

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

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM MILHO
CULTIVADO EM SOLO COM ALTO TEOR DE
COBRE E SUBMETIDO À APLICAÇÃO DE ZINCO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tadeu Luis Tiecher

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM MILHO CULTIVADO
EM SOLO COM ALTO TEOR DE COBRE E SUBMETIDO À
APLICAÇÃO DE ZINCO**

Tadeu Luis Tiecher

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Processos Químicos e Ciclagem de Elementos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Ceretta

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**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

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM MILHO CULTIVADO EM SOLO
COM ALTO TEOR DE COBRE E SUBMETIDO À APLICAÇÃO DE
ZINCO**

elaborada por
Tadeu Luis Tiecher

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Alberto Ceretta, Prof. Dr.
(Presidente/Orientador) – CCR – UFSM

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Prof. Dr.
CCR – UFSM

Leônidas Carrijo Azevedo Melo, Prof. Dr.
DS – UFV

Santa Maria, 7 de fevereiro de 2014.

Aos meus pais, Ernani e Singlair

Aos meus irmãos, Tales e Talise

À minha namorada Bárbara

Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao mestre e amigo Carlos Alberto Ceretta, pela orientação desde a iniciação científica, pelos conselhos, confiança e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino superior.

Ao professor Gustavo Brunetto pela orientação e pela ajuda, contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao Pós-Doutorando Paulo Avelar, pelas conversas e pela ajuda na execução de todas as etapas deste trabalho.

Aos ex-Pós Doutorandos, hoje professores, Eduardo Giroto e Alcione Miotto, pelo companheirismo e conversas, as quais levaram à concepção deste trabalho.

A Pós-Doutoranda Hilda, pela paciência, amizade e extrema dedicação na execução das análises bioquímicas.

Ao professor Fernando Teixeira Nicoloso pela colaboração na execução do experimento e pela cessão do laboratório de fisiologia vegetal para a realização das análises.

Aos doutorandos Felipe Lorensini e Cledimar Lourenzi, pela parceria e coleguismo desde a graduação.

Aos bolsistas de iniciação científica Dênis, Renan, Lincon e Adriana pelo auxílio na execução das coletas e análises laboratoriais.

Aos colegas de mestrado Renan Gonzatto, Marco Antônio Lenz Scotto e Lessandro De Conti pela amizade e horas de estudo compartilhadas durante estes dois anos.

Aos colegas de pós-graduação pelas conversas e parceria.

Ao Luiz Francisco Finamor sempre bem humorado e disposto a ajudar.

Aos professores do Departamento de Solos João Kaminski, Danilo Rheinheimer dos Santos, Celso Aita, Leandro da Silva, Sandro Giacomini, José Miguel, Ricardo Dalmolin, Zaida Antonioli, Fabrício Pedron e Rodrigo Jacques, pelas conversas e pelo aprendizado durante o curso.

Aos colegas de laboratório pela convivência e pela amizade criada ao longo desses anos. Agradeço-os pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo desse período.

Ao Héverton, secretário do curso de Pós-graduação, pela dedicação e pela competência com que realizam seu trabalho.

A Vinícola Almadén por ter permitido a coleta de solo em seus vinhedos comerciais.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

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

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM MILHO CULTIVADO EM SOLO COM ALTO TEOR DE COBRE E SUBMETIDO À APLICAÇÃO DE ZINCO

Autor: Tadeu Luis Tiecher
Orientador: Carlos Alberto Ceretta
Data: Santa Maria, 7 de fevereiro de 2014.

Devido ao histórico de aplicação de fungicidas cúpricos em vinhedos, os teores de cobre (Cu) nestes solos podem atingir níveis que causam toxicidade às plantas. Recentemente tem-se buscado produtos alternativos aos cúpricos, com o intuito de reduzir a quantidade de Cu aportado aos vinhedos, os quais geralmente apresentam zinco (Zn) em sua composição. O objetivo foi avaliar se o aumento na concentração de Zn no solo poderia significar toxidez adicional às plantas de milho cultivadas, em um ambiente já contaminado com alto teor de Cu no solo. Em novembro de 2011 o solo foi coletado na camada de 0-15 cm de um vinhedo com alto teor de Cu e em uma área de campo nativo adjacente ao vinhedo, com baixos teores de Cu e Zn, o qual serviu como tratamento controle, sendo que ambos os solos foram classificados como Argissolo Vermelho. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e foi dividido em dois cultivos de milho. O primeiro entre março e abril, e o segundo entre outubro e novembro, ambos no ano de 2012. Os tratamentos foram as doses de 0, 30, 60, 90, 180 e 270 mg kg⁻¹ de Zn adicionadas ao solo de vinhedo, mais o tratamento controle, todos com valores de pH em água e teores de fósforo disponível e potássio trocável semelhantes. Aos 35 dias após a emergência as plantas foram coletadas e o acúmulo de matéria seca de raízes, de parte aérea e a concentração de Cu e Zn nas folhas foram determinados. Foi avaliado também o funcionamento do aparato fotossintético a partir da fluorescência da clorofila *a* e os pigmentos fotossintéticos, parâmetros bioquímicos ligados ao estresse oxidativo nas folhas das plantas, tais como atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e das peroxidases não específicas (POD). Os teores elevados de Cu e Zn no solo causaram toxicidade às plantas de milho e proporcionaram teores foliares acima dos níveis considerados normais nas folhas das plantas, nos dois cultivos. A toxicidade de Zn se evidenciou através da diminuição no crescimento, tanto das raízes, como da parte aérea, bem como pela indução de sintomas de toxicidade e deficiência nos parâmetros fotossintéticos, refletindo na fotoinibição. Além disso, foi observado estresse oxidativo e o sistema antioxidante das plantas de milho não foi suficientemente eficaz para reverter a condição de estresse, especialmente nas plantas cultivadas nos solos que receberam as maiores doses de Zn.

Palavras-chaves: Solos ácidos. Elementos potencialmente tóxicos. Enzimas antioxidantes. Fluorescência da clorofila. Pigmentos fotossintéticos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria

PHYSIOLOGICAL AMENDMENTS IN CORN GROWN IN SOIL WITH HIGH CONTENT OF COPPER AND SUBMITTED TO ZINC APPLICATION

Author: Tadeu Luis Tiecher
Advisor: Carlos Alberto Ceretta
Date: Santa Maria, February 7th, 2014.

Due to the historical application of cupric fungicides in vineyards, the amounts of copper (Cu) in these soils can reach levels that cause toxicity to plants. Recently researchers have tried alternative products to the cupric ones, in order to reduce the amount of Cu applied to the vineyards, which usually shows zinc (Zn) in its composition. This study aimed to evaluate the biochemical and physiological changes in corn plants, grown in soil with a high content of Cu and different levels added of Zn. In November 2011 the soil was collected from the 0-15 cm layer of a vineyard with high Cu content and in an area of native grass adjacent to the vineyard, with low concentrations of Cu and Zn, which served as treatment control, and both soils were classified as Typic Hapludalf. The experiment was performed in a greenhouse and was divided into two corn crops, the first between March and April, and the second between October and November, both in 2012. The treatments were the doses of 0, 30, 60, 90, 180 and 270 mg kg⁻¹ of Zn added to the soil of the vineyard, plus the control treatment. Treatments had pH values in water and levels of available phosphorus and exchangeable potassium similar. At 35 days after emergence the plants were harvested and the accumulation of dry matter from roots and shoots and the concentration of Cu and Zn in leaves were determined. It was also evaluated the operation of the photosynthetic apparatus from the fluorescence of chlorophyll *a* and the photosynthetic pigments, biochemical parameters related to oxidative stress in leaves of plants, such as activity of superoxide dismutase (SOD) and of non-specific peroxidase (POD) were evaluated. The high concentrations of Cu and Zn in soil caused toxicity to corn plants and provided foliar concentrations above the levels considered normal in the leaves, from both cultivations. The Zn toxicity was evidenced by the decrease in the growth of both roots and shoots, as well as the induction of symptoms of toxicity and deficiency in photosynthetic parameters, reflecting photoinhibition. Moreover, it was observed oxidative stress and the antioxidant system of maize plants was not effective enough to reverse the condition of stress, especially in cultivated soils received higher doses of Zn.

Keywords: Acid soil. Potentially toxic elements. Antioxidant enzyme. Chlorophyll fluorescence. Photosynthetic pigments.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da camada 0-15 cm de dois Argissolo Vermelho, um cultivado durante 30 anos com videira e outro oriundo de campo nativo.....37

Tabela 2. Concentração de Cu, Zn e carbono solúvel (mg L^{-1}), matéria orgânica do solo (g kg^{-1}), pH do solo e pH da solução do solo antes do primeiro cultivo e após o segundo cultivo, em solo com a adição de doses de Zn.38

Tabela 3. Fluorescência inicial (F_o), rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico basal do PSII (F_v/F_o), eficiência quântica efetiva do PSII ($Y(II)$), taxa de transporte de elétrons (ETR , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dissipação fotoquímica (qP), e dissipação não fotoquímica (NPQ), em folhas de milho em resposta a adição de doses de Zn durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Produção de matéria seca da parte aérea (a) e raízes (b), do milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).....41
- Figura 2. Concentração total de Zn (a) e concentração total de Cu (b) nas folhas das plantas de milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$)42
- Figura 3. Clorofila *a* (a), clorofila *b* (b) e carotenoides (c), na primeira folha expandida de plantas de milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$)43
- Figura 4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (a) e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) (b), na primeira folha expandida de plantas de milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).....44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM MILHO CULTIVADO EM SOLO COM ALTO TEOR DE COBRE E SUBMETIDO À APLICAÇÃO DE ZINCO	13
2.1 Abstract	13
2.2 Introdução	14
2.3 Material e métodos	16
2.3.1 Caracterização do solo e descrição do experimento.....	16
2.3.2 Extração e análises da solução do solo.....	18
2.3.3 Determinação da produção de matéria seca e concentração total de Cu e Zn nas folhas de milho	18
2.3.4 Determinação da fluorescência da clorofila a.....	19
2.3.5 Determinação dos pigmentos fotossintéticos	19
2.3.6 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidases não específicas (POD).....	20
2.3.7 Análise estatística	21
2.4 Resultados	21
2.4.1 Solução do solo.....	21
2.4.2 Crescimento das plantas de milho	21
2.4.3 Cu e Zn nas folhas das plantas de milho	22
2.4.4 Fluorescência da clorofila.....	23
2.4.5 Pigmentos fotossintéticos	24
2.4.6 Atividade das enzimas antioxidantes.....	25
2.5 Discussão	25
2.6 Conclusões	30
2.7 Referências	31

1 INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul é o maior produtor vitivinícola do Brasil. Neste cenário, a maior e mais tradicional região produtora é a Serra Gaúcha e em segundo plano, porém crescendo em importância, está a região da Campanha Gaúcha, a qual teve o início da sua produção na década de 1970. Este crescimento, em muito se deve ao clima da região mais favorável ao desenvolvimento da cultura da videira, o que tem atraído grandes empresas à região, além de pequenos produtores locais.

