zinc mediated by soil colloids. **Soil Science Society of America Journal**. v. 63, 830-838, 1999.

MIOTTO, A. **Cobre em solos arenosos sob vinhedos e Resposta bioquímica-fisiológica de Videiras em produção**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

NOGUEIROL, R. C.; ALLEONI, L. R. F.; NACHTIGALL, G. R.; MELO, G. W.. Sequential extraction and availability of copper in Cu fungicide-amended vineyard soils from Southern Brazil. **Journal of Hazardous Materials**. v. 181, 931-937, 2010.

PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S.. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Annals of Botany**. v. 88, 207-214, 2001.

PANT, H. K.; WARMAN, P. R.. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. **Biology and Fertility of Soils**. v. 30, 306–311, 2000.

PÉREZ-NOVO, C.; BERMÚDEZ-COUSO, A.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.. The effect of phosphate on the sorption of copper by acid soils. **Geoderma**. v. 150, 166–170, 2009.

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

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O.; CARVALHO, J. G.; GUILHERME, L. R. G.. Micorriza arbuscular e nutrição fosfatada sobre a toxicidade do zinco em trema [*Trema micrantha* (L.) Blum.]. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 30, 665–675, 2006.

TABALDI, L. A.; RUPPENTHAL, R.; CARGNELUTTI, D.; MORSCH, V. M.; PEREIRA, L. B.; SCHETINGER, M. R. C.. Effects of metal elements on acid phosphatase activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. **Environmental and Experimental Botany**. v. 59, 43-48, 2007.

TRESEDER, K. K.; VITOUSEK, P. M.. Effects of soil nutrient availability on investment in acquisition of n and p in hawaiian rain forests. **Ecological Society of America**. v. 82, 946-954, 2001.

VAN STEVENINCK, R. F. M., BABARE, A., FERNANDO, D. R., VAN STEVENINCK, M. E.. The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. **Plant and Soil**. v. 167, 157-164, 1994.

WRIGHT, S. F., UPADHYAYA, A.. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**. v. 198, 97-107, 1998.

YONEYAMA, T., TAIRA, M., SUZUKI, T., NAKAMURA, M., NIWA, K., WATANABE, T., OHYAMA, T.. Expression and characterization of a recombinant unique acid phosphatase from kidney bean hypocotyl exhibiting chloroperoxidase activity in the yeast *Pichia pastoris*. - **Prot. Expression Purification**. v. 53, 31-39, 2007.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação de fósforo e inoculação de *Rhizophagus clarus* sobre o crescimento da *Crotalária juncea*, em solo com altos teores de cobre.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade enzimática da fosfatase ácida no solo e na folha.
- b) Avaliar a presença de glomalina em solo com altos teores de cobre.
- c) Quantificar a colonização micorrízica e número de esporos em solo com altos teores de cobre.

3 HIPÓTESES

Os *Rhizophagus clarus* por atuarem como agentes de proteção e também por melhorarem a nutrição das plantas, podem desempenhar importante papel na tolerância da *Crotalaria juncea* ao Cu favorecendo o seu desenvolvimento;

O fósforo pode diminuir a disponibilidade e a transferência de Cu para a parte aérea amenizando a toxidez do Cu em *Crotalaria juncea*.

4 RHIZOPHAGUS CLARUS E FÓSFORO EM CROTALARIA JUNCEA: CRESCIMENTO, TEORES DE GLOMALINA E ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE¹

4.1 ABSTRACT

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can increase the plant tolerance to heavy metals and its capacity to acquire phosphorus (P). The objectives of this study were: (1) to evaluate the effect of P application and AMF inoculation in soils with high Cu content on the growth of sunn (*Crotalaria juncea*), the acid phosphatase enzyme activity in plants and soil and the presence of glomalin, (2) to identify if there is a synergistic interaction between AMF inoculation and P application on soil with high levels of Cu. The experiment was carried out in a greenhouse in a factorial 3 x 2 design (natural P content, addition of 40 and 100 mg kg⁻¹ P, with and without AMF) with three replicates in soil with high Cu content (60 mg kg⁻¹). In addition to the treatments with P and AMF in soil with high Cu content, two additional treatments were evaluated in soil with natural Cu content (0.55 mg kg⁻¹) containing 40 mg kg⁻¹ P, with and without AMF. The results showed that the combination of P and AMF (*Rhizophagus clarus*) could be an adequate strategy to reduce Cu phytotoxicity in *C. juncea*, since it resulted in an increase in plant dry mass production and a decrease in activity of APase enzymes in soil and plants. Additionally, it was demonstrated that the glomalin produced by the AMF might decrease the availability of Cu to the plants, with subsequent plant protective effects.

4.2 INTRODUÇÃO

As videiras no Sul do Brasil são cultivadas em regiões úmidas, o que favorece a incidência de doenças fúngicas foliares que podem comprometer a produtividade de uva. Por esta razão, anualmente as videiras são submetidas à aplicações sucessivas de fungicidas cúpricos foliares (Mackie et al., 2012), que ao longo dos anos causam o acúmulo de cobre (Cu) em solos de vinhedos (Casali et al., 2008; Nogueirol et al., 2010).

¹ Artigo submetido à revista Soil biology & biochemistry (Apresentado de acordo com as normas da revista)

Os altos teores de Cu nas camadas superficiais do solo reduzem o desenvolvimento de plantas herbáceas espontâneas ou introduzidas que normalmente são cultivadas nas entrelinhas dos vinhedos (Panou-Filotheou et al., 2001). Além disso, parte do Cu pode estar presente na solução do solo ou adsorvido a partículas minerais e orgânicas, podendo atingir águas superficiais adjacentes aos vinhedos (Karathanasis, 1999). Especialmente em solos com textura arenosa, parte do Cu pode migrar no perfil do solo, potencializando a contaminação de águas subsuperficiais (Fernández-Calviño et al., 2012). Ao longo do ciclo da videira ou depois da erradicação dos vinhedos, espécies de plantas de cobertura, como a *Crotalaria juncea* podem ser cultivadas para proporcionar maior cobertura do solo e aumento no aporte de resíduos orgânicos ao solo.

A *C. juncea* pode ser favorecida pelo estabelecimento de simbioses radiculares como as bactérias fixadoras de nitrogênio e as micorrizas, mas pouco se conhece sobre o papel destas na proteção das plantas ao excesso de metais pesados como o Cu e seu consequente efeito na produção de biomassa e parâmetros fisiológicos. Atualmente, tem sido evidenciado o efeito fitoprotetor dos FMAs para diferentes espécies de gramíneas (Soares & Siqueira, 2008) e espécies arbóreas (Treseder e Vitousek, 2001). Entretanto, tem sido sugerido que os FMA podem contribuir para fitoproteção das plantas ao excesso de metais potencialmente tóxicos, envolvendo mecanismos tais como: efeito de diluição dos metais pesados nos tecidos vegetais em decorrência do favorecimento do crescimento da planta (Christie et al., 2004); exclusão da absorção por meio da precipitação ou quelação dos elementos na rizosfera (Kaldorf et al., 1999); redução da absorção devido à retenção e imobilização dos metais pesados nas estruturas fúngicas (Khan et al., 2000; Zhu et al., 2001; González-Chávez et al., 2002), com consequente redução da transferência dos elementos das raízes para a parte aérea (Joner et al., 2000; Christie et al., 2004). Estes efeitos dos FMA para as plantas simbióticas são diferenciados para os isolados fúngicos testados e elementos contaminantes do solo (Silva et al., 2006), o que pode estar relacionado com a capacidade de retenção de metais pesados no micélio fúngico.

Estudos realizados com a espécie *Rhizophagus clarus* têm demonstrado capacidade diferenciada na retenção de Cu, Zn, Cd e Pb em tecidos dessa espécie *in vitro* (Cabral et al., 2008). Tal comportamento foi atribuído à produção de glicoproteínas denominadas glomalinas pelos FMA, mas que ainda não foram avaliadas experimentalmente em solos tropicais contendo excesso de metais pesados. Por atuarem como agentes de proteção às plantas e também por favorecerem a extração de metais pesados do solo (Christie et al., 2004), estes fungos podem desempenhar importante papel na tolerância das plantas a estes

contaminantes, visto que a maioria das plantas formam a simbiose micorrízica mesmo em condições de elevada contaminação (Klauber-Filho et al., 2005).

Os FMA também podem reduzir a fitotoxidez dos metais às plantas em decorrência do aumento da aquisição de fósforo (P) pela planta hospedeira. Alguns estudos indicam que o suprimento adequado de P possibilita também o aumento da retenção de metais pesados nas raízes das plantas, restringindo, assim, o transporte desses elementos para a parte aérea (Soares et al., 2006). Isto acontece porque o metal forma complexos com o P e permanece retido nas raízes (Van Steveninck et al., 1994).

Além dos FMA, o aumento do teor de P no solo, derivado de adubações ao longo dos ciclos das videiras, pode reduzir a disponibilidade de Cu na solução pela formação de fosfato de Cu insolúvel (Ayati e Madsen 2001; Cao et al., 2003). Além disso, o ânion fosfato pode se ligar à superfície de partículas reativas do solo, como os óxidos, aumentando as cargas negativas (Barrow, 1999; Pérez-Novo et al., 2009). Isso potencializa a formação de complexos ternários do tipo óxido-fosfato-metal (McBride, 1994), o que diminui a disponibilidade do Cu na solução e, por consequência, a sua fitotoxicidade. Devido à interação P-metal há uma redução na disponibilidade de P na solução com consequente comprometimento da absorção de P pelas plantas. Em razão disso, algumas espécies vegetais têm como estratégia o aumento na atividade de fosfatases nas raízes e nas folhas em resposta à deficiência de P no solo, evidenciando sua importância para a nutrição das plantas (Nuruzzaman et al., 2006; Tabaldi et al., 2011; Wang et al., 2013). Entretanto, este aspecto tem sido pouco investigado em solos contendo excesso de metais em condições tropicais.

