

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DANIELE MARIA MARQUES

MORFOFISIOLOGIA DE ESPÉCIES ARBÓREAS EXPOSTAS AO COBRE

**Alfenas - MG
2016**

DANIELE MARIA MARQUES

MORFOFISIOLOGIA DE ESPÉCIES ARBÓREAS EXPOSTAS AO COBRE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais
pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG.

Orientador: Dr. Thiago Corrêa de Souza

Colaboradores: Dr. Adriano Bortolotti da Silva

Dr. José Ricardo Mantovani

Dr. Paulo César Magalhães

Dra. Marília Carvalho

**Alfenas - MG
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Marques, Daniele Maria.
Morfofisiologia de espécies arbóreas expostas ao cobre / Daniele
Maria Marques. – Alfenas - MG, 2016.
75 f.

Orientador: Thiago Corrêa de Souza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) -
Universidade Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Biodegradação Ambiental. 2. Metais pesados. 3. Fotossíntese.
4. Clorofila. I. Souza, Thiago Corrêa de. II. Título.

CDD-575.8



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1379(Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



DANIELE MARIA MARQUES

“Morfofisiologia de espécies arbóreas expostas ao cobre”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 20 de abril de 2016.

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Prof. Dr. Fabrício José Pereira

Instituição: UFLA

Assinatura:

Prof. Dr. Marcelo Polo

Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Aos meus pais, José e Maria Auxiliadora pelos ensinamentos e lição de vida. Responsáveis por tudo que sou...

Pedro e Matheus meus afilhados, que são expressão de todo amor e carinho.

Ao meu saudoso avô Pedro, ao senhor todo o meu amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial por esta oportunidade de aprendizado e evolução. Por mostrar-me que o amor é o ingrediente principal na realização de qualquer trabalho. E aos amigos espirituais minha gratidão por toda a ajuda, proteção, ensinamentos, amor. E por guiar meus passos e ensinar-me que tudo passa...

Aos meus pais José e Maria Auxiliadora, exemplo de luta, humildade e amor.

Aos meus amigos Edimar Moreira, Jucely França, Ana Raíssa Cunha e Rosângela Carvalho que são parte integrante da minha história e estão sempre guardados na memória e no coração.

A tia Luzia, minha “mãezona” que sempre esteve ao meu lado dando todo incentivo.

Ao Cêsão (Laboratório de Solos – Unifenas), obrigada pela amizade e carinho.

A Dalvana Pereira que foi parceira nesse trabalho. Obrigada pela dedicação, Dada!

Ao professor Adriano Bortolotti pela amizade, atenção e por acreditar que tudo ia dar certo. Você faz parte dessa história!

Ao meu orientador Thiago Corrêa de Souza pelo exemplo de profissional, por toda a atenção, apoio, amizade, paciência, ética e conselhos oferecidos durante esse período.

Ao professor Flavio Nunes Ramos pelos conhecimentos oferecidos e pela amizade.

Aos professores José Ricardo Mantovani e Marília Carvalho pelo auxílio no decorrer do projeto.

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais pela oportunidade oferecida.

Ao viveiro florestal de Itutinga-MG da Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG pela doação das mudas das espécies usadas neste estudo.

A Cooxupé pela colaboração nas análises realizadas.

A todos vocês, a minha gratidão!

“Ainda não chegamos onde devemos chegar. Mas com certeza, hoje estamos mais próximos do que ontem.”

(ZULPO, [20--])