Embora o clima da região da Campanha seja mais favorável em relação a Serra Gaúcha, as precipitações pluviométricas ainda podem ser consideradas elevadas para a cultura. Isto obriga os produtores a realizarem aplicações de fungicidas frequentemente, para combater a incidência de doenças, principalmente o míldio (*Plasmopara viticola*). Dentre os fungicidas utilizados, o que apresenta maior custo benefício é a calda bordalesa, a qual contém grandes quantidades de cobre (Cu) que, aliado às sucessivas aplicações, pode ocasionar acúmulo deste elemento no solo. Como geralmente são solos com baixos teores de argila e de matéria orgânica do solo, os quais são os principais sítios para a sorção do Cu, boa parte do Cu que é adicionado via fungicida permanece na solução do solo ou fica em formas disponíveis às plantas. Assim, em poucos anos de cultivo pode-se atingir teores tóxicos às plantas, como já acontece em muitas áreas.

Como a poluição do solo por elementos potencialmente tóxicos (EPTs) pode representar riscos à qualidade do ambiente, o alto teor de Cu nas áreas de produção vitícola tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores. Além da preocupação da comunidade acadêmica, muitos produtores tem reduzido a quantidade de fungicidas à base de Cu aplicada nos vinhedos, buscando o controle de doenças com produtos alternativos à calda bordalesa. Dentre estes, tem tido destaque os fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos, os quais tem apresentado uso crescente nas últimas safras. Contudo, estes produtos apresentam íons de zinco (Zn) nas suas moléculas. Como o número de aplicações dos fungicidas ainda é elevado e trata-se de produtos com ação de contato, é provável que ocorra o acúmulo de Zn no solo ao longo dos contínuos ciclos de produção do vinhedo.

O acúmulo de Cu aliado ao possível acúmulo de Zn no solo pode desencadear diversos fenômenos no solo, alterando a dinâmica dos nutrientes, as espécies encontradas em solução e os teores solúveis dos elementos no solo. Além destas alterações no solo, o aumento das

concentrações destes EPTs pode ocasionar limitações ao desenvolvimento de plantas, dificultar a replantação de vinhedos ou a implantação de novas espécies nestas áreas, além das modificações impostas à microbiota do solo.

Embora existam estudos sobre o efeito do Cu e do Zn, isoladamente, sobre o desenvolvimento das plantas, raramente estes envolvem os dois elementos concomitantemente e, em sua grande maioria, foram realizados em solução nutritiva. Contudo, os EPTs, assim como os nutrientes, quando adicionados ao solo sofrem a influência de diversos fatores químicos e biológicos, os quais podem interferir na maior ou menor disponibilidade dos mesmos às plantas. Como as informações a respeito da interação entre o Cu e o Zn em solos ainda são escassas, torna-se necessário conhecer os efeitos sobre o desenvolvimento das plantas, causados pela adição de Zn em solos de vinhedos com altos teores de Cu.

2 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM MILHO CULTIVADO EM SOLO COM ALTO TEOR DE COBRE E SUBMETIDO À APLICAÇÃO DE ZINCO¹

2.1 Abstract

PHYSIOLOGICAL AMENDMENTS IN CORN GROWN IN SOIL WITH HIGH CONTENT OF COPPER AND SUBMITTED TO ZINC APPLICATION

Due to the historical application of cupric fungicides in vineyards, the amounts of copper (Cu) in these soils can reach levels that cause toxicity to plants. Recently researchers have tried alternative products to the cupric ones, in order to reduce the amount of Cu applied to the vineyards, which usually shows zinc (Zn) in its composition. This study aimed to evaluate the biochemical and physiological changes in corn plants, grown in soil with a high content of Cu and different levels added of Zn. In November 2011 the soil was collected from the 0-15 cm layer of a vineyard with high Cu content and in an area of native grass adjacent to the vineyard, with low concentrations of Cu and Zn, which served as treatment control, and both soils were classified as Typic Hapludalf. The experiment was performed in a greenhouse and was divided into two corn crops, the first between March and April, and the second between October and November, both in 2012. The treatments were the doses of 0, 30, 60, 90, 180 and 270 mg kg⁻¹ of Zn added to the soil of the vineyard, plus the control treatment. Treatments had pH values in water and levels of available phosphorus and exchangeable potassium similar. At 35 days after emergence the plants were harvested and the accumulation of dry matter from roots and shoots and the concentration of Cu and Zn in leaves were determined. It was also evaluated the operation of the photosynthetic apparatus from the fluorescence of chlorophyll a and the photosynthetic pigments, biochemical parameters related to oxidative stress in leaves of plants, such as activity of superoxide dismutase (SOD) and of non-specific peroxidase (POD) were evaluated. The high concentrations of Cu and Zn in soil caused toxicity to corn plants and provided foliar concentrations above the levels considered normal in the leaves, from both cultivations. The Zn toxicity was evidenced by the

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Ecotoxicology and Environmental Safety.

decrease in the growth of both roots and shoots, as well as the induction of symptoms of toxicity and deficiency in photosynthetic parameters, reflecting photoinhibition. Moreover, it was observed oxidative stress and the antioxidant system of maize plants was not effective enough to reverse the condition of stress, especially in cultivated soils received higher doses of Zn.

Keywords: Acid soil, Potentially toxic elements, Antioxidant enzyme, Chlorophyll fluorescence, Photosynthetic pigments.

2.2 Introdução

Os fungicidas cúpricos, como a calda bordalesa [$\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$] e o oxiclreto de cobre (Cu) [$\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu(OH)}_2$], e fungicidas que contém zinco (Zn) na sua composição, como o Mancozeb são aplicados em vinhedos para o controle preventivo de doenças foliares em videiras (Komarek et al., 2010; Mackie et al., 2012; Brunetto et al., 2013). Parte do Cu e do Zn aplicados via fungicidas são depositados na superfície adaxial das folhas, lavados pela água da precipitação e depositados na superfície do solo. Além disso, folhas senescentes e ramos podados contendo Cu e Zn aderidos na sua superfície também são depositados na superfície do solo. Com isso, ao longo dos anos verifica-se incremento dos teores de Cu (Toselli et al., 2009; Fernandez-Calviño et al., 2010; Miotto et al., 2014) e Zn (Fernandez-Calviño et al., 2012; Brunetto et al., 2013) em solos de vinhedos. Depois da erradicação dos vinhedos antigos, as plantas de videira jovens cultivadas nestes solos contaminados com Cu podem demonstrar crescimento reduzido de raízes e parte aérea, clorose foliar e acúmulo de Cu nas raízes (Miotto et al., 2014). Além disso, os exsudatos radiculares das videiras com compostos alelopáticos podem inibir significativamente o crescimento de novas mudas de videira (Guo et al., 2010). Por isso, estes solos podem ser cultivados com culturas anuais como o milho (*Zea mays* L.) durante algumas safras, servindo o milho como um dos agentes do processo de fitorremediação (García et al., 2013), para posteriormente serem novamente incorporados ao sistema de produção de uva.

O Cu e o Zn são micronutrientes essenciais às plantas, pois são parte de componentes e ativadores enzimáticos (Kabata-Pendias, 2011). O Cu em nível celular na planta é um componente estrutural e catalítico de várias proteínas e enzimas que estão envolvidas em

processos metabólicos (Pilon et al., 2006), como na fotossíntese, na respiração, no metabolismo de carboidratos e reprodução (Kabata-Pendias, 2011). Já o Zn, está associado com o metabolismo de carboidratos, regulação da expressão de genes, integridade estrutural do ribossomo e metabolismo de fosfato, além da síntese de enzimas como as desidrogenases, proteinases e peptidases (Cherif et al., 2011; Kabata-Pendias, 2011). Todavia, plantas que crescem em solos que apresentam altos teores de Cu e Zn na solução do solo ou mesmo disponíveis (ex, extração por DTPA), podem acumular elevada quantidade destes elementos metálicos em seus tecidos (Kabata-Pendias, 2011). Este acúmulo pode causar respostas bioquímicas e fisiológicas devido ao efeito tóxico nas plantas, que variam de acordo com a parte da planta, a concentração dos elementos e a tolerância dos tecidos a altos níveis desses elementos (Mateos-Naranjo et al., 2013).

Diversos distúrbios fisiológicos e bioquímicos em plantas são frequentemente associados ao aumento dos teores de Cu e Zn em solos e nas plantas (Cambrollé et al., 2012; Mateos-Naranjo et al., 2013). Isso porque, o Cu participa de diversos processos fisiológicos, já que pode ser encontrado em dois estados de oxidação nas plantas (Yruela, 2005), mas estas mesmas propriedades redox também contribuem para a sua toxicidade (Giroto et al., 2013). Por meio da reação de Fenton, o ciclo redox entre Cu^{2+} e Cu^+ catalisa a produção de radicais hidroxil (OH^\cdot) provenientes de radicais superóxido (O_2^\cdot) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Briat & Lebrun, 1999). Já o Zn, embora seja um elemento que não é capaz de gerar ROS diretamente através da reação de Fenton, ele pode gerar estresse oxidativo através da interferência com o sistema de defesa antioxidante das plantas (Gratão et al., 2005). Assim, a absorção excessiva de Cu e de Zn por plantas pode causar estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre as respostas antioxidantes e o aumento da produção de ROS (Giroto et al., 2013). Neste contexto, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) é essencial para transformar o radical O_2^\cdot em H_2O_2 , enquanto que as peroxidases não específicas removem o excesso de H_2O_2 (Choudhary et al., 2007; Tanyolac et al., 2007). Desta forma, dentre os principais parâmetros bioquímicos afetados pelo estresse oxidativo está a atividade de enzimas, como as peroxidases não específicas (POD) e a superóxido dismutase (SOD) (Li et al., 2006; Jain et al., 2010; Yang et al., 2011; Li et al., 2012).