Devido à aplicação potencial que os FMA apresentam no aumento da tolerância das plantas a metais pesados e na capacidade de melhorar a aquisição de P pelas plantas, o estudo objetivou avaliar o efeito da aplicação de P e inoculação de FMA sobre o crescimento da crotalária, atividade enzimática de fosfatase ácida nas plantas e solo e presença de glomalina em solo com altos teores de Cu.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Delineamento experimental e análise da solução do solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solo da Universidade Federal de Santa Maria, no Brasil, utilizando-se um Argissolo Vermelho proveniente de uma área de campo nativo o qual apresentou as seguintes características físicas

na camada de 0 - 20 cm: 675, 260 e 65 g kg⁻¹ de areia, silte e argila, respectivamente. O pH do solo foi corrigido para 6.0 com a aplicação de calcário dolomítico e como características químicas tem-se: 5.6 mg kg⁻¹ de P (extrator Mehlich-1), 80 mg kg⁻¹ de K (extrator Mehlich-1), 6.5 g kg⁻¹ de C e 0.55 mg kg⁻¹ de Cu (extrator EDTA). O experimento foi realizado em esquema fatorial 3 x 2 (teor natural de P, 40 e 100 mg kg⁻¹ de P, com e sem FMA) com três repetições. O fornecimento de P foi realizado pela aplicação de superfosfato triplo (41% de P₂O₅) o qual foi incubado por um período de 45 dias. Em seguida realizou-se a contaminação artificial do solo aplicando-se 60 mg kg⁻¹ Cu (CuSO₄.2H₂O) o qual ficou incubado por mais um período de 45 dias. Além dos tratamentos de P e FMA em solo com altos teores de Cu foram avaliados dois tratamentos adicionais em solo com teores naturais de Cu (0.55 mg kg⁻¹) contendo 40 mg kg⁻¹ P, com e sem inoculação de FMA.

Após o período de incubação, o solo foi esterilizado duas vezes por meio da autoclavagem a 120°C durante duas horas. Posteriormente o solo foi adicionado em vasos plásticos com capacidade de 2.5 dm³ e em todas as unidades experimentais foi realizada a aplicação de 100, 30, 5.0, 0.81 e 0.15 mg kg⁻¹ de N (NH₄Cl), K (K₂SO₄), Zn (ZnSO₄.7H₂O) e B (H₃BO₃), respectivamente, sendo a adubação nitrogenada parcelada em duas vezes aos 15 e 30 dias. Os principais atributos químicos do solo após a aplicação dos tratamentos e autoclavagem, são apresentados na **Tabela 1**.

Posteriormente a solução do solo foi obtida em extrato de saturação conforme metodologia descrita por Rajj et al. (2001). Em uma alíquota da solução foi determinado o pH. Posteriormente, outra alíquota foi filtrada em membrana de celulose de 0,22 µm. Nesse extrato foram analisados o teor de C orgânico solúvel total (Silva, 2001), os teores totais de cátions em solução (Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, K⁺ e Na⁺) e P total, em ICP Perkin-Elmer Optima 7000DV e os teores de ânions (NO₃⁻, SO₄⁻² e Cl⁻) por análise de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A especiação iônica da solução do solo foi realizada usando o programa computacional Visual MINTEQ (versão 2.15 - Gustafsson, 2004).

4.3.2 Material biológico

As sementes de *C. juncea* foram escarificadas com H₂SO₄ PA concentrado, por 5 minutos e, lavadas com água destilada autoclavada. Foram semeadas quatro sementes por vaso e 10 dias após foram mantidas duas plantas por vaso. A inoculação de FMA foi realizada com a aplicação de 200 esporos de *Rhizophagus clarus* por vaso, fornecido pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. Nos

tratamentos não inoculados foram aplicados 50 mL de um filtrado de solo-inóculo sem propágulos de FMA, objetivando equilibrar a microbiota edáfica.

4.3.3 Dados experimentais e análises químicas

Após 45 dias de cultivo foram avaliadas a produção de matéria seca da parte aérea, matéria seca de raízes e coletado solo rizosférico para avaliação da atividade da enzima fosfatase ácida do solo e os teores de glomalina facilmente extraível e glomalina total. As plantas foram colhidas, cortando-se a parte aérea rente ao solo, e o material colhido foi lavado com água destilada. As raízes foram lavadas em água corrente até a completa remoção do solo e posteriormente lavadas com uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ e, finalmente, lavadas em água destilada. A parte aérea e as raízes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 60–70°C, até atingir massa constante.

Os teores de P e Cu, na parte aérea e nas raízes foram determinados por espectroscopia de emissão de plasma óptico indutivamente acoplado. (ICP Perkin-Elmer Optima 7000DV) após digestão com HNO₃-HClO₄.

Para a quantificação da fosfatase ácida no tecido da parte aérea, coletou-se a quarta folha expandida do terço superior de cada planta a qual foi imediatamente congelada em N₂ líquido e armazenada a -80°C. Posteriormente, 1.0 g de amostra macerada em N₂ líquido foi homogeneizada em 3.0 mL de tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ (pH 7.4), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 1.0 mmol L⁻¹ e albumina 0.1%. Logo em seguida, a mistura foi centrifugada a 20.000 g durante 30 min e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. A atividade da fosfatase ácida no material vegetal foi determinada de acordo com Tabaldi et al. (2007), num meio de reação que consistia em azida de sódio 3.5 mmol L⁻¹, cloreto de cálcio 2.5 mmol L⁻¹ e tampão citrato 100 mmol L⁻¹ (pH 5.5), para um volume final de 200 µL. Uma alíquota de 20 µL de amostra foi adicionada à mistura de reação, com exceção dos controles e pré-incubada durante 10 min a 35°C. A reação foi iniciada pela adição de substrato (PPi 3,0 mmol L⁻¹) e paralizada após 10 min pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%.

A atividade da enzima fosfatase ácida no solo (fosfomonoesterases) foi estimada por medição da libertação de *p*-nitrofenol a partir de fosfato de *p*-nitrofenilo, após exposição ao solo em tampão universal modificado (MUB) a pH 6,5, tal como descrito por Tabatabai & Bremner (1969). As amostras de solo (1 g) foram incubadas com 1 mL da solução de *p*-nitrofenyl fosfato + 4 mL de MUB 1 durante 60 min a 37°C. No final do período de

incubação, foram adicionados 1 mL da solução de *p*-nitrofenyl fosfato + 4 mL de MUB. Depois, a solução foi filtrada rapidamente com Whattman filtro 2v. As amostras foram homogeneizadas e em *p*-nitrofenol formado foi determinada por meio de espectrofotometria a 400 nm.

A quantificação de glomalina facilmente extraível (GFE) e glomalina total (GT) foi realizada segundo o ensaio de Bradford (1976), modificado por Wright & Upadhyaya (1998). Para a quantificação de GFE, foi utilizado 1.0 g de solo rizosférico seco ao ar. A extração foi feita com 8.0 mL de citrato de sódio 20 mmol L⁻¹ pH 7.0 durante 30 minutos a 121°C. A glomalina total (GT) foi extraída com citrato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 8.0 ao longo de 3 ciclos de autoclavagem a 121°C, cada ciclo com duração de 1 hora. O extrator foi separado do solo através de centrifugação a 3.500 rpm durante 10 minutos. A proteína presente no sobrenadante foi quantificada através do ensaio de Bradford, usando soro-albumina bovina como padrão (Wright et al., 1996). A concentração de glomalina foi corrigida para mg g⁻¹ considerando-se a massa de solo seco e o volume total de sobrenadante.

As raízes foram separadas do solo e cerca de 1.0 g foi coletada para avaliação da taxa de colonização micorrízica. As raízes coletadas foram conservadas em FAA [formaldeído (40%): álcool (50%): ácido acético = 13 mL:200 mL:5 mL], e, posteriormente, clareadas e coloridas pelo método de Phillips & Hayman, (1970). A taxa de colonização foi avaliada em placa quadriculada (Giovanetti & Mosse, 1980). O número de esporos no solo foi determinado, por meio do peneiramento via úmida e centrifugação em solução de sacarose (Gerdemann & Nicolson, 1963) utilizando-se 50 mL de solo de cada vaso.

4.3.4 Análise estatística

Todos os dados foram transformados quando necessário para atender as pressuposições dos testes de normalidade. Posteriormente, os resultados obtidos foram analisados mediante análise de variância (ANOVA) e quando os efeitos da inoculação com FMA e das doses de P foram significativos a $P < 0.05$ pelo teste de F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a $P < 0.05$. Também por meio de teste F ($P < 0.05$), obteve-se a significância do contraste entre o fatorial e os tratamentos adicionais e, quando significativo, as médias de todos os tratamentos foram comparadas (incluindo o tratamento adicional sem Cu com inoculação de FMA) com o tratamento testemunha (sem Cu e sem inoculação de FMA) pelo teste de Dunnett a $P < 0.05$. Os resultados de colonização micorrízica foram transformados pelo $\arcsen(x/100)^{0.5}$ e número de esporos por $(x + 0.5)^{0.5}$.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Solução do solo

A adição de P reduziu a disponibilidade e alterou as formas de Cu na solução do solo e promoveu uma diminuição nos valores de pH (**Tabela 1**). O Cu em solução, independentemente da quantidade de P adicionada ao solo, exceto no tratamento sem a adição de Cu (40 mg kg⁻¹ de P), estava ligado ao carbono orgânico dissolvido Cu-DOM1 (96%) e, aproximadamente, 3% na forma de Cu²⁺. O tratamento com 40 mg kg⁻¹ de P e sem a aplicação de Cu, revelou que 52, 26 e 22% das formas livres de Cu mantiveram-se como CuCl_{aq}, CuCl₂⁻ e Cu²⁺, respectivamente. Para os elementos Fe e Zn em solução, à medida que houve incrementos nos teores de P na solução do solo, a concentração dos dois elementos diminuiu. Os teores de PO₄⁻ em solução do solo variaram de 5.2 a 10.10 mg L⁻¹ (**Tabela 1**) e a espécie de P que predominou na solução do solo foi H₂PO₄⁻ em que o pH da solução apresentou valor médio de 4.8. A adição de Cu nos diferentes tratamentos aumentou a disponibilidade de NO₃⁻, Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ na solução do solo.

4.4.2 Aplicação de P e inoculação de FMA no crescimento da *C. juncea* em solo com altos teores de Cu

Com a adição de 40 mg kg⁻¹ P no solo com os teores naturais de Cu, a inoculação com o FMA proporcionou incremento na matéria seca da parte aérea de 31%, quando comparado ao tratamento sem inoculação (**Figura 1**) (**Anexo 1**). No solo com altos teores de Cu a adição 40 e 100 mg kg⁻¹ de P favoreceu o crescimento das plantas tanto na presença quanto na ausência do FMA (**Anexo 2**). No entanto, quando as plantas desenvolveram-se no solo com os teores naturais P, a inoculação com FMA proporcionou incremento de 116% na produção de matéria seca da parte aérea, comparativamente ao tratamento sem inoculação (**Figura 1**) (**Anexo 3**). A produção de matéria seca de raízes no solo com teores naturais de Cu e com 40 mg kg⁻¹ P, foi de 1.29 e 3.73 g vaso⁻¹, para o tratamento sem inoculação e inoculado, respectivamente (**Figura 1**). A produção de matéria seca de raízes aumentou com o aumento do teor de P no solo, tanto na presença de FMA como na ausência. Nos tratamentos com 40 e 100 mg kg⁻¹ de P no solo com altos teores de Cu houve uma maior produção de matéria seca da parte aérea e de raiz na presença e ausência de FMA, em relação ao tratamento com 40 mg kg⁻¹ de P no solo com os teores naturais de Cu sem inoculação do fungo (**Anexo 4**).