RESUMO

A contaminação causada por metais pesados no solo é uma grande preocupação ecológica, devido ao seu potencial nocivo à qualidade ambiental e a vitalidade dos seres vivos, além da alta persistência no ambiente. O cobre (Cu) é um micronutriente essencial aos vegetais, porém em excesso pode causar danos na morfofisiologia dos vegetais. Compreender os mecanismos que as plantas utilizam para combater a toxicidade causada por esse metal é de grande importância para o desenvolvimento de programas de fitorremediação. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar as respostas morfofisiológicas e a tolerância de espécies arbóreas expostas a diferentes concentrações de cobre no solo. Para caracterizar o efeito do Cu sobre a morfofisiologia e tolerância das plantas foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três espécies florestais *Myroxylon peruiferum* L. (Óleo Balsamo), *Hymenaea courbaril* (Jatobá) e *Peltophorum dubium* (Canafístula) e cinco concentrações de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0, 50, 100, 200 e 400 mg kg^{-1} , com quatro repetições por tratamento, em substrato de solo acondicionados em vasos. Foram avaliados os parâmetros de crescimento, clorofilas, a atividade enzimática antioxidante, teor de prolina, trocas gasosas foliares, teor de cobre nos tecidos e no solo e índices. O excesso do Cu no solo não afetou o crescimento vegetativo das três espécies no período pesquisado. Entretanto, foi observado redução no teor da clorofila com o aumento do cobre no solo. As espécies apresentaram sistema de defesa enzimático antioxidante (SOD, APX, CAT, GPX) em combate as espécies reativas de oxigênio (ERO). As plantas de *M. peruiferum* apresentaram maiores teores de prolina no tecido foliar em relação às demais espécies. O excesso de Cu induziu nas três espécies um declínio na fotossíntese que pode ser atribuído à limitação bioquímica, e também em *M. peruiferum* limitação estomática. As três espécies acumularam o Cu nas raízes. Plantas de *M. peruiferum* absorveram menos Cu em seus tecidos, com característica de planta exclusora. As plantas de *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum* apresentaram tolerância e são indicadas para a revegetação de solos contaminados com cobre e a programas de fitorremediação como a fitoestabilização. No segundo experimento o delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC) com cinco concentrações de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0, 100, 200, 400 e 800 mg kg^{-1} , com quatro repetições. A espécie arbórea utilizada foi Jatobá - *Hymenaea courbaril* L. Foram avaliados os parâmetros de crescimento, trocas gasosas, morfologia radicular, teor de Cu nos tecidos e índices. O Cu até a concentração de 200 mg Kg^{-1} favoreceu o crescimento, trocas gasosas e morfologia radicular das plantas de *H. courbaril*. O excesso do Cu no solo afetou o crescimento vegetativo e causou declínio na taxa fotossintética devido à limitação bioquímica. Na concentração de 800 mg Kg^{-1} o cobre causou alterações nas respostas fotossintéticas com menor taxa fotossintética líquida máxima (A_{max}), taxa de respiração no escuro (R_d), ponto de compensação de luz (LCP), ponto de saturação de luz (LSP) e rendimento quântico aparente (α). Foi observado também inibição do sistema radicular a exposição ao excesso de Cu. O Cu foi acumulado nas raízes como mecanismo de tolerância. As plantas de *H. courbaril* apresentaram tolerância ao excesso de Cu no solo, e essa arbórea é indicada para recuperação de áreas contaminadas com esse metal.

Palavras chave: Fitorremediação. Metal pesado. Trocas gasosas. Cobre nas raízes. WinRhizo.

ABSTRACT

The contamination caused by heavy metals in the soil is a major ecological concern because of its potential harmful effects to the environmental quality and vitality of life, and also the high persistence in the environment. Copper (Cu) is an essential micronutrient for plants, but in excess can cause damage to the morphophysiology of plants. Understanding the mechanisms used by plants to control the toxicity caused by this metal is very important for the development of phytoremediation programs. In this context, the objective of this research was to evaluate the morphological and physiological responses and tolerance of tree species exposed to different concentrations of copper in the soil. Two experiments were performed in order to characterize the effect of Cu on the morphophysiology and tolerance of plants. The first experiment used a completely randomized design (CRD) with three forest species *Myroxylon peruiferum* L. (Balm Oil), *Hymenaea* (Jatoba) and *Peltophorum dubium* (Canafístula) and five concentrations of copper ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0, 50, 100, 200 and 400 mg kg^{-1} in pots containing soil as substrate, with four replications per treatment. The trial evaluated the growth parameters, chlorophyll, antioxidant enzyme activity, proline content, leaf gas exchange, copper content in tissues and soil and indexes. The excess Cu in soil did not affect the vegetative growth of the three species in the period evaluated. However, a reduction in the chlorophyll content was observed with the increasing of copper in the soil. The species presented enzymatic antioxidant defense system (SOD, APX, CAT, GPX) to control reactive oxygen species (ROS). Plants of *M. peruiferum* showed higher proline content in the leaf tissue compared to the other species. The excess Cu induced a decrease in the photosynthesis of the three species which can be attributed to biochemical limitation, and also a stomatal limitation in *M. peruiferum*. The three species accumulated Cu in the roots. *M. peruiferum* plants absorbed less Cu in their tissues, a characteristic of a Cu-exclusion plant. *H. courbaril*, *P. dubium* and *M. peruiferum* showed tolerance and are suitable for revegetation of soils contaminated with copper and phytoremediation programs such as phytostabilization. The second experiment used a randomized block design (RBD) with five copper concentrations ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0, 100, 200, 400 and 800 mg kg^{-1} and four replications. Jatobá - *Hymenaea* L. was the tree species used and the trial evaluated growth parameters, gas exchange, root morphology, Cu content in the tissues and indexes. Cu content up to 200 mg kg^{-1} favored growth, gas exchange and root morphology of *H. courbaril* plants. The excess Cu in the soil affected the vegetative growth and caused decline in the photosynthetic rate due to biochemical limitation. At concentration of 800 mg kg^{-1} copper caused changes in the photosynthetic responses, showing decreased maximum net photosynthetic rate (A_{max}), respiration rate in the dark (R_d), light compensation point (LCP), light saturation point (LSP) and apparent quantum yield (α). Exposure to excessive Cu also caused inhibition of root system. The Cu was accumulated in the roots as a mechanism of tolerance. The *H. courbaril* plants showed tolerance to excess Cu in the soil and is suitable for recovery of areas contaminated with this metal.