Depois do alto teor de Cu na planta desencadear as reações oxidativas que ocasionam danos nos tecidos vegetais, normalmente ocorre a inibição do crescimento da planta por interferência em processos celulares importantes, como a permeabilidade da membrana, a estrutura da cromatina, a síntese de proteínas, a atividade de enzimas nos processos de

fotossíntese e respiração (Yruela, 2005; Gratão et al., 2005). Já o aumento do teor de Zn na planta, pode afetar negativamente o aparato fotossintético, reduzindo a eficiência fotossintética das plantas pela inibição da biossíntese de clorofila e diminuição da assimilação de carbono (Chen et al., 2008; Dhir et al., 2008). O excesso de Zn pode ainda reduzir a capacidade de enraizamento e até mesmo causar clorose foliar (Castiglione et al., 2007), o que contribui para a inibição do crescimento das plantas (Giroto et al., 2013). Além disso, a toxicidade de Zn pode afetar negativamente a permeabilidade da membrana, a cadeia de transporte de elétrons (De Magalhães et al., 2004) e a absorção e translocação de nutrientes (Jiang & Wang, 2008; Wang et al., 2009). Portanto, quando ocorre a associação do excesso destes dois elementos no solo, pode ocorrer redução na produção de matéria seca de raízes e parte aérea, alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos e na fluorescência da clorofila *a*. Alguns estudos têm explorado como o Cu ou o Zn, adicionados na forma de solução nutritiva ou em vasos contendo areia, interferem isoladamente em uma variedade de processos fisiológicos das plantas (Di Baccio et al., 2009; Jain et al., 2010; Cambrollé et al., 2012; Mateos-Naranjo et al., 2013), enquanto outros têm explorado os efeitos da interação entre os dois metais pesados, em solução nutritiva, no sistema de defesa antioxidante das plantas (Upadhyay & Panda, 2010). No entanto, há pouca informação na literatura sobre os efeitos da interação entre o Cu e o Zn no solo e seus efeitos sobre as plantas que ali se desenvolvem.

O objetivo foi avaliar se o aumento na concentração de Zn no solo poderia significar toxidez adicional às plantas de milho, cultivadas em um ambiente já contaminado com alto teor de Cu no solo.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Caracterização do solo e descrição do experimento

O estudo foi realizado usando solo coletado em um vinhedo com 30 anos de cultivo, localizado em Santana do Livramento, região da Campanha Gaúcha, Estado do Rio Grande do Sul (RS), região Sul do Brasil. O clima da região é subtropical, Cfa (classificação de Köppen) com a temperatura média anual de 18,2 °C e precipitação média anual de 1.388 mm ano⁻¹, distribuída de forma similar em todos os meses do ano (IPAGRO, 1989). Embora no verão

(dezembro até março) o clima é mais seco por causa da maior evapotranspiração. Precipitações relativamente frequentes ocorrem durante todo o ciclo vegetativo das videiras, as quais exigem aplicações contínuas de fungicidas que contém Cu e Zn para o controle preventivo de doenças fúngicas foliares.

Em novembro de 2011 o solo foi coletado na camada de 0-15 cm de um vinhedo com alto teor de Cu e em uma área de campo nativo (CN) adjacente ao vinhedo, com baixos teores de Cu e Zn, o qual serviu como tratamento controle. Os dois solos foram classificados como Argissolo Vermelho, sendo suas características apresentadas na Tabela 1. O solo foi seco ao ar e passado em uma peneira com malha de 2 mm. Dois quilogramas de solo foram adicionados em cada vaso com capacidade de 3 kg. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com três repetições em cada tratamento. Os tratamentos foram doses de 0, 30, 60, 90, 180 e 270 mg kg⁻¹ de Zn adicionadas no solo de vinhedo, contendo alto teor de Cu, mais o tratamento adicional (controle), com baixos teores de Cu e Zn, o qual teve os teores de P disponível, K trocável e pH corrigidos para que atingissem valores próximos aos do solo do vinhedo.

O Zn foi adicionado no solo na forma de solução contendo ZnSO₄.7H₂O (60%) e ZnCl₂ (40%). A solução que continha Zn foi diluída em água destilada para obtenção de um volume final de 200 mL. A solução foi então aplicada, misturada manualmente ao solo e este acondicionado nos vasos. O solo foi incubado em casa de vegetação por 30 dias, com reposição da água evaporada a cada 2 dias, para manter a umidade a 80% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA). Depois do período de incubação, foram adicionadas 4 sementes de milho em cada vaso, sendo removida uma plântula por vaso 5 dias após a germinação. Ao longo do cultivo foi adicionada água destilada diariamente, para manter a umidade do solo a 80% da CRMA. Aos 15 dias após a emergência (DAE) foi realizada a aplicação de nitrogênio (N), usando uma solução contendo água destilada e ureia [(NH₂)₂CO], perfazendo um total de 50 mg kg⁻¹ de N no solo.

Após o término do primeiro cultivo, em maio de 2012, foram aplicados 100 mg kg⁻¹ de K na forma de solução, usando o KCl como fonte de K. A solução foi aplicada sobre a superfície dos vasos e, em seguida, foi aplicada água destilada. Logo depois, o solo foi revolvido manualmente. Após a reposição do K, a cada 2 dias adicionou-se água destilada para manter o solo a 80% da CRMA até outubro de 2012. Neste mês, um novo cultivo foi realizado com manejo idêntico ao relatado para o primeiro cultivo.

2.3.2 Extração e análises da solução do solo

Antes do primeiro cultivo e após o segundo cultivo do milho foi coletado aproximadamente 0,7 kg de solo úmido em cada vaso do experimento. O solo foi seco ao ar e 0,5 kg de solo seco foi pesado para a extração da solução do solo. A técnica utilizada foi a da pasta de saturação do solo, sendo adicionada água destilada até atingir a saturação do solo (aproximadamente 100 mL). A suspensão permaneceu em descanso por 16 h até atingir o equilíbrio solo-solução. Após este período, o solo foi acondicionado em funis de Büchner, de 20 cm de diâmetro, com filtro de papel no fundo. Com o auxílio de um frasco de sucção (Kitassato) com o funil acoplado e uma bomba de sucção, foi extraída a solução do solo. Logo após este procedimento foi realizada a leitura do pH na solução do solo. Imediatamente as amostras foram filtradas (0,22 μm) e foram determinados os teores de carbono orgânico solúvel total (C solúvel) (Silva & Bohnen, 2001) e os teores totais de Cu e Zn na solução do solo, em Espectrômetro de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP Perkin-Elmer). Após a extração da solução, o solo foi realocado nos vasos para o cultivo seguinte.

2.3.3 Determinação da produção de matéria seca e concentração total de Cu e Zn nas folhas de milho

Nos dois cultivos de milho, aos 35 dias após a emergência (DAE), as plantas foram coletadas e divididas em parte aérea e raízes. As raízes foram separadas do solo manualmente e lavadas com EDTA 0,02 mol L⁻¹. A parte aérea foi cortada rente à superfície do solo e uma amostra de folhas foi imediatamente acondicionada em N₂ líquido, para posteriormente ser armazenada em ultra freezer, a -80 °C, até o momento das análises bioquímicas. O restante das amostras de folhas e as raízes foram secas em estufa com ar forçado a ± 65 °C, até atingirem massa constante. Determinou-se a matéria seca acumulada nas raízes e parte aérea das plantas, utilizando-se uma balança de precisão. A matéria seca das folhas e das raízes foi moída em moinho Wiley. A concentração total de Cu e Zn, nas folhas e nas raízes, foi determinada após a digestão dos tecidos secos em forno tipo mufla. As amostras foram calcinadas a 500-550 °C durante 3 h e as cinzas obtidas foram diluídas em HNO₃ 1 mol L⁻¹. Determinou-se o total de Cu e Zn nas amostras obtidas, em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA) (Embrapa, 1997).

2.3.4 Determinação da fluorescência da clorofila *a*

Aos 30 DAE foi realizada a análise da fluorescência da clorofila *a* usando um fluorômetro de pulso modulado JUNIOR-PAM (Walz, Alemanha). A leitura da fluorescência foi realizada na primeira folha completamente expandida em três plantas por tratamento, no período entre as 8:00 e 9:30 h. Antes das medições, as folhas foram pré-adaptadas ao escuro pelo período de 30 minutos para a determinação da fluorescência inicial (F_0), e posteriormente a amostra foi submetida a um pulso de luz saturante ($10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 0,6 s, determinando-se assim a fluorescência máxima (F_m). Determinou-se através da curva de indução o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), a taxa de transporte de elétrons (ETR), a dissipação fotoquímica (q_P) e não fotoquímica (q_N e NPQ), e a eficiência quântica efetiva do PSII ($Y(II)$).

2.3.5 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Aos 35 DAE, durante a coleta das plantas as folhas, onde foi realizada a determinação da fluorescência da clorofila *a*, foram coletadas e reservadas para a análise dos pigmentos fotossintéticos. Em seguida, as folhas foram congeladas em N_2 líquido e armazenadas a -80°C . Depois, as concentrações de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenóides foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Hendry & Price (1993). Foram utilizadas três repetições por tratamento, sendo que 0,5 g de matéria fresca de folhas foram maceradas com N_2 líquido, homogeneizadas em 5 mL de acetona a 80%, transferidas para tubos tipo falcon de 15 mL, os quais foram centrifugados a 4000 g por 4 minutos a 25°C . Depois foi determinada a absorvância do sobrenadante a 480, 645 e 663 nm, para determinação das concentrações de Chl *a*, Chl *b* e carotenóides usando espectrofotômetro modelo SF325NM (Bel Engineering, Itália), sendo a concentração dos pigmentos calculada de acordo com a metodologia de Lichtenthaler (1987).