A inoculação com o FMA favoreceu uma maior absorção de P pela plantas, sendo que no tratamento que foi aplicado 40 mg kg^{-1} de P no solo com teor natural de Cu, o teor de P na parte aérea foi 85% maior, comparado ao tratamento sem FMA (**Figura 2**). No tratamento com teor natural de P os teores de P na parte aérea das plantas inoculadas com o FMA foi de 1638 mg kg^{-1} e de 724 mg kg^{-1} no tratamento sem inoculação. Os teores de P nas raízes das plantas variaram de 1141 a 2177 mg kg^{-1} onde foi inoculado com FMA e de 636 a 2154 mg kg^{-1} onde não foi inoculado (**Figura 2**). Os teores de P na raízes no tratamento com o teor natural de P foram de 636 e 1141 mg kg^{-1} , sem e com inoculação do FMA, respectivamente. Com o aumento nas quantidades de P aplicadas no solo, os teores de P nas raízes aumentaram significativamente, independente da inoculação.

É importante, contudo, observar que no solo com teor natural de P, a inoculação do FMA resultou na diminuição do teor de Cu na parte aérea, e aumentou o teor de Cu nas raízes. Nesse solo com teor natural de P, os teores de Cu na parte aérea foi de 79 e 45 mg kg^{-1} com e sem inoculação com FMA, respectivamente, enquanto que onde foi aplicado 100 mg kg^{-1} de P, os teores de Cu na parte aérea não foram influenciados pela inoculação. Por outro lado, quando as plantas foram inoculadas com o FMA os teores de Cu foram maiores nas raízes (**Figura 2**). Com a aplicação de P e a inoculação do FMA, os teores de Cu na parte aérea e nas raízes foram mais elevados nos solos com altos teores de Cu, em comparação com o solo com teor natural de Cu.

A atividade de fosfatase ácida no solo variou de 144 a $243 \mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ quando as plantas foram inoculadas com o FMA e de 140 a $269 \mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sem a inoculação do FMA (**Tabela 2**). A relação fosfatase ácida e matéria seca de raiz foi maior no solo com teor natural de P na presença e ausência do FMA (**Tabela 2**). A atividade da fosfatase ácida por grama de raiz no solo com teor natural de P e sem a inoculação com o FMA foi de $817 \mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e de $256 \mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com inoculação do FMA. Com a aplicação de 40 e 100 mg kg^{-1} de P no solo houve menor atividade da fosfatase ácida por grama de raiz, quando comparada com o solo com teor natural de P. A relação fosfatase ácida e matéria seca de raiz no solo com altos teores de Cu e onde foi aplicado 40 e 100 mg kg^{-1} de P, tanto na presença como na ausência do FMA foi igual ao tratamento com 40 mg kg^{-1} de P com teor natural de Cu e sem inoculação.

A atividade da fosfatase ácida nas folhas da *C. juncea* foi menor com a inoculação do FMA e quando sem inoculação a atividade da fosfatase ácida foi maior no solo com teor natural de P. Com a aplicação de 40 mg kg^{-1} de P nos solos com altos teores de Cu, os valores observados foram de $335 \text{ nmol (Pi) min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ nas plantas inoculadas com FMA e de $439 \text{ nmol (Pi) min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ onde não foi inoculado. Entretanto a atividade da

fosfatase ácida nas folhas não foi influenciada pela quantidade de P aplicado no solo, quando feita a inoculação com FMA (**Tabela 2**). A atividade da fosfatase ácida nas folhas foi maior no solo com teor natural de P e sem inoculação com FMA, quando comparado com a aplicação de 40 mg kg^{-1} de P no solo com teor natural de Cu e sem inoculação do FMA, enquanto que os demais tratamentos foram iguais a esse tratamento (40 mg kg^{-1} de P no solo com teor natural de Cu e sem inoculação).

Todos os tratamentos sem inoculação de FMA não apresentaram esporos e colonização por FMA (**Tabela 2**). Entretanto, com a inoculação com FMA a colonização não diferiu no solo com teor natural de P e onde foi aplicado 40 mg kg^{-1} P (média de 77%), mas foi menor com a aplicação de 100 mg kg^{-1} P (54%). Por sua vez, o número de esporos no solo diminuiu proporcionalmente ao aumento da dose de P, de 86 para 25 esporos 50 mL solo^{-1} .

Os teores de glomalina facilmente extraível (GFE) e glomalina total (GT) no solo foram maiores quando ocorreu a inoculação com o FMA no solo com o teor natural de P (**Tabela 2**). Com a aplicação de 40 mg kg^{-1} de P no solo com teor natural de Cu, os valores de GFE foram de $2,13 \text{ mg g solo}^{-1}$ sem inoculação de FMA e de $2,51 \text{ mg g solo}^{-1}$ com inoculação do FMA. Para a GT os valores variaram de 4,33 a $5,26 \text{ mg g solo}^{-1}$ sem inoculação e com a inoculação do FMA, respectivamente. No solo com teor natural de P e com altos teores de Cu os teores de GFE no solo foram 1,56 vezes maior na presença do FMA, mas para GT, a inoculação com FMA proporcionou um aumento de 124%, em relação ao tratamento sem inoculação (**Tabela 2**).

4.5 DISCUSSÃO

Estratégias para diminuir a solubilidade e a biodisponibilidade de metais pesados presente no solo têm sido propostas como forma de diminuir os impactos desta contaminação sobre as espécies vegetais. Isso foi observado neste trabalho, pois com a aplicação de P houve uma diminuição na disponibilidade de Cu na solução do solo (**Tabela 1**), com consequente favorecimento do crescimento das plantas (**Tabela 2**). Isso foi demonstrado também pelo fato de que o aumento nos teores de P solúvel no solo correlacionou-se positivamente com a produção de matéria seca da parte aérea ($r:0.67$; $P<0.001$), enquanto o baixo fornecimento de P aliado aos alto teores de Cu na solução apresentou correlação negativa com a produção de matéria seca da parte aérea ($r:-0.40$; $p<0.001$). A justificativa para este fenômeno seria de que a adição de fosfatos é eficiente na remediação de solos contaminados com metais (Cao et al., 2002; Cao et al. 2003; Kede et al., 2008) e isto se deve a alteração de parte dos metais

solúveis em espécies minerais insolúveis (Ayati e Madsen 2001; Cao et al. 2003). Além disso, o ânion fosfato pode se ligar à superfície de partículas reativas, como por exemplo, os óxidos, formando carga líquida negativa (Barrow, 1999). Com isso, pode acontecer a formação de complexos ternários do tipo óxido-fosfato-metal (McBride, 1994; Pérez-Novo et al., 2009), o que diminuiu a disponibilidade do metal, como o Cu, na solução (Tabela 1).

O crescimento da *C. juncea* foi bastante reduzido no tratamento com teor natural de P sem inoculação de FMA, mas a inoculação do FMA, beneficiou o crescimento das plantas nesta condição (**Figura 1**) e isto foi relacionado com o aumento na absorção de P devido ao maior volume de solo explorado mediado pelo FMA (Moreira & Siqueira, 2006). Constatou-se que houve maior exsudação de enzimas fosfatase ácida pelas raízes nos tratamentos com teor natural de P e ausência de FMA (Tabela 2). Nesta situação as plantas, por alteração da expressão gênica, promovem maior exsudação de fosfatase ácida para o solo (Raghothama and Karthikeyan, 2005), ativando a desfosforilação de compostos orgânicos e disponibilizando P inorgânico para manutenção do metabolismo celular em regiões meristemáticas (Yun & Kaeppler, 2001; Nanamori et al., 2004; Bozzo et al., 2006). Além disso, a menor produção de matéria seca no solo com teor natural de P se deve ao fato de que a quantidade de P adicionada não foi suficiente para reduzir os teores de Cu na solução (Tabela 1).

A inoculação com o FMA no tratamento com teor natural de P proporcionou diminuição nos teores de Cu na parte aérea das plantas (**Tabela 2**), refletindo em um melhor crescimento das plantas (**Tabela 2**). Isto pode estar relacionado com a diminuição da absorção de Cu devido a retenção e imobilização do elemento nos componentes da parede celular de hifas intra e extraradiculares ou compartimentalização metálica no interior de células fúngicas (Khan et al., 2000; Zhu et al., 2001; Cornejo et al., 2013), reduzindo a transferência do Cu para a planta simbiótica. De fato, estudo realizado por Cabral et al. (2007) demonstrou que o micélio de *R. clarus* tem capacidade de reter elevadas quantidades de Cu em comparação a Zn, Cd e Pb, demonstrando que este FMA pode prevenir a exposição das plantas ao Cu. Além disso, tem sido demonstrado que glicoproteínas produzidas pelos FMA podem efetivamente reter elementos metálicos no solo e isso pode reduzir a disponibilidade dos contaminantes para as plantas com consequente efeito fitoprotetor. A glomalina é amplamente estudada pelas suas implicações no sequestro de Cu, Cd, Pb e Zn (González-Chávez et al., 2004; Chern et al., 2007; Vodnik et al., 2008), evidenciando que esse sequestro pode ser importante para a bioestabilização em solos contaminados. Em trabalho realizado por Bedini et al. (2009), foi demonstrado que a quantidade de Cu, Ni, Pb e Co ligada à GRSP foi de, respectivamente, 2,

3, 0,83, 0,24 e 0,24 % do total do teor destes metais em solo contaminado, reduzindo assim a biodisponibilidade de elementos tóxicos e, conseqüentemente, o estresse da planta por esses elementos. No presente estudo foi demonstrado que a inoculação de *R. clarus* proporcionaram incrementos de glomalina em solos com teores elevados de Cu e isso pode explicar o efeito benéfico da inoculação sobre o crescimento de *C. juncea* .