Keywords: Phytoremediation. Heavy metals. Gas exchange. Copper in the roots. WinRhizo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	METAIS PESADOS	13
2.2	COBRE (Cu)	14
2.2.1	Deficiência de cobre nos vegetais	15
2.2.2	Excesso do cobre nas plantas.....	15
2.3	FITORREMEDIÇÃO	17
2.4	MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO METAL PESADO	19
2.5	ESPÉCIES ARBÓREAS	20
3	JUSTIFICATIVA	22
4	OBJETIVOS	23
4.1	OBJETIVO GERAL.....	23
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
	REFERÊNCIAS	24
	ANEXO A – ARTIGO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ARBÓREAS EXPOSTAS AO COBRE	31
	ANEXO B - ARTIGO: Toxicidade do cobre na morfologia e fotossíntese de <i>Hymenaea courbaril</i> L.	56

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados são encontrados naturalmente nos solos ou são introduzidos pelas atividades antrópicas como a industrialização, urbanização e agricultura. Concentrações elevadas desses metais na biosfera causam contaminação ambiental, devido ao seu potencial nocivo à qualidade ambiental e a vitalidade dos seres vivos, além da alta persistência no ambiente (MATEOS-NARANJO et al., 2013).

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para o crescimento das plantas, participando de reações biológicas importantes como elemento estrutural das proteínas, enzimas, bem como na resposta ao estresse oxidativo, e em reações redox (YRUELA, 2013). No entanto, em excesso o cobre torna-se fitotóxico e pode gerar danos oxidativos e interferir em estruturas e processos celulares importantes, como a fotossíntese, síntese de pigmentos fotossintéticos, permeabilidade da membrana celular e outros mecanismos metabólicos, provocando uma forte inibição do crescimento da planta (PARDO et al., 2014).

Em excesso nos solos devido atividades agrícolas, industriais, mineração e reutilização de resíduos urbanos, o (Cu) torna-se agente poluidor. E a fitorremediação destaca-se por apresentar um processo de remediação dos solos à base de plantas. Estas técnicas caracterizam-se por remediar, estabilizar ou até mesmo despoluir áreas contaminadas com metais pesados incluindo o cobre (CAIRES et al., 2011).

Espécies florestais nativas apresentam características desejáveis para a fitorremediação de solos contaminados com metais pesados, por apresentar fácil implementação, maior longevidade e grande produção de biomassa (YOON et al., 2006). Os metais absorvidos por essas espécies lenhosas ficam por um tempo maior imobilizados nos tecidos, retardando o seu retorno ao solo. Isto devido ao maior volume do sistema radicular que proporciona maior absorção de elementos químicos. Além disso, a fitorremediação com arbóreas leguminosas pode levar a melhoria dos solos devido à solubilização de nutrientes e a fixação do nitrogênio atmosférico em associação com bactérias nitrificantes. A qualidade e quantidade da matéria orgânica são melhoradas, podendo ainda, transformar importantes propriedades dos solos com porosidade, aeração e umidade (JESUS et al., 2014).

Para o bom desempenho de programas de fitorremediação o conhecimento do comportamento morfofisiológico e os mecanismos de tolerância de arbóreas ao metal são suma importância, visto que até o presente momento pouco se sabe sobre essas características em espécies florestais. Assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar as respostas

morfofisiológicas e tolerância de espécies arbóreas expostas a diferentes concentrações de cobre.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção será apresentada a revisão de literatura, estruturada em uma descrição do metal pesado cobre (Cu), seguido pela apresentação dos sintomas de deficiência e toxidez desse elemento nos vegetais, uma abordagem da literatura sobre fitorremediação e os mecanismos de tolerância das plantas ao metal pesado e por fim, uma revisão sobre as espécies arbóreas que foram utilizadas no presente trabalho.

2.1 METAIS PESADOS

Os termos “elemento traço”, “metais pesados”, “metais traço” são de bastante uso na literatura atual para designar alguns elementos que ocorrem nos sistemas biológicos naturais. Metal pesado, embora, seja apenas um termo vagamente definido é amplamente reconhecido e aplicado, geralmente, aos elementos, tais como Cd (cádmio), Cr (cromo), Cu (cobre), Hg (mercúrio), Ni (níquel), Pb (chumbo) e Zn (zinco), que são comumente associados com problemas de poluição e toxicidade (GILL, 2014; O’CONNELL et al., 2008).

Componentes naturais dos solos, os metais pesados segundo Alloway (1993) são definidos como um grupo de metais e metaloides que formam um conjunto de elementos heterogêneos que possuem densidade relativa maior que 5 g cm^3 . Ocorrem naturalmente nos solos ou introduzidos pela ação da atividade humana. Alguns são elementos essenciais para várias funções fisiológicas, sendo utilizados pelos organismos vivos nas estruturas de proteínas, facilitando a transferência de elétrons e podem catalisar reações enzimáticas. Alguns elementos como Fe, Cu, Zn e Mn, estão envolvidos em reações redox, enquanto outros como Cd, Pb, e Hg não tem funções biológicas conhecidas (CARNEIRO et al., 2001; DUCIC; POLLE, 2005).