2.3.6 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidases não específicas (POD)

A data e os procedimentos de coleta das plantas e a armazenagem das amostras de plantas para a determinação das enzimas SOD e POD foram idênticos aos realizados para a determinação dos pigmentos fotossintéticos. O extrato enzimático bruto foi obtido a partir de 0,5 g de tecido foliar fresco, macerado com N₂ líquido e homogeneizado com 5,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo EDTA 1,0 mM, DTT 3,0 mM e 2% de PVPP (m/v) (Azevedo et al., 1998). O homogenato foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. Alíquotas de 0,5 mL foram estocadas em freezer a -80 °C até o momento da quantificação das enzimas e proteína total. A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm, como descrito por Bradford (1976), usando BSA como padrão.

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico, descrito por Giannopolitis & Ries (1977). A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, riboflavina 8 µM, nitroblue tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM, e 50 µL de extrato enzimático. A produção fotoquímica da formazana azul a partir do NBT foi monitorada pelo incremento da absorvância a 560 nm. A reação foi realizada em tubos de ensaio a 25 °C, dentro de uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Como controle, tubos com a mistura de reação foram mantidos no escuro. A reação teve início com a ligação da luz e após 20 minutos de iluminação a reação foi paralisada, desligando-se a luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do NBT em 50% (Beauchamp & Fridovich, 1971).

A atividade das peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) não específicas presentes no extrato foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol 15 mM e 1,0 mL de H₂O₂ 3 mM. Após a homogeneização dessa solução foi adicionado 50 µL de extrato. A oxidação do guaiacol (a tetraguaiacol) foi medida através do aumento na absorvância a 470 nm. Os resultados foram expressos em $\eta \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína, utilizando para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehly, 1955).

2.3.7 Análise estatística

Todos os resultados 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 das doses de Zn foram significativos ($P < 0,05$) pelo teste de F, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) (Scott & Knott, 1974). Além disso, através do teste F, obteve-se a significância do contraste entre as doses de Zn e o tratamento controle e, quando significativo, as médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

2.4 Resultados

2.4.1 Solução do solo

No primeiro cultivo o teor de Zn solúvel aumentou conforme o incremento das doses de Zn adicionadas ao solo (Tabela 2). Já os valores de pH e os teores de C solúvel e Cu na solução do solo foram similares nos tratamentos com alto teor de Cu e com a adição de doses de Zn. No segundo cultivo, os teores de Cu e C solúvel no solo, além dos valores de pH da solução do solo foram semelhantes entre os tratamentos, enquanto os teores de Zn solúvel no solo aumentaram conforme o aumento das doses de Zn aplicadas no solo. No segundo cultivo, observou-se maiores valores de pH da solução do solo em todos os tratamentos, comparativamente ao primeiro cultivo. Da mesma forma, os teores de Zn observados na solução do solo do segundo cultivo também foram maiores em relação ao primeiro cultivo, sendo que na dose de 270 mg kg^{-1} de Zn o teor de Zn na solução foi 2,88 vezes maior no segundo cultivo em relação ao primeiro cultivo. Já os teores de Cu e C solúveis diminuíram em todos os tratamentos no segundo cultivo em relação ao primeiro.

2.4.2 Crescimento das plantas de milho

No primeiro cultivo, a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho foi semelhante entre o controle e as plantas que cresceram nos solos que receberam 0 e 60 mg

kg^{-1} de Zn, e maior nas plantas do tratamento com a adição de 30 mg kg^{-1} de Zn (Figura 1). Pode-se observar neste cultivo que a adição de 30 mg kg^{-1} de Zn ao solo com alto teor de Cu proporcionou incremento de 356% na produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho em relação ao tratamento que recebeu a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn. Já a produção de matéria seca de raízes foi maior nas plantas cultivadas no tratamento controle, em relação às plantas cultivadas no solo de vinhedo e com a adição de doses de Zn. Quando comparados os tratamentos com solo oriundo do vinhedo, foi observado que a maior produção de matéria seca de raízes foi obtida com a adição de 30 mg kg^{-1} de Zn no solo, o que proporcionou um incremento na produção de matéria seca das raízes de 320%, em relação ao tratamento que recebeu 270 mg kg^{-1} de Zn.

No segundo cultivo do milho, observou-se uma grande redução na produção da matéria seca da parte aérea e das raízes, nos tratamentos com solo do vinhedo, em relação ao controle. Neste cultivo, dentre os tratamentos com solo oriundo do vinhedo, as plantas que cresceram no solo do tratamento sem a adição de Zn apresentaram a maior produção de matéria seca de parte aérea, sendo esta 468% maior em relação as plantas do tratamento onde foi adicionado 270 mg kg^{-1} de Zn. Já a produção de matéria seca de raízes foi 250% maior nas plantas do tratamento sem a adição de Zn, em relação as plantas que se desenvolveram no solo onde foi adicionado 270 mg kg^{-1} de Zn.

Nos dois cultivos, foi observado decréscimo na produção de matéria seca das raízes com o aumento da dose de Zn no solo. Quando comparada a produção de matéria seca da parte aérea e das raízes das plantas de milho, nos tratamentos com a adição de doses de Zn, foi observada redução no desenvolvimento das plantas no segundo cultivo, enquanto no controle, sem adição de Cu e Zn, a produção manteve-se semelhante entre os cultivos.

2.4.3 Cu e Zn nas folhas das plantas de milho

No primeiro cultivo, as menores concentrações de Zn foram observadas nas folhas das plantas do tratamento controle (Figura 2). Neste cultivo o teor de Zn nas folhas das plantas cultivadas no solo sem adição de Zn foi 20,7 vezes menor que o teor das plantas cultivadas no solo com adição de 270 mg kg^{-1} de Zn. Já o teor de Cu nas folhas das plantas de milho manteve-se abaixo dos 20 mg kg^{-1} de matéria seca, em todos os tratamentos. Entretanto, apenas as plantas cultivadas no solo com a adição de 180 mg kg^{-1} de Zn apresentaram teor de Cu nas folhas maior que os demais tratamentos.

No segundo cultivo, os teores de Zn nas folhas das plantas que cresceram no solo sem aplicação de Zn foram 11,9 vezes menores do que nas plantas do tratamento onde foi aplicado a maior dose de Zn. Já os maiores teores de Cu neste cultivo, foram observados nas folhas das plantas cultivadas no solo sem adição de Zn, permanecendo iguais nos demais tratamentos.

Em ambos os cultivos, os menores teores de Cu foram observados nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle. Os teores de Cu nas folhas das plantas do segundo cultivo foram superiores aos observados no primeiro cultivo. Isto foi evidente nas plantas cultivadas no solo sem adição de Zn, onde os teores de Cu foram 3,8 vezes maiores do que o observado nas plantas deste mesmo tratamento no primeiro cultivo. Pode ser observado ainda que nos dois cultivos as concentrações de Zn nas folhas aumentaram com o incremento das doses de Zn aplicadas no solo. Além disso, no primeiro cultivo os teores de Zn nas folhas foram inferiores em relação ao segundo cultivo.

2.4.4 Fluorescência da clorofila

Os valores de fluorescência inicial (F_o) foram inferiores nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle, em relação aos demais tratamentos no primeiro cultivo (Tabela 3). Porém, os valores de rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) foram maiores nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle, comparativamente, aos valores obtidos nas plantas cultivadas nos demais tratamentos. As folhas das plantas de milho cultivadas no tratamento com a maior dose de Zn, apresentaram aumento da F_o e redução da razão F_v/F_m , em relação aos demais tratamentos, no primeiro cultivo. Por outro lado, a razão F_v/F_o , os parâmetros eficiência quântica efetiva do PSII ($Y(II)$) e taxa de transporte de elétrons (ETR) não apresentaram diferenças entre as plantas cultivadas nos diferentes tratamentos no primeiro cultivo. Além disso, observou-se que os valores de F_v/F_o , $Y(II)$ e ETR verificados nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle, foram maiores do que aqueles observados nos demais tratamentos. Ainda no primeiro cultivo, os valores da dissipação fotoquímica (q_P) foram menores nas folhas das plantas cultivadas no solo sem a adição de Zn e com a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn, enquanto os valores da dissipação não fotoquímica (NPQ) nas folhas de milho não diferiram ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

No segundo cultivo, os valores de F_o foram inferiores nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle. Já as folhas das plantas de milho cultivadas no tratamento com a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn, apresentaram aumento da F_o e redução da razão F_v/F_m , em relação aos

demais tratamentos, neste mesmo cultivo. A razão F_v/F_o observada nas folhas das plantas do controle, no segundo cultivo, foi maior que a apresentada pelos demais tratamentos. Dentre os tratamentos com solo do vinhedo, as folhas das plantas de milho cultivadas no solo com as doses de 0, 30 e 60 mg kg^{-1} de Zn, apresentaram os maiores valores da razão F_v/F_o , não diferindo entre si ($P < 0,05$). Por outro lado, nas folhas das plantas do tratamento 270 mg kg^{-1} de Zn, esta razão foi a menor dentre todos os tratamentos. No segundo cultivo, a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn apresentaram valores menores de Y(II) e ETR, em relação as folhas das plantas cultivadas no solo dos demais tratamentos. Já as folhas das plantas cultivadas no solo do controle apresentaram valores de Y(II) e ETR semelhantes aos tratamentos com as doses 0, 30, 60, 90 e 180 mg kg^{-1} de Zn. Neste segundo cultivo os valores de qP nas folhas de milho não diferiram ($P < 0,05$) entre os tratamentos, enquanto os valores de NPQ foram menores nas folhas das plantas cultivadas no solo com a adição de 0, 30 e 60 mg kg^{-1} de Zn.

Quando comparados os dois cultivos, observa-se que a variável F_o nas plantas de milho do primeiro cultivo apresentou valores superiores aos do segundo cultivo em todas as plantas que cresceram no solo oriundo de vinhedo. Já as variáveis F_v/F_m , Y(II), ETR e qP apresentaram valores semelhantes entre os dois cultivos. Os valores de qP nos dois cultivos, foram semelhantes também entre o controle e os demais tratamentos. Nos dois cultivos, observou-se decréscimo na razão F_v/F_m nas folhas das plantas de milho com o aumento das doses de Zn aplicadas no solo do vinhedo. Por outro lado, houve incremento dos valores de NPQ nas folhas das plantas de milho, com o aumento das doses de Zn aplicadas no solo, sendo verificado o menor valor de NPQ nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle nos dois cultivos.