Outro mecanismo relacionado com a redução de absorção de elementos contaminantes tais como Cu está associado com o estado nutricional P das plantas. Foi observado que o aumento da oferta de P proporciona uma maior retenção de Cu na raiz de *C. juncea* e promove uma redução na translocação deste elemento das raízes. Na verdade, os estudos demonstraram a formação de complexos insolúveis de metal-fosfatos nas raízes das plantas (Van Steveninck et al., 1994,.. Brown et al., 1995). Uma vez que a melhoria do estado nutricional de P pode reduzir a fitotoxicidade de metais, as plantas podem aumentar a excreção APses no solo como um mecanismo amenizador, a fim de evitar íons metálicos livres em compartimentos celulares sensíveis, como o citoplasma (Barcelo & Poschenrieder, 1992) . Assim, as plantas bem nutridas pode armazenar P-complexos de metal, em vacúolos (Barcelo & Poschenrieder, 1992), ou podem formar grânulos de polifosfato no interior das raízes (Barcelo & Poschenrieder, 1992).

Além disso, a exclusão da absorção por meio da precipitação ou quelação dos elementos na rizosfera (Göhre e Paszkowski, 2006; Vodnik et al., 2008); pode ter também influenciado na redução da transferência de Cu das raízes para a parte aérea, especialmente no solo com o teor natural de P. A menor transferência de Cu para a parte aérea nos tratamentos com o teor natural de P no solo também pode estar relacionada com a maior produção de glomalina (GRSPs) nos tratamentos inoculados com o FMA (**Tabela 2**).

Os resultados demonstram que a combinação entre fósforo e o FMA (*Rhizophagus clarus*) pode ser uma estratégia adequada para a redução da fitoxidez de Cu em *Crotalaria juncea*, pois proporcionaram incrementos na produção de matéria seca das plantas e, uma diminuição na atividade das enzimas APases ácida no solo e nas plantas. Além disso, foi demonstrado que a glomalina produzidas pelos FMA pode diminuir a disponibilidade do Cu para as plantas com conseqüente efeito fitoprotetor.

Tabela 1. Características químicas do solo, da solução do solo e especiação iônica depois da aplicação dos tratamentos com P e Cu.

	Com Cu			Sem Cu
	P-Natural	40 mg kg ⁻¹ P	100 mg kg ⁻¹ P	40 mg kg ⁻¹ P
<i>Caracterização Química do Solo</i>				
pH (H ₂ O)	5.9	5.6	5.5	6.2
C (g kg ⁻¹)	6.5	6.5	6.5	6.5
Cu disponível por EDTA (mg kg ⁻¹)	45.6	45.5	42.5	0.55
P disponível por Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	5.6	34.1	85.3	34.2
K disponível por Mehlich-1 (mg kg ⁻¹)	190.5	183.5	170.5	119.0
Ca trocável (mg kg ⁻¹)	458.4	458.4	552.8	458.4
Mg trocável (mg kg ⁻¹)	90.7	94.1	94.4	89.4
<i>Caracterização Química da Solução do Solo</i>				
pH	4.9	4.9	4.8	5.6
Na (mg L ⁻¹)	12	18	13	15
Al (mg L ⁻¹)	4.0	3.4	4.2	1.2
K (mg L ⁻¹)	21	25	28	12
Mg (mg L ⁻¹)	126	133	135	70
Ca (mg L ⁻¹)	266	286	332	164
Cu (mg L ⁻¹)	10.5	7.3	4.8	0.4
Fe (mg L ⁻¹)	1.9	1.4	1.2	1.6
Zn (mg L ⁻¹)	0.8	0.5	0.4	0.5
Cl (mg L ⁻¹)	108	119	138	87
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	86	102	126	74
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	265	314	310	71
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	5.2	7.4	10.1	6.7
Soluble organic carbon (mg L ⁻¹)	654	669	635	653
<i>Especiação Química da Solução do Solo</i>				
			%	
Cu ²⁺ (%)	2.7	2.8	3.4	22
Cu-DOM (%)	97	96	96	-----
CuCl ₂ ⁻	-----	-----	-----	26
CuCl _(aq)	-----	-----	-----	52
H ₂ PO ₄ ⁻	77	81	79	79
AlHPO ₄ ⁺	15	11	13	8.0
HPO ₄ ²⁻	-----	-----	-----	3.0
CaH ₂ PO ₄ ⁺	-----	-----	-----	2.4

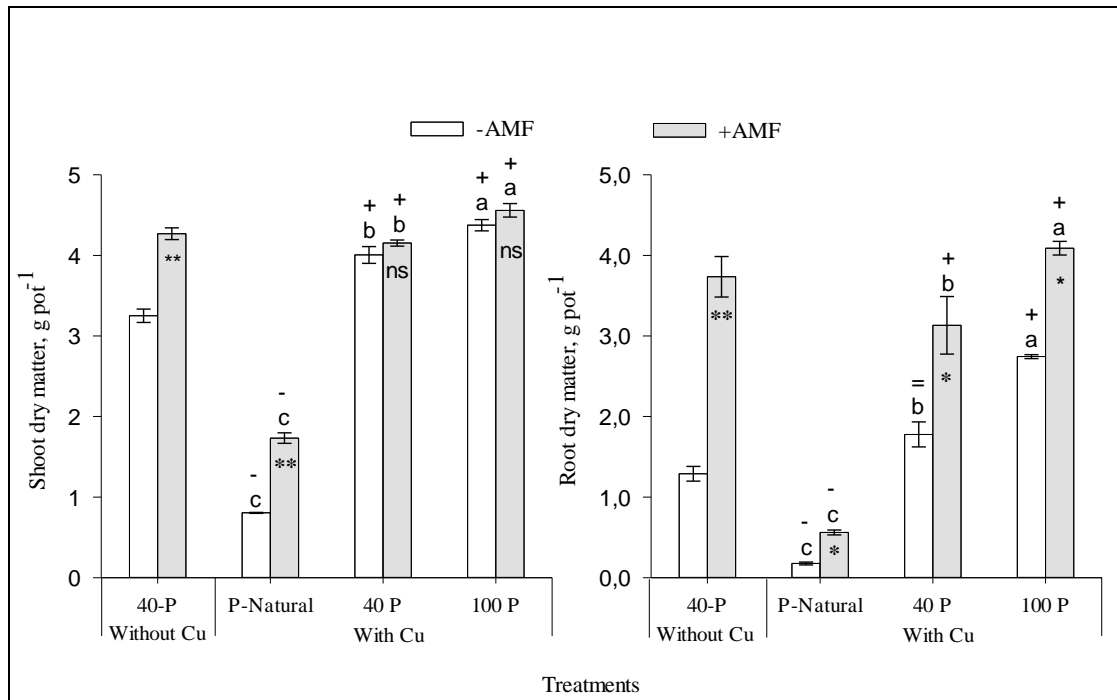


Figura 1. Matéria seca da parte aérea e raízes, em solo cultivado com *Crotalaria juncea*, com e sem Cu e AMF. + Superior ao tratamento testemunha, - Inferior ao tratamento testemunha, = Semelhante ao tratamento testemunha pelo teste de Dunnett a $P < 0.05$. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as doses de P nos tratamentos com e sem inoculação de FMA, não diferem entre si pelo teste de Tukey a * $P < 0.05$, ** a $P < 0.01$

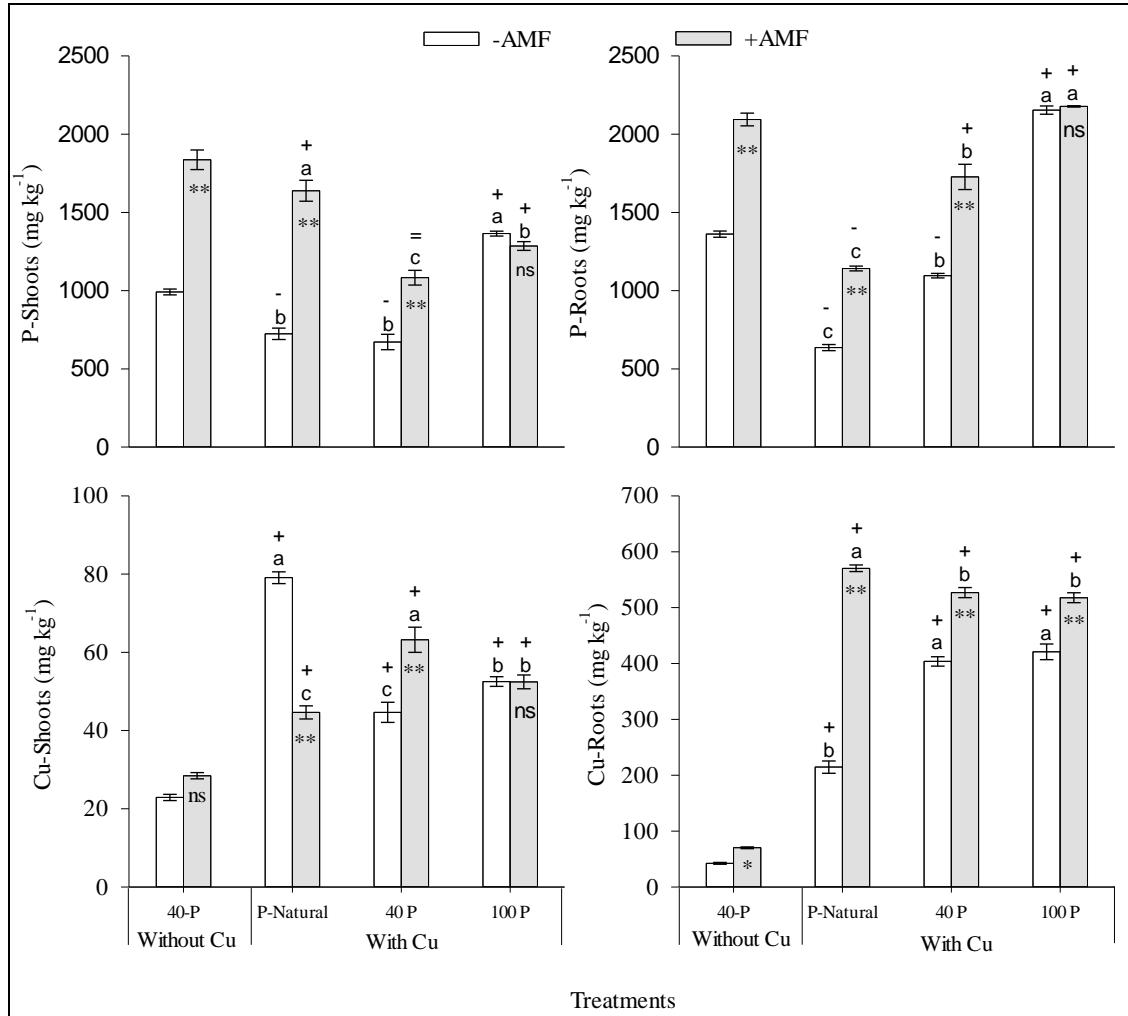


Figura 2. Conteúdo de P e Cu na parte aérea e raízes, em solo cultivado com *Crotalaria juncea*, com e sem Cu e AMF. + Superior ao tratamento testemunha, - Inferior ao tratamento testemunha, = Semelhante ao tratamento testemunha pelo teste de Dunnett a $P < 0.05$. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as doses de P nos tratamentos com e sem inoculação de FMA, não diferem entre si pelo teste de Tukey * a $P < 0.05$, ** a $P < 0.01$.