Os metais pesados apresentam uma maior disponibilidade nos solos e nos ecossistemas aquáticos, e uma proporção relativamente muito pequena na atmosfera como partículas ou vapores tornando-se um problema global. Causam riscos potenciais para a vida aquática, vegetal, animal e a humana devido à sua toxicidade, bioacumulação, e por não apresentarem natureza biodegradáveis, uma vez liberado no ambiente - ar, água e solo não degradam, mas se acumulam nos solos, sedimentos e na biota (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000; NAGAJYOTI et al., 2010).

Alguns metais são biologicamente essenciais aos seres vivos, mas podem ser prejudiciais para organismos quando esses são expostos a concentrações elevadas desses elementos. Além da contaminação dos ecossistemas, acarretam problemas na saúde da população humana o que têm sido motivo de crescente preocupação pública mundial. Um pequeno aumento na concentração desses metais no meio ambiente pode modificar as funções minerais e enzimáticas dos seres humanos causando, assim, várias doenças e distúrbios (ALI et al., 2013; MUSARRAT et al., 2011; STANKOVIC et al., 2014).

A contaminação de solos agrícolas por metais pesados tem se tornado uma preocupação ambiental crítica devido aos efeitos ecológicos adversos. O excesso dos metais pesados pode alterar as propriedades físico-químicas dos solos, resultar em diminuição da atividade microbiana, perdas de rendimento agrícola e na redução da fertilidade dos solos (GAO et al., 2010). Em concentrações elevadas são considerados como poluentes devido à sua ocorrência generalizada, e seu efeito fitotóxico agudo e crônico nas plantas cultivadas nesses solos (YADAV, 2010).

2.2 COBRE (Cu)

O cobre é um elemento químico de símbolo Cu, número atômico 29, de massa atômica 63,54, sendo classificado como metal de transição. Em condições fisiológicas apresentam dois estados de oxidação Cu^+ e Cu^{+2} (BURKHEAD et al., 2009). A concentração do cobre nos solos pode variar muito, mas em média ocorrendo no teor de 20 mg kg^{-1} (HE et al., 2005).

O metal pesado cobre (Cu) é um micronutriente essencial aos vegetais, é cofator de várias enzimas, tendo participação nos compostos enzimáticos e em reações redox. Está envolvido em muitos processos biológicos essenciais, como um papel chave na cadeia transportadora de elétrons na fotossíntese, respiração, metabolismo da parede celular, lignificação. Atua como elemento estrutural das proteínas, mitocôndrias e cloroplastos, bem como na resposta ao stress oxidativo (BURKHEAD et al., 2009; GARCIA et al., 2014; GARCIA-MOLINA et al., 2011; YRUELA, 2009).

Nos cloroplastos, o Cu é um constituinte da proteína plastocianina, que transporta elétrons nas reações fotossintéticas primárias. O cátion Cu^{+2} frequentemente está ligado ao nitrogênio das cadeias laterais da histadina, enquanto Cu^+ interage com o enxofre da cisteína e da metionina (DALCORSO et al., 2014; YRUELA, 2013).

2.2.1 Deficiência de cobre nos vegetais

O teor de cobre no solo que é considerado baixo corresponde a um valor que varia de 0 – 0,2 mg kg⁻¹ segundo Raij et al. (1997), originando sintomas de deficiência nos vegetais. A deficiência de cobre é encontrada principalmente em solos arenosos e húmicos, com elevados pH e capacidade de troca catiônica. Isso resulta em perdas de produtividade na produção vegetal. A deficiência grave de Cu em cereais, por exemplo, resulta em pontas das folhas necróticas, conhecida como "doença da ponta branca", que é causada por um colapso das paredes celulares, devido à baixa lignificação (BROADLEY et al., 2012).

Em teores baixos, o sintoma de deficiência de cobre torna-se visível pela primeira vez em folhas jovens causando clorose e redução na taxa fotossintética e nos órgãos reprodutivos, mais tarde com consequências de inibição do crescimento de toda a planta e folhas verde-claras que murcham facilmente (HÄNSCH; MENDEL, 2009; MERCHANT et al., 2006). Baixa biodisponibilidade do Cu no solo também afeta a produtividade das plantas, causa grandes prejuízos econômicos e reduz o valor nutricional das culturas, afetando a alimentação humana. A insuficiência do Cu altera o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias e nos cloroplastos através do funcionamento ineficaz das proteínas, como citocromo c-oxidase e plastocianina (ANDRÉS-COLÁS et al., 2013). Plantas deficientes em cobre apresentam desintegração das membranas dos tilacóides nos cloroplastos, bem como redução na síntese de plastoquinona e menores teores de ácidos graxos insaturados (C18) (BARÓN et al., 1992).