2.4.5 Pigmentos fotossintéticos

No primeiro cultivo, os teores de Chl *a*, Chl *b* e carotenóides nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle foram semelhantes àqueles observados nas folhas das plantas cultivadas nos demais tratamentos (Figura 3). Os teores de Chl *a* e Chl *b* observados nas folhas das plantas cultivadas nos solos que receberam as doses de 30, 60, 90 e 180 mg kg^{-1} de Zn foram superiores aos verificados nas plantas do solo com a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn, que por sua vez foi maior do que o observado nas plantas cultivadas no solo sem a adição de Zn. Da mesma forma, os teores de carotenoides observados nas folhas das plantas cultivadas nos solos que receberam as doses de 30, 60, 90 e 180 mg kg^{-1} de Zn foram superiores aos

verificados nas plantas do solo sem a adição de Zn e com a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn, que por sua vez não diferiram entre si ($P < 0,05$). Por outro lado, no segundo cultivo os teores dos pigmentos fotossintéticos analisados não foram diferentes entre os tratamentos. Os teores de Chl *a*, Chl *b* e carotenóides nas folhas das plantas da dose 0 mg kg^{-1} de Zn apresentaram incremento no segundo cultivo em relação ao primeiro cultivo.

2.4.6 Atividade das enzimas antioxidantes

No primeiro cultivo, a atividade da SOD nas folhas demonstrou-se alterada, sendo a atividade da SOD maior nas folhas das plantas cultivadas no solo do tratamento com a adição de 30 mg kg^{-1} de Zn (Figura 4). Já os menores valores da atividade da SOD foram observados nas folhas das plantas cultivadas no solo com a maior dose de Zn. A atividade da POD, embora tenha apresentado diferença entre os tratamentos, ficou em patamares baixos, sendo a maior atividade observada no tratamento sem a adição de Zn, enquanto os tratamentos que receberam as doses de 90 e 270 mg kg^{-1} de Zn apresentaram as menores atividades. Por outro lado, no segundo cultivo de milho, não foi observada diferença ($P < 0,05$) tanto na atividade da SOD, quanto da POD.

No primeiro cultivo a atividade da SOD foi aumentada nos tratamentos sem adição de Zn e com a adição de 30 e 60 mg kg^{-1} de Zn quando comparado com o tratamento controle, enquanto para os demais tratamentos a atividade foi semelhante. Já a atividade da SOD no segundo cultivo e da POD nos dois cultivos, nas folhas das plantas cultivadas nos tratamentos com solo oriundo de vinhedo, foi semelhante à observada nas folhas das plantas cultivadas no solo do controle. Quando comparada a atividade das enzimas SOD e POD entre os dois cultivos, foi observada uma elevada atividade da enzima SOD nas folhas das plantas de milho cultivadas no primeiro cultivo e baixa atividade nas folhas das plantas de milho cultivadas no segundo cultivo, enquanto a atividade da enzima POD nas folhas das plantas de milho foi baixa no primeiro cultivo e elevada no segundo cultivo.

2.5 Discussão

Os teores de Cu na solução do solo foram baixos, em relação aos teores de Zn, devido a sua alta reatividade com os grupos funcionais, sobretudo aqueles da matéria orgânica do

solo (Croué et al., 2003). Neste sentido, a manutenção dos teores de matéria orgânica do solo (MOS) nos solos dos vinhedos é muito importante para a redução da disponibilidade do Cu. Nos solos do vinhedo estudado neste trabalho, as técnicas de manejo dos solos adotadas a partir da década de 1990, como a introdução de plantas de cobertura nos vinhedos, juntamente com as folhas e restos de podas das videiras, contribuíram para aumentar o aporte de material orgânico ao solo. Isto interferiu diretamente na redução da disponibilidade observada principalmente nos teores solúveis de Cu no solo, já que o EDTA extraiu quantidades significativas de Cu em todos os tratamentos (dados não demonstrados). Já o Zn apresentou comportamento diferente do Cu, sendo que, uma fração do elemento tende a permanecer na solução do solo na forma livre ou em pares iônicos solúveis (Citeau et al., 2003), mas também na fração trocável (Tiecher et al., 2013), ou seja, permanece em formas lábeis no solo. Devido a isto, tanto os teores solúveis de Zn, como os teores de Zn disponível, extraído com EDTA, apresentaram aumento de acordo com a quantidade de Zn adicionada ao solo. Em estudo de adsorção de Zn em um Cambissolo Háplico (Andic Haplumbrept), Perez-Novo et al. (2011) atribuíram o aumento da adsorção de Zn no solo aos seus maiores teores de óxidos de ferro e argila em relação a outro Cambissolo Háplico (Typic Haplumbrept). Como os teores de óxidos de ferro e argila do solo do presente estudo eram bastante baixos, isto pode ter contribuído com os elevados teores solúveis de Zn no solo. Desta forma, os teores de Zn observados na solução do solo foram altos se comparados aos teores de Cu na solução do solo.

A maior produção de matéria seca de raízes e da parte aérea das plantas de milho cultivadas no solo com a adição de 30 mg kg^{-1} de Zn, observadas no primeiro cultivo deste estudo, pode ter ocorrido porque as concentrações de Zn livre na solução do solo deste tratamento foram baixas, pois parte do elemento deve ter sido adsorvida aos grupos funcionais mais reativos do solo, especialmente a MOS (Croué et al., 2003). Como os processos de adsorção do Cu e do Zn podem ser afetados pela presença de outras espécies na solução do solo, como foi demonstrado em estudos em que os solos foram tratados simultaneamente com Cu e Zn (Arias et al., 2006), a baixa concentração de Zn na solução do solo do tratamento com a adição de 30 mg kg^{-1} de Zn, pode ter contribuído para reduzir a atividade do Cu na solução do solo, reduzindo sua toxidez às plantas. Por outro lado, nas doses mais elevadas de Zn no solo, a quantidade do elemento em solução pode ter sido muito alta e ocasionado toxidez às plantas. Efeito similar foi encontrado por Cherif et al. (2011) em plantas de tomateiro submetidas a doses de Cd e Zn.

A redução na produção de matéria seca das raízes e parte aérea das plantas no segundo cultivo pode ter ocorrido principalmente em função do aumento, em relação ao primeiro cultivo, nos teores de Zn na solução do solo. Isto se deve, principalmente, pela elevada degradação do C orgânico solúvel, que contribuiu para a solubilização do Zn, visto que a biodisponibilidade de tais elementos na solução do solo é altamente dependente da espécie de metal, do pH, e da presença de C orgânico solúvel e outros íons na solução do solo (Sauvé et al., 1997). A inibição do alongamento e divisão celular causada pela elevada concentração de Cu na solução do solo e pelo aumento da concentração de Zn solúvel, observados principalmente nos solos com a adição de 90, 180 e 270 mg kg⁻¹ de Zn no primeiro cultivo e nos tratamentos com a adição de 30, 60, 90, 180 e 270 mg kg⁻¹ de Zn do segundo cultivo, pode ajudar a explicar a redução na produção de matéria seca (Hewit, 1983; Arduini et al., 1994; Jain et al., 2010). Além disso, o efeito tóxico pode ser atribuído à acumulação de Zn nas folhas (Cherif et al., 2011), principalmente dos tratamentos que receberam as maiores doses de Zn. Isto porque, o Zn em quantidade excessiva nas plantas, pode afetar a homeostase iônica normal, por interferir na absorção, transporte e regulação de íons essenciais (Wang et al., 2009), resultando na ruptura dos processos metabólicos, tais como a transpiração e fotossíntese, responsáveis pela redução do crescimento (Sagardoy et al., 2009). O Zn pode ainda ocasionar sintomas como clorose, principalmente nas folhas novas, e redução no crescimento da planta, os quais são sintomas comuns de toxicidade de Zn (Marschner, 1995; Kabata-Pendias, 2011), sendo que ambos os sintomas foram observados nas plantas de milho do presente estudo, especialmente no solo que recebeu a adição de 270 mg kg⁻¹ de Zn.

Os teores de Zn nas folhas aumentaram com o aumento das doses de Zn no solo, como já foi observado em outros trabalhos com diferentes espécies de plantas (Jain et al., 2010; Yang et al., 2011; Cambrollé et al., 2012). Em espécies sensíveis, teores foliares entre 15-20 e 150-200 mg kg⁻¹ de Cu e Zn, respectivamente, são observadas reduções no crescimento das plantas (Kloke et al., 1984; Kabata-Pendias, 2011). No primeiro cultivo deste estudo, apenas os teores de Zn dos tratamentos 90, 180 e 270 mg kg⁻¹ de Zn as plantas de milho apresentaram teor acima de 200 mg kg⁻¹ de Zn nas folhas. Já no segundo cultivo, nos tratamentos que receberam a adição de 0, 30, 60, 90, 180 e 270 mg kg⁻¹ de Zn, os teores foliares de Cu e Zn foram maiores do que 20 e 200 mg kg⁻¹, respectivamente. As plantas cultivadas no solo que recebeu a maior dose de Zn (270 mg kg⁻¹ de Zn), apresentou teores próximos a 3000 mg kg⁻¹, superiores aos encontrados por Cambrollé et al. (2012), em folhas de *Halimione portulacoides*, espécie altamente tolerante a altas doses de Zn. Isto pode ter ocorrido

principalmente por causa do aumento da concentração de Zn na solução do solo no segundo cultivo.