Tabela 2. P-ase no solo, relação P-ase/raiz, P-ase na folha, colonização, esporos, glomalina FE e total, em solo cultivado com *Crotalaria juncea*, com e sem Cu, com e sem AMF, e conteúdo de P.

	Fontes de variação					Com Cu†						Sem Cu‡		CV (%)
	I	D	Ix D	Fx A+T	Ax T	-FMA			+FMA			-FMA	+FMA	
						P-Natural	40P	100P	P-Natural	40P	100P	40P	40P	
P-ase no solo ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	ns	**	**	ns	**	140 aB	244 aA	164 bB	144 aB	167 bB	269 aA	124 b	225 a	12.1
relação P-ase/raiz	**	**	**	**	ns	817 aA +	138 aB =	60 aB =	258 bA +	55 aB =	66 aB =	99 a	61 a	33.4
P-ase na folha (U mg^{-1} proteína)	**	**	*	**	ns	643 aA +	439 aB =	532 aB =	486 bA =	425 aA =	423 aA =	438 a	335 a	10.0
Colonização (%)	**	**	**	*	**	0 bA =	0 bA =	0 bA =	79 aA +	75 aA +	54 aB +	0 b	74 a	6.5
Esporos ($\text{n}^\circ \text{ esp. } 50 \text{ mL solo}^{-1}$)	**	**	**	**	**	0 bA =	0 bA =	0 bA =	86 aA +	50 aB +	25 aC +	0 b	35 a	11.9
Glomalina FE (mg g^{-1})	**	**	**	**	**	2.2 bA =	2.1 bA =	2.1 bA =	3.3 aA +	2.6 aB +	2.5 aB +	2.1 b	2.5 a	3.7
Glomalina Total (mg g^{-1})	**	**	**	**	**	4.2 bA =	4.3 bA =	4.4 bA =	9.3 aA +	5.5 aB +	5.1 aB +	4.3 b	5.3 a	6.1

+ Superior ao tratamento testemunha pelo teste de Dunnett a $P < 0.05$.

– Inferior ao tratamento testemunha pelo teste de Dunnett a $P < 0.05$.

= Semelhante ao tratamento testemunha pelo teste de Dunnett a $P < 0.05$.

† Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, comparando o efeito da inoculação de FMA em cada dose de P, e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, comparando as doses de P nos tratamentos com e sem inoculação de FMA, não diferem entre si pelo teste de Tukey a $P < 0.05$.

‡ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, comparando o efeito da inoculação de FMA não diferem entre si pelo teste de Dunnett a $P < 0.05$.

* Significativo a $P < 0.05$.

** Significativo a $P < 0.01$.

ns = não significativo

4.6 REFERÊNCIAS

- Ayati, M., Madsen, H.E.L., 2001. Crystallization of some heavy metal phosphates alone and in the presence of calcium ion. *Journal of Crystal Growth* 208, 579-591.
- Barrow, N.J., 1999. The four laws of soil chemistry: the Leeper lecture 1998. *Australian Journal of Soil Research* 37, 787-830.
- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E., Giovannetti, M., 2009. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 1491-1496.
- Bozzo, G.G., Dunn, E.L., Plaxton, W.C., 2006. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant, Cell & Environment* 29, 303-313, 2006.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cabral, L., Siqueira, J.O., Soares, C.R.F.S., Pinto, J.E.B.P., 2010. Retention of heavy metals in mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Química Nova* 33, 25-29.
- Cao X., Ma L.Q., Chen, M., Singh, S.P., Harris, W.G., 2002. Impacts of phosphate amendments on lead biogeochemistry at a contaminated site. *Environmental Science & Technology* 36, 5296-5304.
- Cao, R.X., Ma L.Q., Chen, M., Singh, S.P., Harris, W.G., 2003. Phosphate-induced metal immobilization in a contaminated site. *Environmental Pollution* 122, 19-28.
- Casali, C.A., Moterle, D.F., Rheinheimer, D.S., Brunetto, G., Mello, A.L.C., Kaminski, J., Melo, G.W.B., 2008. Copper forms and desorption in soils under grapevine in the Serra Gaúcha of Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32, 1479-1487.
- Chern, E.C., Tsai, D.W., Ogunseitan, O.A., 2007. Deposition of glomalin-related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environmental Science & Technology* 41, 3566-3572.
- Christie, P., Li, X., CHEN, B., 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant and Soil* 261, 209-217.
- Cornejo, P., Pérez-Tienda, J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., Azcón-Aguilar, C., Ferrol, N., 2013. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular

- mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology & Biochemistry* 57, 925-928.
- Fernández-Calviño, D., Pateiro-Moure, M., Nóvoa-Muñoz, J.C., Garrido-Rodrigues, B., Arias-Estévez, M., 2012. Zinc distribution and acid–base mobilisation in vineyard soils and sediments. *Science Total Environment* 414, 470-479.
- Gerdemann, J.B., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46, 235-246.
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 484-500.
- Göhre, V., Paszkowski, U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115-1122.
- González-Chávez, C., Carrillo-González, R., Wright, S.F., Nichols, K.A., 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130, 317-323.
- Gonzalez-Chavez, C., D'Haen, J., Vangronsveld, J., Dodd, J.C., 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil* 240, 287- 297.
- Joner, E.J., Briones, R., Leyval, C., 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil* 226, 227-234.
- Kaldorf, M.O., Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Hildebrandt, U., Bothe, H., 1999. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* 154, 718-728.
- Karathanasis, A.D., 1999. Subsurface migration of copper and zinc mediated by soil colloids. *Soil Science Society of America Journal* 63, 830-838.
- Kede, M.L.L.F., Moreira, J.C., Mavropoulos, E., Rossi, A.M., Bertolino, L.C., Perez, D.V., Rocha, N.C.C., 2008. Study of lead behaviour in brazilian latosols treated with phosphates: contributions to the remediation of contaminated sites. *Química. Nova* 31, 579-584.
- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J., 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 21, 197-207.

- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J., 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 21, 197-207.
- Klauber-Filho, O., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., Soares, C.R.F.S., Silva, S., 2005. Ecology, function and potential application of mycorrhizal fungi under conditions of excess heavy metals. In: Vidal-Torrado, P.; Alleoni, L. R. F.; Cooper, M.; Silva, A.P.; Cardoso, E. J. *Topics in soil science* (Eds.). Editora: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, pp. 85-144.
- Mackie, K. A.; Mueller, T.; Kandeler, E., 2012. Remediation of copper in vineyards: a mini review. *Environmental Pollution* 167, 16–26.
- McBride, M.B., 1994. *Environmental chemistry of soils*. New York: Oxford University Press, 406p.
- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2006. *Soil microbiology and biochemistry*. Ed. UFLA, Lavras, 729 pp.
- Nanamori, M., Shimano, T., Wasaki, J., Yamamura, T., Rao, I.M., Osaki, M., 2004. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar mulato compared with rice. *Plant & Cell Physiology* 45, 460-469.
- Nogueirol, R.C., Alleoni, L.R.F., Nachtigall, G.R., Melo, G.W., 2010. Sequential extraction and availability of copper in Cu fungicide-amended vineyard soils from Southern Brazil. *Journal of Hazardous Materials* 181, 931-937.
- Nuruzzaman, M., Lambers, H., Bolland, M.D.A., Veneklaas, E.J., 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil* 281, 109-120.
- Panou-Filothéou, H., Bosabalidis, A.M., Karataglis, S., 2001. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany* 88, 207-214.
- Pérez-Novo, C., Bermúdez-Couso, A., López-Periágo, E., Fernández-Calviño, D., Arias-Estévez, M., 2009. The effect of phosphate on the sorption of copper by acid soils. *Geoderma* 150, 166–170.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society, London* 55, 158-161.
- Raghothama, K.G., Karthikeyan, A.S. 2005. Phosphate acquisition. *Plant and Soil* 274, 37-49.

- Raij, B. van., Andrade, J.C., Cantarella, H., Quaggio, J.A., 2001. Chemical analysis to evaluate fertility of tropical soils. Instituto Agronômico de Campinas. 285p.
- Silva, S., Soares, C.R.F.S., Siqueira, J.O., 2006. Mycorrhizal fungi influence on brachiariagrass growth and heavy metal extraction in a contaminated soil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 1749-1757.
- Soares, C.R.F.S., Siqueira, J.O., 2008. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. *Biology and Fertility of Soils* 44, 833–841.
- Soares, C.R.F.S., Siqueira, J.O., Carvalho, J.G., Guilherme, L.R.G., 2006. Arbuscular mycorrhiza and phosphorus nutrition on zinc toxicity to trema [*Trema micrantha* (L.) Blum.]. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30, 665–675
- Tabaldi, L.A., Cargnelutti, D., Castro, G.Y., Gonçalves, J.F., Rauber, R., Bisognin, D.A., Schetinger, M.R.C., Nicoloso, F.T., 2011. Effect of aluminum on the *in vitro* activity of acid phosphatases of four potato clones grown in three growth systems. *Biologia Plantarum* 55, 178-182.
- Tabaldi, L.A., Ruppenthal, R., Cargnelutti, D., Morsch, V.M., Pereira, L.B., Schetinger, M.R.C., 2007. Effects of metal elements on acid phosphatase activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 59, 43-48.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1, 301-307.
- Treseder, K.K., Vitousek, P.M., 2001. Effects of soil nutrient availability on investment in acquisition of n and p in hawaiian rain forests. *Ecological Society of America* 82, 946-954.
- Van Steveninck, R.F.M., Babare, A., Fernando, D.R., van Steveninck, M.E., 1994. The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. *Plant and Soil* 167, 157-164.
- Vodnik, D., Grčman, H., Macek, I., van Elteren, J.T., Kovacevic, M., 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment* 392, 130–136.
- Wang, F., Jiang, R., Kertesz, M.A., Zhang, F., Feng, G., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae mediating acidification can promote phytate mineralization in the hyphosphere of maize (*Zea mays* L.). *Soil Biology & Biochemistry* 65, 69-74.
- Wright, S.F., Franke-Snyder, M., Morton, J.B., Upadhyaya, A., 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil* 181, 193-203.