2.2.2 Excesso do cobre nas plantas

O teor natural de cobre em solos é muito variável, dependendo da rocha matriz e da intensidade dos processos de formação do solo (físico-químico e biológico) sobre a rocha. É considerado valor de intervenção a concentração de cobre acima de 200 mg kg⁻¹ nos solos, o qual pode causar riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana quando expostas a esse cenário (CETESB, 2005).

Em níveis tóxicos, Yruela (2005) relata que o Cu pode ocorrer naturalmente em alguns solos ou pode ser resultado da ação antropogênica como liberação no meio ambiente por mineração, fundição, indústria, agricultura e efluentes. Quando presente em concentrações altas tornar-se fitotóxico para as plantas, interferindo em inúmeros processos fisiológicos (GAUTAM et al., 2016). Altera a fotossíntese, síntese de pigmentos fotossintéticos,

permeabilidade da membrana celular, danos oxidativos, provocando forte inibição no desenvolvimento da planta (ADREES et al., 2015). Íons livres de cobre são altamente reativos e são capazes de se ligar ao grupo sulfidril (SH) causando alterações nas funções das proteínas (GRATÃO et al., 2005).

A presença em excesso do cobre pode causar estresse oxidativo nos vegetais, devido ao aumento da produção de radicais livres de oxigênio altamente tóxicos. As espécies reativas de oxigênio (ERO), como radicais de superóxido (O_2^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) tem demonstrado ser um dos agentes causadores de danos nas células e tecidos. Espécies reativas de oxigênio (ERO) danificam os lipídios, ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono e moléculas complexas produzidas nas células (AUST et al., 1985; LYUBENOVA et al., 2015; THOUNAOJAM et al., 2012).

Para combater esta situação de estresse oxidativo, existem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos nas células que eliminam ou reduzem os seus efeitos nocivos. A importância das enzimas antioxidantes é a sua capacidade de sequestrar ERO e, assim, prevenir o dano oxidativo. O sistema antioxidante compreende várias enzimas tais como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX), peroxidase do guaiacol (GPOX), e também se pode incluir aquelas não enzimáticas, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), e glutatona (GSH) e compostos fenólicos. Essas substâncias são oxidáveis, com alto poder redutor, assim, reagem rapidamente com os radicais livres, antes que possam lesar as células (KHATUN et al., 2008). Thounaojam et al. (2012) revelam em sua pesquisa que o excesso de Cu levou ao estresse oxidativo em plantas de arroz por induzir a formação de ERO e as enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), peroxidase (GPX) e peroxidase do ascorbato (APX) foram efetivamente produzidas nas concentrações elevadas de Cu.

Plantas cultivadas com altos níveis de cobre apresentam biomassa reduzida e sintomas de clorose, devido a um menor teor de clorofila e alterações na estrutura dos cloroplastos e composição da membrana dos tilacóides. Ocorre a degradação do empilhamento das *granum* e das lamelas estromais (PÄTSIKKÄ et al., 2002). Mateos-Naranjo et al. (2008) pesquisando o efeito do cobre no crescimento e fotossíntese de *Spartina densiflora* Brongn. descrevem que a eficiência quântica do FSII, a taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática e concentração de pigmentos diminuíram com o aumento na concentração de Cu. Os autores enfatizam, ainda, que o decréscimo na taxa fotossintética resultou numa redução de biomassa de 50 e 80% (por 600 e 5000 mg kg⁻¹ de Cu, respectivamente). Cambrollé et al. (2011) relatam que o efeito adverso do excesso de cobre na *Glaucium flavum* é a redução da

fotossíntese que pode ser atribuída ao efeito tóxico de Cu no aparelho fotossintético das plantas, sendo diretamente, através de uma diminuição na concentração de pigmentos, e, indiretamente, através de interferência de íons Cu no FSII.

Em concentrações elevadas, o cobre pode reduzir significativamente o teor total de clorofila. Os pesquisadores Nair, Kim e Chung (2014) estudando a toxicidade das nanopartículas de óxido de cobre em plântulas de feijão (*Vigna radiata* L.) confirmam em seus resultados, o teor baixo da clorofila total. No entanto, ressaltam que não houve redução significativa no teor de carotenoides. Isso provavelmente se explica pelos resultados encontrados assumindo-se que a redução significativa do teor total de clorofila foi devido à exposição às nanopartículas de óxido de cobre por causa da diminuição da biomassa vegetal.

Alterações morfológicas acontecem nos vegetais quando expostos em concentrações altas de cobre (Cu). Kulikova et al. (2011) pesquisando o efeito das crescentes concentrações de cobre no crescimento e viabilidade das raízes de soja mostraram que na presença de 50 mM de CuSO_4 as raízes deixaram de crescer. O excesso de cobre resultou na má formação das camadas celulares da superfície do meristema das raízes e impediu o desenvolvimento das raízes laterais, afetando assim a morfologia da raiz. Lequeux et al. (2010) trabalhando com a resposta do excesso de cobre com a espécie *Arabidopsis thaliana* mostraram em seus resultados que a biomassa radicular foi mais severamente inibida que a biomassa da parte aérea. Ocorreu a redução do crescimento e na arquitetura das raízes, e lesão no meristema apical da raiz mostrando a toxicidade local.