Como a concentração de metais no solo é dependente também da atividade microbiana do solo (Marschner, 1995), a intensa atividade dos microrganismos no solo pode ter degradado parte do C orgânico solúvel no solo, no período entre o primeiro e o segundo cultivo. Esta fração solúvel é a mais lábil e mais reativa fração da matéria orgânica do solo. Assim, parte do Zn que estava complexado nesta fração pode ter sido solubilizado a partir da degradação do C orgânico solúvel no solo, contribuindo para o aumento da concentração do Zn na solução do solo e, conseqüentemente, nos tecidos das plantas de milho. Além disso, os elevados teores de Zn nas folhas das plantas de milho podem ser atribuídos à semelhança entre os raios iônicos dos cátions bivalentes, como o Mn, Fe e Cu, assim, os íons de Zn podem substituir qualquer um destes cátions bivalentes e ser absorvido pela planta (Tewaru et al., 2008). Uma vez no interior da planta, o Zn em excesso, pode alterar o equilíbrio fisiológico pela competição com os demais cátions em diversos locais (Tewaru et al., 2008), como nos sítios de absorção primária ou nos locais de transporte de nutrientes das raízes (Yang et al., 2011). Já a menor concentração de Cu em relação ao Zn nas folhas, pode ter ocorrido por causa da baixa mobilidade deste elemento nas plantas, uma vez que o mesmo apresenta forte interação com o N das proteínas (Kabata-Pendias, 2011).

Nas plantas de milho cultivadas no solo que recebeu a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn, nos dois cultivos, foi observado aumento significativo de F_o , que representa a emissão da fluorescência pelas moléculas de clorofilas das antenas que foram excitadas, antes da transferência da energia para os centros de reação (Krause & Weiss, 1991; Tanyolac et al., 2007). Isso aconteceu possivelmente porque os centros de reação do PSII podem estar comprometidos, ou a transferência da energia de excitação do complexo antena para os centros de reação esteja prejudicada (Bolhar-Nordenkampf et al., 1989). Geralmente, o valor de F_o é alterado por estresses do ambiente que causam alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do PSII (Campostrini, 2001), como os elevados teores de metais pesados no solo.

O estresse nas plantas pode ser observado também pela redução acentuada na eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), no tratamento que recebeu a maior dose de Zn (270 mg kg^{-1} de Zn), o que caracteriza um estado de fotoinibição crônica (Alves et al., 2002). Concordando com os resultados deste trabalho, Cambrollé et al. (2012) encontraram reduções na razão F_v/F_m em plantas cultivadas em solução nutritiva com alto teor de Zn. Estes autores observaram um decréscimo maior na razão F_v/F_m nas medições feitas ao meio dia, em

relação às feitas durante a madrugada, o que foi atribuído ao maior fluxo de luz durante o dia. Esta diminuição em F_v/F_m , em ambos os cultivos, foi causada por maiores valores de F_o concomitantemente com menores valores de F_m , que indica uma redução na proporção de centros de reação abertos (Maxwell & Johnson, 2000), possivelmente por causa da diminuição da concentração de clorofila (Cambrollé et al., 2012).

Da mesma forma que a razão F_v/F_m , a eficiência quântica efetiva do PSII ($Y(II)$) também mostrou redução nas plantas cultivadas no solo que recebeu a adição de 270 mg kg^{-1} de Zn, no segundo cultivo. Esta redução pode ter ocorrido devido ao aumento da dissipação não fotoquímica (NPQ), indicando que as plantas dissiparam a luz na forma de calor, protegendo assim a folha de danos induzidos pela luz (Maxwell & Johnson, 2000; Cambrollé et al., 2012). Esta dissipação da energia de excitação das clorofilas pode prevenir a formação de moléculas altamente reativas, a partir de oxigênio, que podem danificar irreversivelmente proteínas, lipídeos e pigmentos de membranas fotossintéticas (Horton & Ruban, 2004).

Em trabalho realizado com cana de açúcar, Jain et al. (2010) encontraram aumento dos teores de Chl *a*, Chl *b* e carotenóides nos tecidos foliares das plantas cultivadas em areia, submetidas a elevados teores de Zn, fornecido via solução nutritiva. Esta resposta provavelmente é causada pela menor produção de massa fresca das folhas e maiores quantidades de pigmentos por unidade de massa (Hewitt, 1983). Apesar disso, Sagardoy et al. (2009), observaram redução nos teores de clorofilas e carotenóides por causa do aumento das doses de Zn em solução nutritiva, quando os resultados foram expressos em função da área foliar. Alguns pesquisadores relatam redução do conteúdo de Chl *a*, Chl *b* e carotenóides em plantas, causada pela elevada concentração de metais pesados no solo (Yang et al., 2010) e em solução nutritiva (Mateos-Naranjo et al., 2008; Cambrollé et al., 2011). Segundo Cambrollé et al. (2012), a diminuição dos pigmentos fotossintéticos, induzida pelos elevados teores de Zn no meio de crescimento das raízes das plantas, pode ser atribuída ao efeito adverso do excesso do Zn no transporte de elétrons na fotossíntese, causando diminuição da síntese de clorofila ou incremento da sua degradação. Por outro lado, Upadhyay & Panda (2010), verificaram redução dos teores de clorofila total e carotenóides em plantas de *Spirodela polyrhiza* L., cultivadas em solução nutritiva e submetidas à aplicação de Cu ou Zn separadamente. Entretanto, quando o Cu e o Zn foram adicionados simultaneamente na solução nutritiva, as plantas apresentaram aumento do teor de clorofila total e de carotenóides nas folhas das plantas, o que pode ser considerada uma resposta específica do Zn, causando aumento da síntese de clorofila e de fotossintatos (Bazzaz et al., 1992). Neste estudo, isto pode ter ocorrido também pelo efeito de concentração dos pigmentos, já que as plantas

apresentaram redução na produção de matéria seca. Este efeito pode ser observado nos teores de Chl *a*, Chl *b* e carotenóides nas plantas do primeiro cultivo, principalmente nos tratamentos com solos que receberam a adição de 30 a 180 mg de Zn kg⁻¹ de solo.

A atividade da enzima SOD mostrou-se aumentada nas plantas cultivadas no solo de vinhedo sem a adição de Zn, bem como nas menores doses (30 e 60 mg kg⁻¹), e reduzida com o aumento das doses de Zn (90, 180 e 270 mg kg⁻¹) adicionadas ao solo no primeiro cultivo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Wang et al. (2009), que também verificaram redução da atividade da SOD com a aplicação de Zn, em plantas de *Brassica napus*. A SOD faz parte do primeiro ajuste da tolerância das plantas ao estresse oxidativo e seu produto, o H₂O₂, quando acumulado é menos prejudicial que o superóxido, sendo que sua eliminação pode ser realizada tanto por catalases, quanto por peroxidases (Alscher et al., 2002). Embora a enzima POD tenha demonstrado baixa atividade nas plantas de milho no primeiro cultivo, ela pode estar sendo produzida suficientemente para que ocorra a destoxificação do H₂O₂ produzido pela SOD. Assim como a SOD, a POD também não apresentou diferenças entre os tratamentos, contudo, teve sua atividade aumentada em relação ao primeiro cultivo. Isto sugere que o H₂O₂ está sendo predominantemente eliminado da célula. Estes resultados indicam que, com teores mais elevados de Zn no solo, as enzimas antioxidantes podem não proteger suficientemente a planta de milho dos danos oxidativos. Nesse estudo, os sintomas de toxicidade induzida pelos elevados teores de Cu e Zn no solo podem estar relacionados ao aumento acima dos níveis considerados normais tanto de Cu como de Zn nas folhas do primeiro e segundo cultivos, ocasionando estresse oxidativo, resultado também encontrado por Tanyolac et al. (2007) e acarretando em menor crescimento e acúmulo de matéria seca.

2.6 Conclusões

Os teores elevados de Cu e Zn no solo causam toxicidade às plantas de milho e proporcionam teores foliares acima dos níveis considerados normais nas folhas das plantas, nos dois cultivos. A toxicidade de Zn se evidencia através da diminuição no crescimento, tanto das raízes, como da parte aérea, bem como também na indução de sintomas de toxicidade e deficiência nos parâmetros fotossintéticos, refletindo na fotoinibição, além de

ocasionar estresse oxidativo nas plantas, especialmente nas plantas cultivadas nos solos que receberam as maiores doses de Zn.

2.7 Referências

- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331-1341.
- Alves, P.L., Magalhães, A.C.N., Barja, P.R., 2002. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. *The Bot. Rev.* 68, 193-208.
- 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.
- Arias, M., Pérez-Novo, C., López, E., Soto, B., 2006. Competitive adsorption and desorption of copper and zinc in acid soils. *Geoderma* 133, 151-159.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280-292.
- Bazzaz, F.A., Rolfe, G.L., Carlson, R.W., 1992. Effect of lead on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol. Plant.* 32, 373-376.
- Beauchamp, C.O., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal. Biochem.* 44, 276-287.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreider, U., Lechner, E.G., 1989. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Funct. Ecol.* 3, 497-514.
- Bonnet, M., Camares, O., Veisseire, P., 2000. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *J. Exp. Bot.* 51 (346), 945-953.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Briat, J.F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 322, 43-54.

- Brunetto, G., Miotto, A., Ceretta, C.A., Schmitt, D.E., Heinzen, J., Moraes, M.P., Canton, L., Tiecher, T.L., Comin, J.J., Girotto, E., 2013. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. *Arch. Agron. Soil Sci.* doi: 10.1080/03650340.2013.826348.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E., 2012. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Chemosphere*, 86, 867-874.
- Campostrini, E., 2001. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. UFNF, Rio de Janeiro.
- Castiglione, S., Franchin, C., Fossati, T., Lingua, G., Torrigiani, P., Biondi, S., 2007. High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* cv. Villafranca). *Chemosphere* 67, 1117-1126.
- Chaignon, V., Quesnoit, M., Hinsinger, P., 2009. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 157, 3363-3369.
- Chance, B., Maehley, A.C., 1955. Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymol.* 11, 764-775.
- Chen, W., Yang, X., He, Z., Feng, Y., Hu, F., 2008. 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. *Physiol. Plant* 132, 89-101.
- Cherif, J., Mediouni, C., Ammar, W.B., Jemal, F., 2011. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J. Environ. Sci.* 23(5), 837-844.
- Choudhary, M., Jetley, U.K., Khan, A.M., Zutshi, S., Fatma, T., 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotox. Environ. Safe.* 66, 204-209
- Citeau, L., Lamy, I., Van Oort, F., Elsass, F., 2003. Colloidal facilitated transfer of metals in soils under different land use. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 217, 11-19.
- Croué, J.P., Benedetti, M.F., Violleau, D., Leenheer, J.A., 2003. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environ. Sci. Technol.* 37, 328-336.