- Wright, S.F., Upadhyaya, A., 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198, 97-107.
- Yun, S.J., Kaeppler, S.M., 2001. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant & Soil* 237, 109-115.
- Zhu, Y.G., Christie, P., Laidlaw, A.S., 2001. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. *Chemosphere* 42, 193-199.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação entre fósforo e o FMA (*Rhizophagus clarus*) pode ser uma estratégia adequada para a redução da fitoxidez de Cu em *Crotalaria juncea*, pois proporcionaram incrementos na produção de matéria seca das plantas e, uma diminuição na atividade das enzimas APases ácida no solo e nas plantas. Além disso, foi demonstrado que a glomalina produzidas pelos FMA pode diminuir a disponibilidade do Cu para as plantas com consequente efeito fitoprotetor.

Os dados obtidos neste trabalho foram importantes para a compreensão da relação entre fósforo e o FMA (*Rhizophagus clarus*) na atenuação da fitotoxidez de Cu em solos cultivados com videiras e servem como estímulo á novos estudos.

Como sugestões para novos estudos ficam:

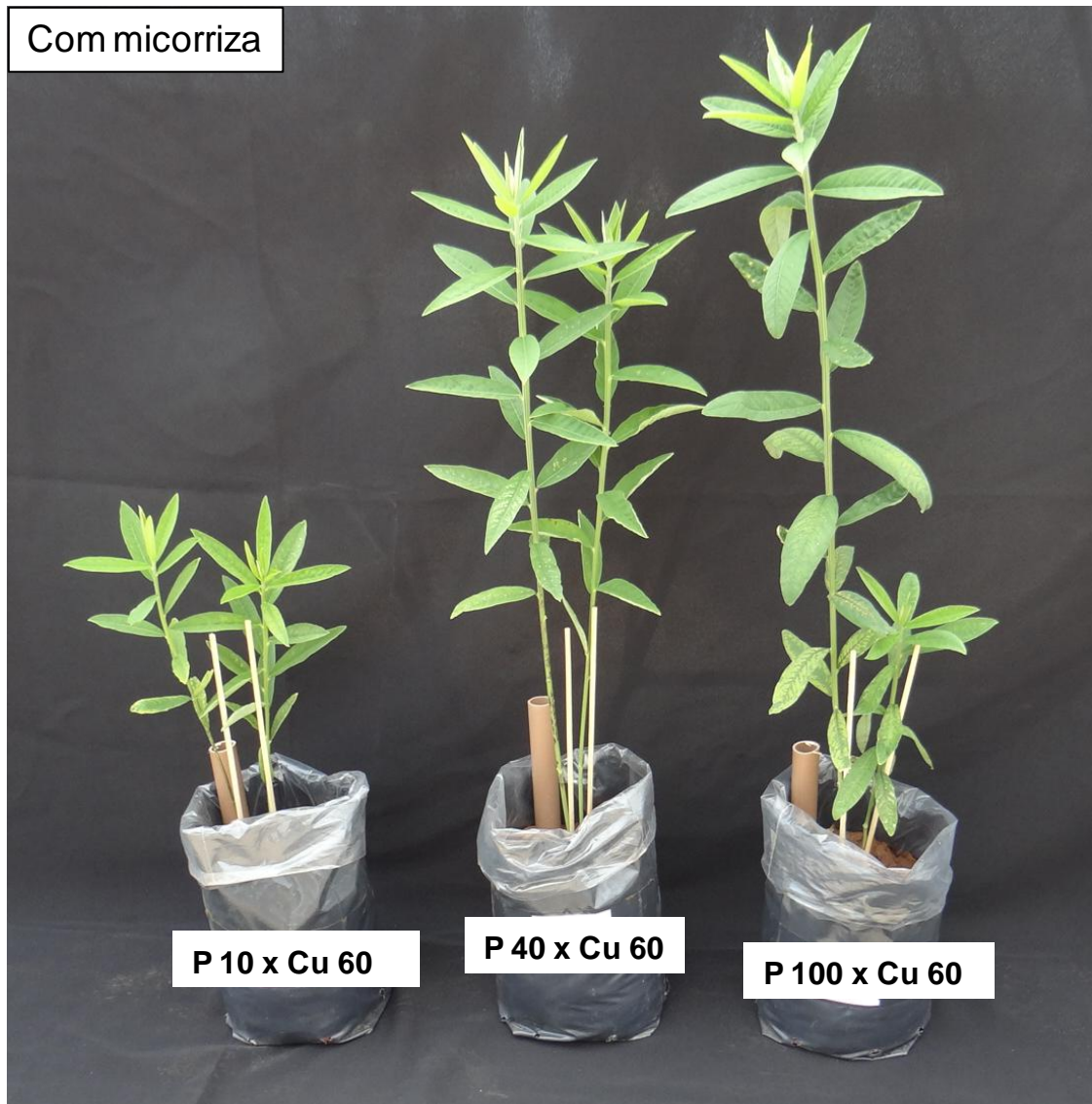
- 1) A realização de mais experimentos utilizando mudas de videiras;
- 2) Verificação da forma em que o P e Cu se encontram nas raízes das plantas;
- 3) Avaliação dos teores de Cu retidos na glomalina.

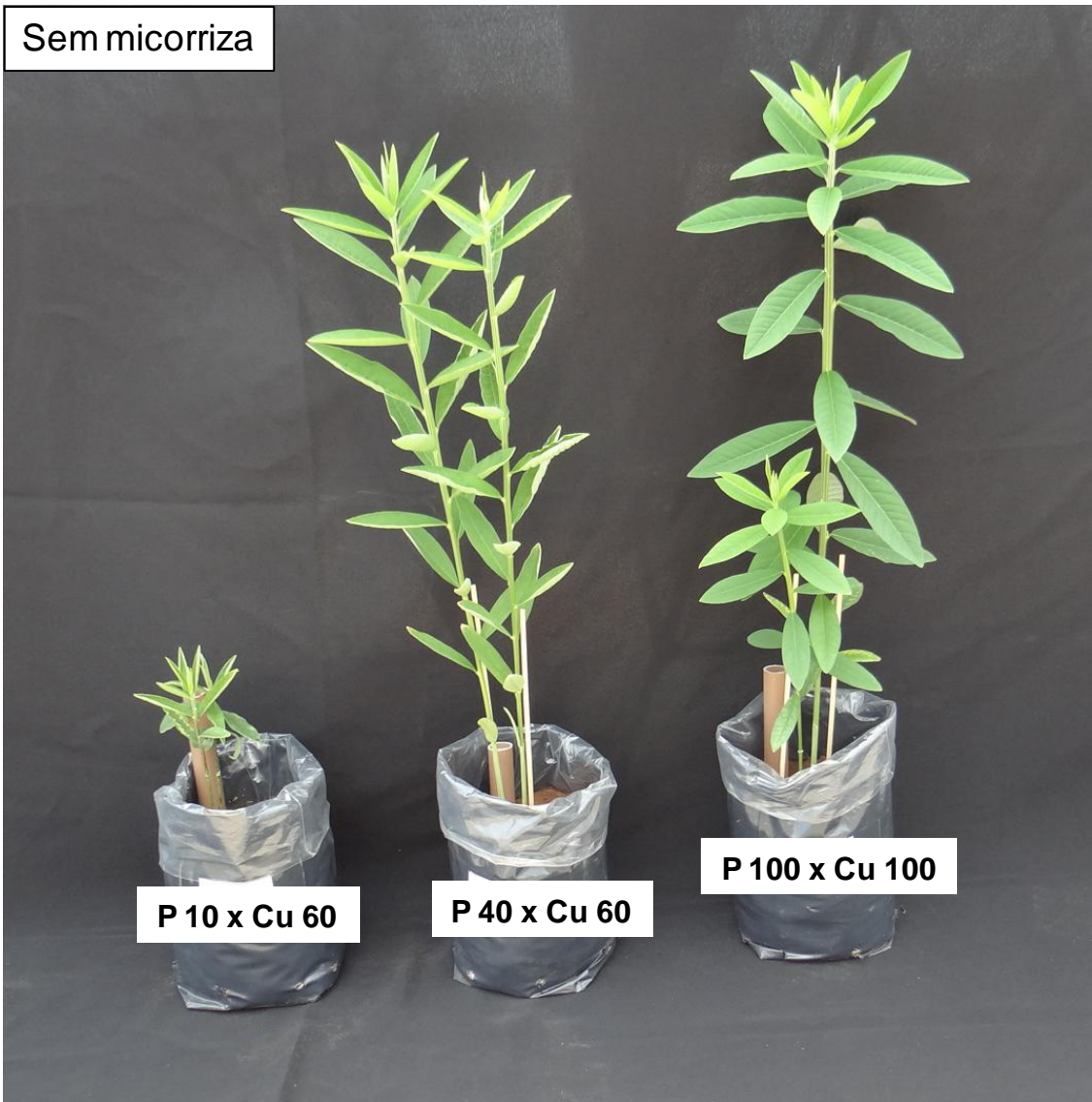
ANEXOS

Anexo1: Crescimento de *Crotalária juncea* com 40 mg Kg^{-1} de P x $0,55 \text{ mg Kg}^{-1}$ de Cu com e sem inoculação de *Rhizophagus clarus*, aos 45 dias de cultivo em casa de vegetação, em um Argissolo Vermelho.