Cai et al. (2014) analisando a morfologia radicular de *Elsholtzia haichowensis* através de sistema de imagens digitais (WinRhizo) observaram que o número de pontas meristemáticas, diâmetro radicular médio, volume, área superficial e comprimento radicular foram significativamente afetados com o aumento da concentração de Cu. Panou-Filotheou e Bosabalidis (2004) pesquisando o efeito do excesso de cobre nas raízes de *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* encontram em seus resultados que as más formações, tendo como formas de inchaços irregulares onde emergiam as raízes secundárias refletiam da toxicidade do cobre. Estes autores relatam, ainda, que a acentuada redução do volume de raiz sob estresse por Cu reflete em uma diminuição relevante da biomassa radicular, que depende diretamente da divisão e alongamento celular.

2.3 FITORREMEDIAÇÃO

A recuperação de áreas contaminadas por metais pesados é importante por minimizar ou evitar a dispersão dos contaminantes para outros nichos ecológicos e a contaminação da população humana (PEREIRA et al., 2012). Dentre as inúmeras tecnologias que envolvem a remediação de solos contaminados, destacam-se a biorremediação e a fitorremediação, que podem promover a despoluição do local ou a remoção de elementos contaminantes do solo (ALI et al., 2013).

A fitorremediação baseada na fisiologia vegetal, na química dos contaminantes e na bioquímica do solo, proporciona a restauração da estrutura e ecologia do solo. Apresenta vantagens, dada a sua natureza permanente combinada aos baixos custos de manutenção, a proteção contra a erosão eólica e hídrica, a melhoria na estrutura física e química dos solos e a recuperação da estética da paisagem (PAZ-FERREIRO et al., 2014; SAIER; TREVORS, 2010). Eleva a quantidade de carbono orgânico, infiltração da água, à porosidade no solo e diminuí a erosão. Os vegetais também conservam a composição e o desenvolvimento dos microrganismos no solo, até mesmo os biorremediadores (MARQUES et al., 2011).

Os alvos da fitorremediação incluem substâncias como metais Pb, Zn, Al, Cd, Cu, Ni, Hg, Se; elementos químicos radioativos, sendo U, Cs, Sr; hidrocarbonetos derivados de petróleo; pesticidas e herbicidas (bentazona, compostos clorados); explosivos (TNT, DNT); solventes clorados e resíduos orgânicos industriais (MARIANO; OKUMURA, 2012; OLIVEIRA et al., 2009; PILON-SMITS, 2005).

Ali et al. (2013) e Gratão et al. (2005) relataram que a fitorremediação leva a descontaminação dos solos por ação direta ou indireta dos vegetais, por extração ou degradação do poluente, por processos como a fitoextração - a redução do contaminante é facilitada pela sua passagem da raiz para a parte aérea; fitodregadação - os vegetais metabolizam ou mineralizam os contaminantes dentro das células, portanto a degradação é “*in planta*”; fitovolatização - após a metabolização interna nos vegetais, ocorre à liberação na superfície foliar do contaminante na forma de gás; fitoestimulação - as raízes das plantas e a microbiota do solo degradam o contaminante; fitoestabilização - utiliza os vegetais para minimizar a mobilidade dos contaminantes no solo através da acumulação pelas raízes ou a precipitação dentro da rizosfera.

Para que ocorra a despoluição existe a necessidade da utilização de plantas que apresentem algumas características específicas. O vegetal deve possuir capacidade de absorção, concentração e/ou metabolização e tolerância ao contaminante; sistema radicular denso e profundo; retenção do contaminante nas raízes; capacidade de desenvolver-se em

ambientes adversos, dentre outras características (COUTINHO; BARBOSA, 2007; ENT et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2009; SHIRDAM et al., 2008).

2.4 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO METAL PESADO

Em solos contaminados com metais pesados as plantas apresentam diferentes mecanismos para lidar com o estresse do metal. Algumas espécies de plantas adotam estratégias de exclusão para evitar a absorção excessiva e transportes de íons metálicos, e acumulam geralmente baixas concentrações de metais em suas raízes, mesmo quando cultivadas em solos altamente contaminados (MALIK; BISWAS, 2012). Em contraste, as plantas acumuladoras podem acumular grandes quantidades de metais pesados em seus tecidos, mesmo na parte aéreas (ALI et al., 2013).