- De Magalhães, C.C.P., Cardoso, D., Dos Santos, C.P., Chaloub, R.M., 2004. Physiological and photosynthetic responses of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) to elevated levels of zinc. *J. Phycol.* 40, 496-504.
- Di Baccio, D., Tognetti, R., Minnocci, A., Sebastiani, L., 2009. Responses of the *Populus x euramericana* clone I-214 to excess zinc: Carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. *Environ. Exp. Bot.* 67, 153-163.
- Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Sarad, P., 2008. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. *Braz. J. Plant Physiol.* 20, 61-70.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 1997. Manual de métodos de análise de solo. CNPS, Rio de Janeiro.
- Fernández-Calviño, D., Soler-Rovira, P., Polo, A., Arias-Estévez, M., Plaza, C., 2010. Influence of humified organic matter on copper behavior in acid polluted soils. *Environ Pollut.* 158, 3634-3641.
- 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. *Sci Total Environ.* 414, 470-479.
- García, J.A.L., Grijalbo, L., Ramos, B., Fernández-Piñas, F., Rodea-Palomares, I., Gutierrez-Mañero, F.J., 2013. Combined phytoremediation of metal-working fluids with maize plants inoculated with different microorganisms and toxicity assessment of the phytoremediated waste. *Chemosphere* 90, 2654-2661.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxidedismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- Giroto, E., Ceretta, C.A., Rossato, L.V., Farias, J.G., Tiecher, T.L., De Conti, L., Schmatz, R., Brunetto, G., Schetinger, M.R.C., Nicoloso, F.T., 2013. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. *Ecotox. Environ. Safe.* 93, 145-155.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* 32, 481-494.
- Guo, X., Li, K., SUN, Y., Zhang, L., Hu, X., Xie, H., 2010. Allelopathic effects and identification of allelochemicals in grape root exudates. *Acta Horticulturae Sinica.* 37(6), 861-868.
- Hendry, G.A.F., Price, A.H., 1993. Stress indications: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F., Grime, J.P. (Eds.). *Methods in comparative plant ecology. A laboratory manual.* Chapman & Hall, London.

- Hewitt, E.J., 1983. Essential and functional methods in plants. In: Robb, D.A., Pierpoint, W.S. (eds). Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants. Academic Press, New York.
- Horton, P., Ruban, A., 2004. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* 56, 365-373.
- IPAGRO (Instituto de Pesquisas Agronômicas - Seção de Enologia Agrícola), 1989. Atlas Agroclimatológico do Estado do Rio Grande do Sul. Palloti, Porto Alegre.
- Jain, R., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A.K., Chandra, A., 2010. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiol. Plant* 32, 979-986.
- Jiang, X., Wang, C., 2008. Zinc distribution and zinc-binding forms in *Phragmites australis* under zinc pollution. *J. Plant Physiol.* 165, 697-704.
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Kloke, A., Sauerbeck, D.R., Vetter, H., 1984. The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. In: Nriagu, J.O. Changing Metal Cycles and Human Health. Springer-Verlag, Berlin.
- Komárek, M., E. Čadková, V. Chrástný, F. Bordas, and J. Bollinger., 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* 36(1):138-151.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Biol.* 42, 313-349.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62, 565-572.
- Li, X., Ma, H., Jia, P., Wang, J., Jia, L., Zhang, T., Yang, Y., Chen, H., Wei, X., 2012. Responses of seedling growth and antioxidant activity to excess iron and copper in *Triticum aestivum* L. *Ecotox. Environ. Safe.* 86, 47-53.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method. Enzymol.* 148, 350-382.
- Mackie, K.A., Müller, T., Kandeler, E., 2012. Remediation of copper in vineyards – A mini review. *Environ Pollut.* 167, 16-26.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press, New York.

- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., Luque, T., Figueroa, M.E., 2008. Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Plant Biol.* 10, 754-762.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Perez-Martin, A., 2013. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. *Ecotox. Environ. Safe.* 90, 136-142.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.
- Miotto, A., Ceretta, C.A., Brunetto, G., Nicoloso, F.T., Giroto, E., Farias, J.G., Tiecher, T.L., De Conti, L., Trentin, G., 2014. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. *Plant and Soil* 374, 593-610.
- Pérez-Novo, C., Fernández-Calviño, D., Bermúdez-Couso, A., López-Periago, J.E., Arias-Estévez, M., 2011. Phosphorus effect on Zn adsorption–desorption kinetics in acid soils. *Chemosphere* 83, 1028-1034.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Gogolin, K.A., Ye, H., 2006. Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 256-263.
- Sauvé, S., McBride, M., Norvell, W.A., Hendershot, W.H., 1997. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air Soil Pollut.* 100, 133-149.
- Scott, A.J., Knott, M.A., 1974. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30, 507-512.
- Sagardoy, R., Morales, F., Lopez-Millan, A.F., Abadia, A., Abadia, J., 2009. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol.* 11, 339-350.
- Silva, L.S.; Bohnen, H., 2001. Mineralização de palha de milho e adsorção de carbono, cálcio, magnésio e potássio em substratos com caulinita natural e goethita sintética. *R. Bras. Ci. Solo* 25, 289-296.
- Tanyolac, D., Ekmekçi, Y., Ünalán, S., 2007. Changes in photochemical and anti-oxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. *Chemosphere* 6, 89-98.
- Tewaru, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., 2008. Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. *J Plant Nutr. Soil Sci.* 171, 286-294.

- Tiecher, T.L., Ceretta, C.A., Comin, J.J., Giroto, E., Miotto, A., Moraes, M.P., Benedet, L., Ferreira, P.A.A., Lourenzi, C.R., Couto, R.R., Brunetto, G., 2013. Forms and accumulation of copper and zinc in a sandy Typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. *R. Bras. Ci. Solo* 37, 812-824.
- Toselli, M., Schiatti, P., Ara, D., Bertacchini, A., Quartieri, M., 2009. The accumulation of copper in soils of the Italian region Emilia-Romagna. *Plant Soil Environ.* 55(2), 74-79.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Zhang, W.J., Li, W., Lin, Z.P., 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere* 75, 1468-1476.
- Upadhyay, P., Panda, S.K., 2010. Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza* L. *J. Hazard. Mater.* 175, 1081-1084.
- Yang, Y., Sun, C., Yao, Y., Zhang, Y., Achal, V., 2011. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* ‘Comber’) to excess zinc. *Acta Physiol. Plant* 33, 1483-1491.
- Yruela, I., 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 171, 145-156.
- Zeraik, A.E., Souza, F.S., Fatibello-Filho, O., 2008. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Quím. Nova* 31, 731-734.

Tabelas

Tabela 1. Características da camada 0-15 cm de dois Argissolo Vermelho, um cultivado durante 30 anos com videira e outro oriundo de campo nativo.

Características	Vinhedo	Campo Nativo
Argila, método da pipeta (g kg^{-1})	44	54
Areia, método da pipeta (g kg^{-1})	892	894
Silte, método da pipeta (g kg^{-1})	64	52
MO, extraído por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (g kg^{-1})	18,5	9,0
$\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ (1:1)	5,7	5,2
Al trocável, extraído por KCl 1 mol L^{-1} ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	0,0	0,4
Cu disponível, extraído por EDTA (mg kg^{-1})	120,8	0,7
Zn disponível, extraído por EDTA (mg kg^{-1})	18,7	0,9
K trocável, extraído por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	62	132
P disponível, extraído por Mehlich-1 (mg kg^{-1})	31,4	7,0
Fe disponível, extraído por EDTA (mg kg^{-1})	33,5	21,9
Mn disponível, extraído por EDTA (mg kg^{-1})	43,6	40,7
Ca trocável, extraído por KCl 1 mol L^{-1} ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	1,3	0,5
Mg trocável, extraído por KCl 1 mol L^{-1} ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	0,3	0,2
CTC_{ef}^* , $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$	4,5	1,4
CTC_7^{**} , $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$	6,8	3,2

* CTC_{ef} , capacidade de troca de cátions efetiva; ** CTC_7 , capacidade de troca de cátions a pH 7.

Tabela 2. Concentração de Cu, Zn e carbono solúvel (mg L^{-1}), matéria orgânica do solo (g kg^{-1}), pH do solo e pH da solução do solo antes do primeiro cultivo e após o segundo cultivo, em solo com a adição de doses de Zn.

		Doses de Zn (mg kg^{-1})					
		0	30	60	90	180	270
1° Cultivo	pH _{Sol}	5,74	5,48	5,47	5,46	5,31	5,32
2° Cultivo	pH _{Sol}	6,14	6,09	6,11	6,03	5,98	6,02
1° Cultivo	C _{Sol}	227	168	195	169	299	245
2° Cultivo	C _{Sol}	96	71	85	79	89	85
1° Cultivo	Cu _{Sol}	1,58	1,16	1,24	1,25	1,48	1,49
2° Cultivo	Cu _{Sol}	0,78	0,78	0,84	0,80	0,76	0,85
1° Cultivo	Zn _{Sol}	0,47	1,33	2,41	4,51	8,87	14,19
2° Cultivo	Zn _{Sol}	0,62	1,84	4,11	5,90	17,72	40,88
1° Cultivo	MOS	21,3	18,3	20,6	14,8	19,9	18,5
2° Cultivo	MOS	15,0	15,3	13,8	12,7	14,9	12,7
1° Cultivo	pH _{solo}	5,81	5,70	5,67	5,65	5,09	4,95
2° Cultivo	pH _{solo}	5,00	4,96	4,94	4,98	4,85	4,68

Tabela 3. Fluorescência inicial (Fo), rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm), rendimento quântico basal do PSII (Fv/Fo), eficiência quântica efetiva do PSII (Y(II)), taxa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dissipação fotoquímica (qP), e dissipação não fotoquímica (NPQ), em folhas de milho em resposta a adição de doses de Zn durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