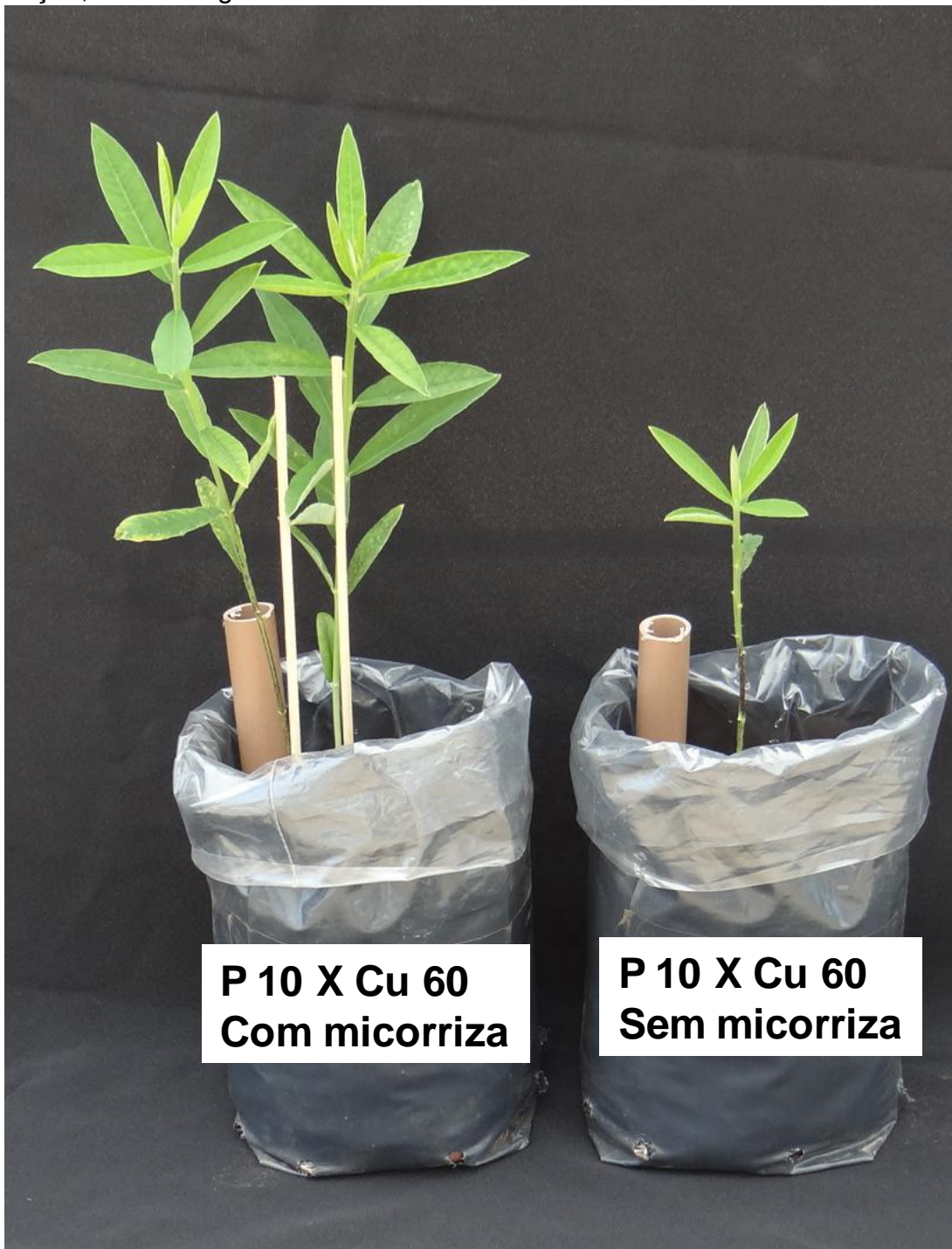


Anexo 2: Crescimento da *Crotalaria juncea* com diferentes teores de P no solo (10, 40 e 100 mg Kg⁻¹ de P) com e sem inoculação de *Rhizophagus clarus*, em solo com teor de 60 mg Kg⁻¹ de Cu, aos 45 dias de cultivo em casa de vegetação, em um Argissolo Vermelho.

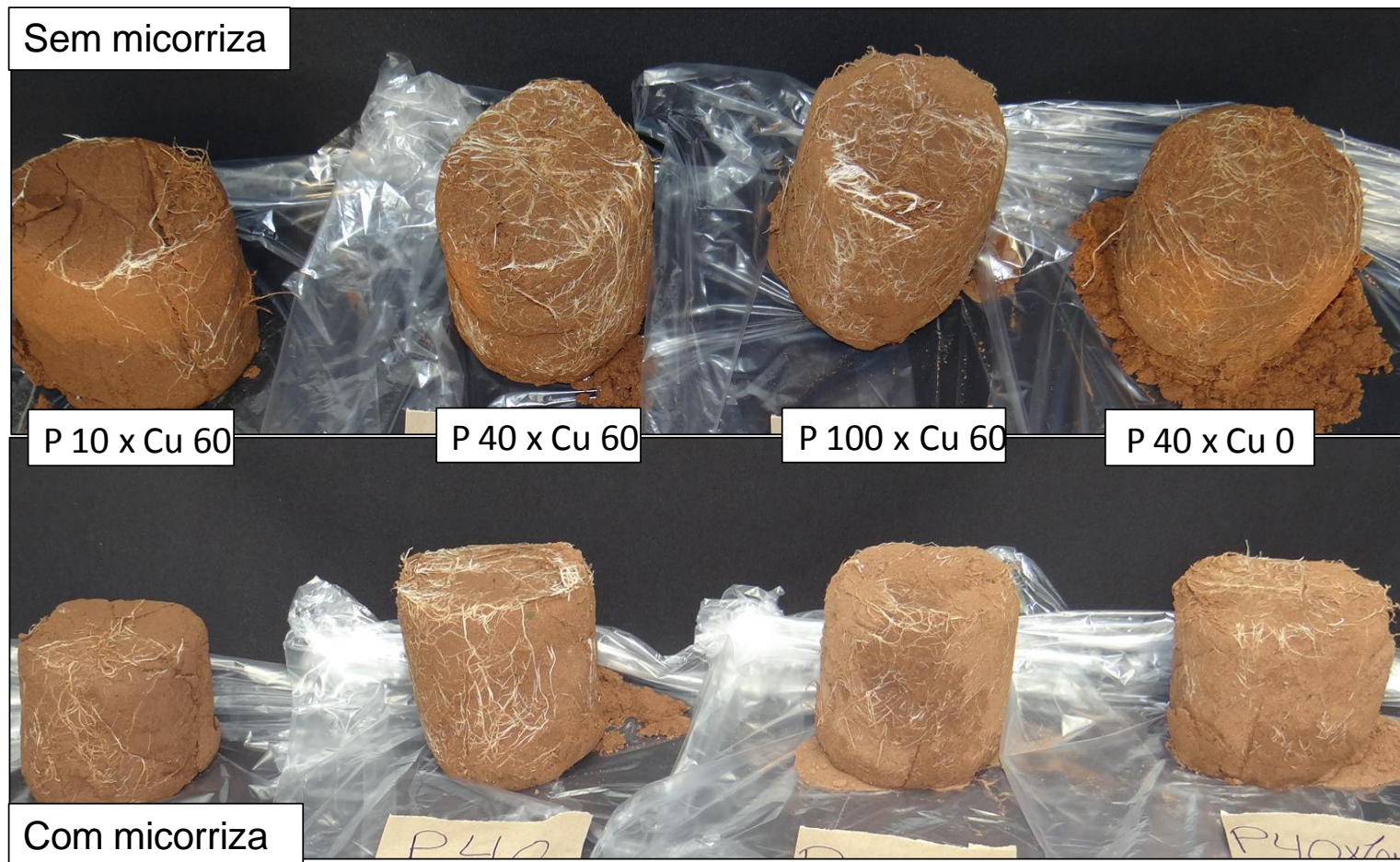




Anexo 3: Crescimento de *Crotalaria juncea* com 10 mg Kg^{-1} de P x $0,55 \text{ mg Kg}^{-1}$ de Cu com e sem inoculação de *Rhizophagus clarus*, aos 45 dias de cultivo em casa de vegetação, em um Argissolo Vermelho.



Anexo 4: Performance do sistema radicular da *Crotalaria juncea* com 45 dias, em vasos de 2,5 Kg em casa de vegetação. Diferentes teores de P, com e sem inoculação de *Rhizophagus clarus*, 60 mg K⁻¹ e de Cu em solo com alto teor de Cu e em teor natural de Cu com 40 mg K⁻¹ de P.



APÊNDICES

APÊNDICE A: ATIVIDADE DE FOSFATASES ÁCIDAS DO SOLO

(Tabatabai & Bremner, 1969)

SOLUÇÕES:

MUB pH 6,5: Em um Becker de 1000 mL, adicionar 12,1 g de TRIS, 11,6 g de ácido maleico, 14 g de ácido cítrico e 6,3 g de ácido bórico. Adicionar 500 mL de NaOH 1 mol l⁻¹ e ajustar o pH para 6,5 com HCl. Transferir para balão volumétrico de 1000 mL e ajustar o volume com água destilada.

p-nitrofenyl fosfato: Adicionar 1,927 g de *p*-nitrofenyl fosfato disódico tetrahidratado em um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com MUB (preparar no momento do uso).

CaCl₂ 0,5 mol l⁻¹: Pesar 55,5 g de cloreto de cálcio, transferir para balão de 1000 mL e completar o volume com água destilada.

NaOH 0,5 mol l⁻¹: Pesar 20,00 g de NaOH, transferir para balão de 1000 mL e completar o volume com água destilada.

Tolueno.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE:

- a) Incubar o solo com umidade equivalente a 80% da capacidade de campo por 30 dias à temperatura ambiente;
- b) pesar 1 g de solo úmido para erlenmeyers de 50 mL com rolha de silicone;
- c) em capela de exaustão, adicionar 1 mL da solução de *p*-nitrofenyl fosfato + 4 mL de MUB + 0,25 mL de tolueno e tampar o erlenmeyer;
- d) incubar por 1 hora a 37 °C no escuro;
- e) adicionar 1 mL de CaCl₂ 0,5 mol l⁻¹ + 4 mL de NaOH 0,5 mol l⁻¹ e agitar manualmente;
- f) filtrar com Whattman 2v;
- g) ler a absorbância no fotolorímetro em 400 nm.

Para regulagem do aparelho, construir uma curva utilizando *p*-nitrofenol (para síntese), e submete-la aos passos "c" a "f", exceto a adição de *p*-nitrofenyl fosfato.

$$\mathbf{p\text{-nitrofenol } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}) = \mathbf{C*V/Ss*Su*t}}$$

onde, C = concentração de *p*-nitrofenol ($\mu\text{g mL}^{-1}$ filtrado);

V = volume da suspensão (em mL);

Ss = quantidade de solo seco incubada;

Su = quantidade de solo úmido utilizada (1 g);

t = tempo de incubação (1 hora).

APÊNDICE B: ATIVIDADE DE FOSFATASES ÁCIDAS NA FOLHA

(Tabaldi et al. 2007)

SOLUÇÕES

Tampão de homogeneização: Em 100 mL de H₂O destilada dissolver 1,21 g de TRIS, 0,0372 g de EDTA, 0,1g de albumina e ajustar o pH para 7,4.

S₁: Em 50 mL de H₂O destilada dissolver 0,1155g de Azida, 0,184g de CaCl₂, 0,93g de EDTA e 14, 71 g de tampão citrato de sódio e calibrar o pH para 5,5.