O acúmulo de cobre no sistema radicular pode representar estratégia de tolerância da planta ao excesso de metal pesado no solo (CAMBROLLÉ et al., 2013; SILVA et al., 2011). Este acúmulo nas raízes pode ser explicado anatomicamente por barreiras apoplásticas exoderme e endoderme. Elas desempenham papel importante na proteção do vegetal, minimizando a translocação dos metais das raízes para a parte aérea (FREITAS et al., 2015; GOMES et al., 2011). O espessamento das paredes das células do sistema radicular (principalmente na exoderme e endoderme) proporciona maior área de retenção de metais pesados, diminuindo sua translocação para a parte aérea (ADRESS et al., 2015).

Os vegetais exibem vários outros mecanismos para combater a toxidez dos metais e podem contar com as micorrizas que exercem um papel chave para diminuir o efeito tóxico no vegetal, e a membrana plasmática desempenhando uma importante função na homeostase dos metais, prevenindo ou reduzindo a entrada na célula (ALI et al., 2013); Quelação dos metais pode influenciar positivamente no bombeamento de certas substâncias como ácidos carboxílicos e aminoácidos, possuindo potencial de formar ligações com os metais pesados e assim exercendo função de tolerância e desintoxicação; O vacúolo e o fluxo de íons para a membrana plasmática são canais para diminuir os metais pesados no citoplasma, processo para tolerância aos metais; Os peptídeos metalotioninas e as fitoquelatinas podem ter um papel fundamental na homeostase, possivelmente relacionado com o transporte do metal dentro da célula vegetal. Esses peptídeos são sintetizados enzimaticamente em resposta a vários metais. As fitoquelatinas são rapidamente induzidas, sequestrando e inativando os íons metálicos que entram no citoplasma antes que essas possam inativar enzimas de vias

metabólicas essenciais (ALI et al., 2013; CARVALHO, 2009; COUTINHO; BARBOSA, 2007; HALL, 2002; WANG et al., 2016).

2.5 ESPÉCIES ARBÓREAS

As espécies arbóreas leguminosas exercem papel ecológico e podem melhorar a qualidade do solo pela capacidade de fixar N₂ em associação com microrganismos do solo (bactérias nitrificantes) (JESUS et al., 2014). Influenciam na quantidade e qualidade da matéria orgânica do solo e transformam importantes condições dos solos. Por adentrar profundamente no solo, via sistema radicular, essas plantas aumentam a extração de elementos químicos e alteram as condições microclimáticas do solo possibilitando aumento na umidade e aeração, além de favorecer o estabelecimento de diversos organismos edáficos que atuam no ciclo ecológico (CAIRES et al., 2011; CUNHA NETO, 2010).

A *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y.T. Lee & Langenh. Fabaceae – Caesalpinioideae (Leguminosae) planta semidecídua, heliófita ou esciófita, com altura variando de 15 – 20 metros. Sendo pouco exigente em questão de fertilidade e umidade dos solos. O jatobá, como é vulgarmente conhecido, é uma espécie nativa, pertence ao grupo sucessional das espécies secundárias tardias a clímax exigente à luz, sendo característico de interior de floresta primária (LORENZI, 2012). Por causa da ampla distribuição, o jatobá é uma espécie indicada para programas de recuperação de áreas florestais degradadas, isso por tolerância e adaptação à uma variada gama de ambientes (CARVALHO, 2003).

Peltophorum dubium (Spreng.) Taub. Fabaceae – Caesalpinioideae (Leguminosae) é uma planta decídua, heliófita. Ocorre preferencialmente em solos argilosos úmidos e profundos de beira de rios, tanto na floresta primária densa como em formações secundárias. Apresenta dispersão ampla e abundante. A altura pode variar de 15 – 25 metros. Nativa rústica e de rápido crescimento, conhecida vulgarmente como canafístula, faveira, sobrasil, entre outros (LORENZI, 2012). É uma espécie secundária, mas com algumas características de pioneira. A canafístula é muito utilizada como tutora de espécies secundárias-clímax, sombreadora e quebra-vento em pastagens. Planta rústica e com rápido crescimento, *P. dubium* é recomendada para a composição de reflorestamento em áreas degradadas de preservação permanente e muito empregada no paisagismo como planta ornamental (CARVALHO, 2003).

Silva et al. (2011) pesquisando o comportamento de três espécies arbóreas, dentre elas *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., em solos contaminados com cobre, discorrem que a

canafístula apresenta tendência de acúmulo do metal cobre nas raízes, e o excesso alto de cobre no solo reduz o desenvolvimento das mudas.