		Doses de Zn (mg kg^{-1})						
		0	30	60	90	180	270	Controle
1° Cultivo	Fo	367,0b	393,3b	397,3b	343,7b	358,0b	530,3a*	62,7
2° Cultivo	Fo	69,0b	69,7b	76,8b	118,5b	121,0b	191,3a*	59,3
1° Cultivo	Fv/Fm	0,63a	0,66a	0,64a	0,68a	0,66a	0,54b*	0,75
2° Cultivo	Fv/Fm	0,73a	0,71a	0,65a	0,64a	0,58a	0,40b*	0,74
1° Cultivo	Fv/Fo	1,69a	1,99a	1,82a	2,12a	1,96a	1,21a*	3,08
2° Cultivo	Fv/Fo	2,66a	2,45a	1,96a	1,78b	1,53b	0,83c*	2,78
1° Cultivo	Y (II)	0,33a	0,38a	0,38a	0,38a	0,33a	0,27a*	0,49
2° Cultivo	Y (II)	0,44a	0,42a	0,42a	0,39a	0,36a	0,27b	0,38
1° Cultivo	ETR	26,65a	29,93a	30,06a	30,06a	26,39a	21,87a*	39,34
2° Cultivo	ETR	34,71a	33,84a	33,86a	31,41a	28,57a	21,76b	30,23
1° Cultivo	qP	0,59b	0,68a	0,78a	0,74a	0,71a	0,58b	0,76
2° Cultivo	qP	0,70a	0,68a	0,69a	0,61a	0,70a	0,63a	0,58
1° Cultivo	NPQ	0,63a	0,90a	1,06a	1,12a	1,09a	0,97a	0,25
2° Cultivo	NPQ	0,38b	0,32b	0,34b	0,68a	0,76a	0,84a*	0,07

Legenda das Figuras

Fig.1 Produção de matéria seca da parte aérea (a) e raízes (b), do milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Fig.2 Concentração total de Zn (a) e concentração total de Cu (b) nas folhas das plantas de milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Fig.3 Clorofila *a* (a), clorofila *b* (b) e carotenoides (c), na primeira folha expandida de plantas de milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Fig.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (a) e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) (b), na primeira folha expandida de plantas de milho em resposta a adição de doses de Zn em mg kg^{-1} , em um solo de vinhedo contaminado com Cu, durante 35 dias. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$); ns = não significativo a 5% de erro; * médias de todos os tratamentos foram comparadas com o tratamento controle (sem Cu e Zn adicionados ao solo), pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Figura 1

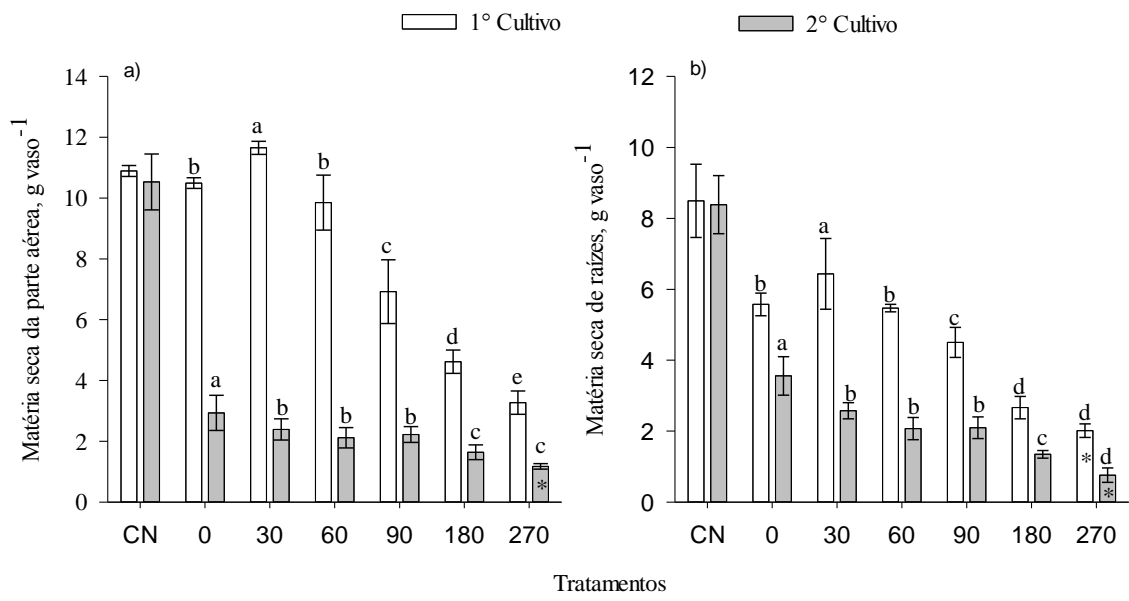


Figura 2

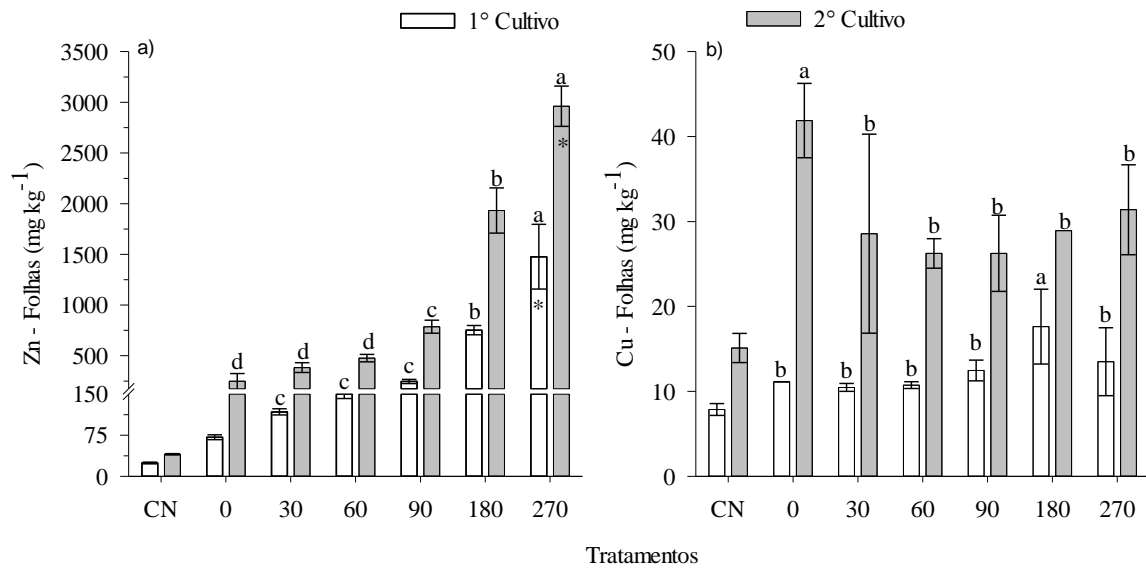


Figura 3

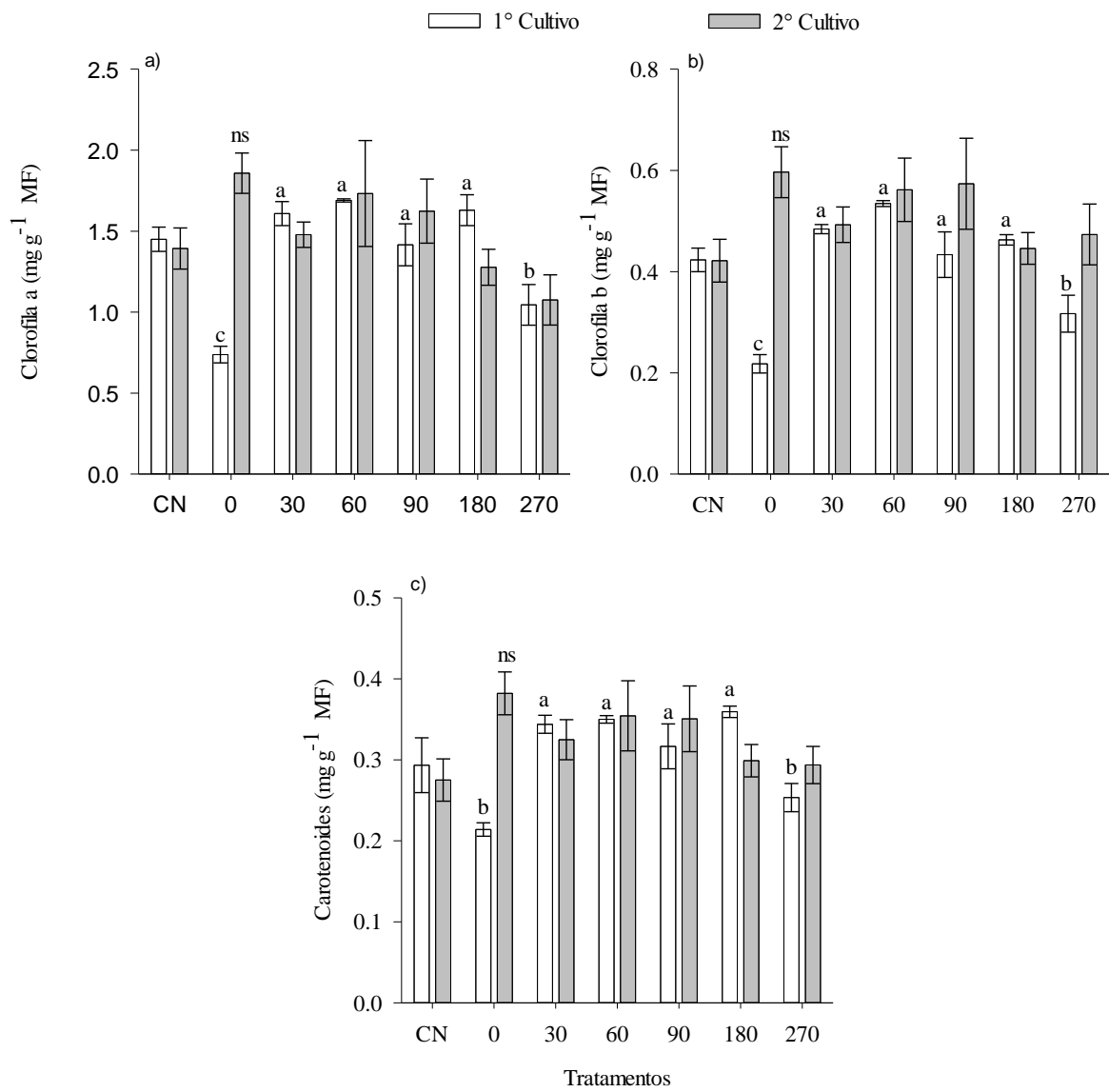


Figura 4