ATP(30mM): dissolver 0,423 g de ATP em 25 mL de H₂O destilada.

PPi (30mM): dissolver 0,335 g de PPi em 25 mL de H₂O destilada.

Ácido tricloroacético (TCA): pesar 10 g de ácido tricloroacético e diluir em 100 mL de H₂O destilada.

Proteína [1mg/mL]: Pesar 0,005g de Albumina bovina e diluir em 5 mL de H₂O destilada.

Verde para leitura: Em um becker adicionar 100mL de verde, 100 mL de H₂O destilada, 50 mL de molibdato de amônia, e 50 ml de álcool polivinílico. (Adicionar os reagentes nesta ordem e agitar por 25 mim).

Procedimento:

- a) Pesar 1 g de tecido fresco e homogeneizar em 3 mL de tampão de homogeneização;
- b) Filtrar o homogeneizado e centrifugar a 16.000 rpm durante 30 minutos;
- c) Utilizar o S₁ para dosar proteína (deixar na faixa de 0,2-0,4);
- d) Se preciso diluir as amostras com tampão citrato (do tampão de inoculação) (1 mL de tampão + 9 mL de água destilada);

e) Na bancada: para cada amostra= 3 tubos* + 1 controle**

f) Branco: 200 μ L de tampão de inoculação.

* pipetar 160 μ L de tampão de incubação (o restante é colocado somente na incubação).

** pipetar 160 μ L de tampão de inoculação + 20 μ L de água destilada.

INCUBAÇÃO:

Pré-incubação (temperatura= 35 °C): pipetar 20 μ L da proteína nos tubos (menos no branco e nos controles) de 10 em 10 segundos ou de 5 em 5 segundos por 10 minutos.

Incubação: Quando completar os 10 minutos de pré-incubação, pipetar 20 μ L de substrato (PPi) e esperar completar 10 minutos.

g) Depois dos 10 minutos de incubação, parar a reação com TCA 10%;

h) Colorir as amostras com verde previamente feito;

i) ler a absorbância no fotocolorímetro em 630 nm.

APÊNDICE C: COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA (Philips & Hayman, 1970)

SOLUÇÕES

KOH (10%): Dissolver 200 g de hidróxido de potássio em dois litros de água destilada;

HCl (1%): Diluir 20 mL de ácido clorídrico em 2 litros de água;

Solução de glicerol Acidificado: Em um béquer adicionar 500 mL de glicerol, 450 mL de H₂O e 50 mL de HCl 1% (preparado anteriormente);

Azul de Tripán (0,05%): Diluir 0,05 g de azul de tripan em 1 l de glicerol acidificado;

H₂O₂ alcalina: Diluir 3 mL de NH₄OH (20%), 30 mL de H₂O₂ (3%) em 567 mL de H₂O.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE:

1- Clareamento e coloração das raízes:

- a) Lavar as raízes para retirar as partículas de solo várias vezes em água de torneira;
- b) Mergulhe as raízes em solução de KOH 10% a 90 °C por 1 hora ou a 120 °C por 15 minutos em autoclave;
- c) Remova o KOH e lave as raízes em água (1-3 vezes) para remover o excesso de KOH;
- d) Se as raízes forem muito pigmentadas, mergulhar as raízes em solução de H₂O₂ alcalina por 10-30 minutos. Lavar as raízes com água novamente após este processo;
- e) Mergulhar as raízes em solução de HCl 1% por 5 minutos;
- f) Remover o HCl. Não lavar as raízes depois desse processo visto que elas precisam estar acidificadas para uma coloração adequada;

- g) Para a coloração das raízes, colocá-las em solução acidificada de glicerol contendo azul de Tripán a 90 °C por 1 hora ou a 120 °C por 5 minutos;
- h) Descartar a solução corante e aguardar as raízes em solução de glicerol acidificado (sem azul de Tripán) ou em água a temperatura ambiente de 4 °C.

2-Mensuração da colonização micorrízica:

- a) Espalhar as raízes coradas homoganeamente em uma placa de Petri com uma grade de 1,1 cm x 1,1 cm na base;
- b) Na lupa, observar as linhas horizontais e verticais da grade;
- c) Registrar: 1) o número total de intersecções entre as raízes e as linhas da grade e 2) o número de intersecções com raízes micorrizadas (apresentando alguma estrutura dos fungos micorrizicos como vesículas, arbúsculos, hifas e esporos);
- d) A porcentagem de colonização micorrízica (% CM) é dada pela fórmula:

$$\% \text{ CM} = \frac{\text{Número total de intersecções com raízes micorrizadas} \times 100}{\text{Número total de intersecções entre as raízes e a grade}}$$

APÊNDICE D: NÚMERO DE ESPOROS (Gerdeman & Nicolson 1963; Jenkins, 1964)

SOLUÇÕES

Sacarose 50%: Diluir 500g de sacarose em 1 litro de água (pode ser utilizado açúcar cristal em substituição à sacarose)

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE:

- a) Medir 50 mL de solo em béquer de 100 mL;
- b) Suspender a amostra de solo em 1 litro de água em um béquer e agitar vigorosamente, em seguida deixar decantar por alguns segundos para que ocorra sedimentação das partículas maiores e/ou mais densas. (Repetir o processo até a água ficar clara);
- c) Passar o sobrenadante através de um conjunto de peneiras de malha 710 μm a 45 μm , na sequência da maior para a menor;
- d) Nas peneiras ficarão retidos os esporos, solo e material orgânico. Transferir o material retido nas peneiras para tubos de centrifuga ou tubo falcon de 50mL adicionando-se água;
- e) Centrifugar os tubos por 3 minutos à 2500 rpm.;
- f) Após a centrifugação descartar cuidadosamente o sobrenadante;
- g) Adicionar nos tubos a solução de sacarose 50% e agitar com o auxílio de uma espátula;
- h) Centrifugar por 2 minutos à 2500 rpm;
- i) Verter o sobrenadante em peneiras de 45 μm e lavar abundantemente com água corrente e recolher em uma placa para avaliação e contagem;
- j) Com o auxílio de uma lupa realizar a contagem dos esporos.

APÊNDICE E: GLOMALINA TOTAL E FACILMENTE EXTRAÍVEL (Wright & Upadhyaya, 1996)

SOLUÇÕES

Citrato de sódio 50 mM: Dissolver 29,41 g de citrato de sódio em 2 litros de água destilada e ajustar o pH para 8,0;

Citrato de sódio 20 mM: Dissolver 11,764 g de citrato de sódio em 2 litros de água destilada e ajustar o pH para 7,0;

PBS (phosphate buffered saline): Diluir 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄, em 800mL de água destilada. Ajustar o pH para 7,4 e então completar o volume para 1 litro;

BSA (Soro Albumina Bovina): Preparar solução de BSA (Soro Albumina Bovina) 1mg/mL (esta solução deve ser preparada utilizando a solução PBS).

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE:

Extração da Glomalina Total:

- a) Adicionar 1 g de solo em um tubo Falcon dos pequenos (15 mL);
- b) Adicionar 8 mL de citrato de sódio (50 mM; pH 8,0);
- c) Autoclavar por 1 hora a 121 °C;
- d) Centrifugar por 10 minutos a 3.000 rpm (ou mais tempo se for menos rotação);
- e) Reservar o sobrenadante em um recipiente.

OBS: Na mesma amostra de solo repetir este processo por vários ciclos, até que o sobrenadante resultante perca a coloração parda característica da glomalina, isso ocorre por volta de 5 ciclos para solos arenosos, e para solos argilosos com altos teores de matéria orgânica pode chegar a 10 ou mais. Todos os sobrenadantes resultantes dos vários ciclos devem ser reservados em um mesmo recipiente, para

posteriormente medir e anotar o volume de amostra obtida, para posterior cálculo da concentração de glomalina.

Extração da Glomalina facilmente extraível:

- a) Adicionar 1 g de solo em um tubo Falcon dos pequenos (15 mL);
- b) Adicionar 8 mL de citrato de sódio (20 mM; pH 7,0);
- c) Autoclavar por 30 minutos a 121 °C;
- d) Centrifugar por 10 minutos a 3.000 rpm (ou mais tempo se for menos rotação), realizar este processo apenas vez;
- e) Reservar o sobrenadante em um recipiente.

Determinação da glomalina

(Bradford,1976):

f) Preparo da amostra para leitura:

1000 µl de amostra extraída;

1400 µl de solução PBS;

600 µl de reagente de Bradford;

g) Aguardar 5 minutos e proceder a determinação. A determinação é feita através de espectrofotômetro de absorção na absorbância de 595nm em cubeta de quartzo.

h) Fazer a leitura da curva e jogar os dados no excel para obter a equação da curva, como se fosse uma análise de nutriente.

Curva de calibração para leitura:

Tubos	BSA (1mg/mL) (μl)	PBS (μl)	Reagente de Bradford (μl)	μg de proteína
1	0	2400	600	0
2	10	2390	600	10
3	20	2380	600	20
4	30	2370	600	30
5	40	2360	600	40
6	50	2350	600	50
7	60	2340	600	60
8	70	2330	600	70
9	80	2320	600	80
10	90	2310	600	90
11	100	2300	600	100

APÊNDICE F: DIGESTÃO NITROPERCLÓRICA DE TECIDO (Embrapa, 1997)

SOLUÇÕES

Mistura dos ácidos 2/1: Para uma bateria de 40 tubos, adicionar em um béquer 110 mL de ácido nítrico e 55 mL de ácido perclórico.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE:

- a) Pesar a,250g de amostra e colocar em tubos de digestão 50 mL;
- b) Em capela de exaustão, acrescentar a amostra 4 mL da mistura de ácidos (2/1, ácido nítrico/ácido perclórico);
- c) Manter á frio no mínimo 4 horas antes de levar ao aquecimento. De preferencia deixar em repouso de um dia para o outro;
- d) Colocar em bloco digestor com temperatura de 80 °C mantendo assim até que pare de sair fumaça marrom. (ter cuidado nos primeiros 30 minutos pois a amostra pode subir e ficar aderida ao tubo, caso ocorra deve-se realizar agitação casual);
- e) Quando parar de sair fumaça marrom e o tubo clarear, elevar a temperatura para 120 °C;
- f) Quando não tiver mais tecido a ser digerido, aumentar a temperatura para 180 °C;
- g) Esperar evaporar e ter um volume de 1 mL no tubo de digestão;
- h) Retirar as amostras, completar o volume para 10 mL e realizar a leitura.