A espécie *Myroxylon peruiferum* L. f. é uma Fabaceae - Faboideae (Leguminosae) de acordo com Lorenzi (2012) possui como característica planta decídua, heliófila ou esciófita, pode ocorrer no interior da mata como nas formações secundárias. Conhecida popularmente como bálsamo, pau bálsamo ou óleo bálsamo, apresentando altura de 12 – 26 metros, com uma ampla distribuição geográfica. A categoria sussecional é considerada clímax. Não se associam com *Rhizobium*, apresenta incidência baixa de micorriza arbuscular. Essa espécie pode ser utilizada no paisagismo e em plantios de áreas degradadas (LORENZI et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Buscando a literatura, pode-se encontrar informações de que o excesso do cobre acarreta danos na fisiologia e morfologia dos vegetais, porém o conhecimento sobre as respostas morfofisiológicas e a tolerância de espécies arbóreas nativas tropicais expostas ao cobre ainda pouco explorado. E para o bom desempenho de programas de fitorremediação, o conhecimento do comportamento morfofisiológico e os mecanismos de tolerância ao metal são de suma importância, visto que até o presente momento pouco se sabe sobre essas características em espécies florestais.

A fitorremediação vem ganhando mérito na área de Ciências Ambientais, contudo o conhecimento de espécies tolerantes e os mecanismos utilizados por essas plantas para combater a toxidez dos metais como o cobre é de grande importância para o desenvolvimento da área, mas ainda é pouco explorado, principalmente se considerarmos espécies de regiões tropicais. As espécies deste trabalho são nativas brasileiras e são plantas arbóreas que apresentam qualidades na recuperação ambiental como estabilizadoras de solo. Mas pouco se sabe sobre a capacidade dessas espécies lenhosas em tolerar, absorver e acumular metais pesados.

Poucos trabalhos estudam as modificações na fisiologia e morfologia de plantas arbóreas florestais exposta ao cobre, pois na maioria dos estudos ocorrem o uso de espécies perenes de crescimento rápido. Assim, as informações trazidas neste artigo ajudarão a direcionar novos focos e linhas de pesquisa sobre estresse dos metais pesados. Visto que a grande problemática da poluição dos solos por metais pesados é crescente e podendo gerar riscos potenciais a vitalidade dos seres vivos e a qualidade ambiental devido alta persistência no ambiente desses elementos.

4 OBJETIVOS

Nesta seção, serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas morfofisiológicas e tolerância de espécies arbóreas expostas a diferentes concentrações de cobre.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as medidas biométricas de crescimento.
- b) Quantificar os teores de clorofila “a”, clorofila “b”, clorofila total e prolina.
- c) Verificar as respostas enzimáticas antioxidantes das espécies.
- d) Medir os parâmetros de trocas gasosas foliares nas plantas.
- e) Quantificar os teores de cobre nos diferentes compartimentos das plantas e no solo.
- f) Verificar alterações morfológicas no sistema radicular.

REFERÊNCIAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 1, p. 299-351, 2000.

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

ALI, H. et al. Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869-881, 2013.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley, 339p. 1993.

ANDRÉS-COLÁS, N. et al. Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in Arabidopsis seedlings. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1234-1246, 2013.

AUST, S. D. et al. Role of metals in oxygen radical reactions. **Journal of free radicals in biology & medicine**, v. 1, n. 1, p. 3-25, 1985.

BARÓN, M. et al. Changes in carotenoids and fatty acids in photosystem II of Cu-deficient pea plants. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p. 1-5, 1992.

BROADLEY, M. et al. Function of Nutrients: Micronutrients. In **Mineral Nutrition of Higher Plants**, 3rd ed.; Marschner, P., Ed.; Elsevier:London, p. 191– 248, 2012.

BURKHEAD, J. L. et al. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, n. 4, p. 799-816, 2009.

CAI, S. et al. Differential responses of root growth, acid invertase activity and transcript level to copper stress in two contrasting populations of *Elsholtzia haichowensis*. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 1, p. 76-91, 2014.

CAIRES, S. M. et al. Desenvolvimento de Mudas de Cedro-Rosa em Solo Contaminado com Cobre: Tolerância e Potencial para Fins de Fitoestabilização do Solo. **Revista Árvore**, v. 35, n. 6, p. 1181-1188, 2011.

CAMBROLLÉ, J. et al. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Cratz. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 57-64, 2011.

CAMBROLLÉ, J. et al. Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monopetalum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 12, p. 8839-8847, 2013.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1443-1452, 2001.

CARVALHO, P. E. R., **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1. 1039f. (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras). 2003.

CARVALHO, A. R. C. **Mecanismos de resposta a mercúrio em plantas sapal**. 2009. 123p. Dissertação Mestrado. Universidade de Aveiro. Departamento de Biologia – Métodos Biomoleculares Avançados. Aveiro – Portugal, 2009.

CETESB. **COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL**. Valores Orientados para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005. Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, n. 1, p. 103-117, 2007.

CUNHA NETO, F. V. **Qualidade do solo em área de *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula, *Acacia mangium* Wild, *Eucalyptus grandis* x *Eucaçyptus urophilla*, floresta secundária e pastagem, em Além Paraíba, MG**. 2010. 69p. Dissertação Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. Seropédica, RJ. 2010.

DALCORSO, G. et al. Nutrient metal elements in plants. **Metallomics**, v. 6, n. 10, p. 1770-1788, 2014.

DUCIC, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, 2005.

ENT, A.V. D. et al. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1-2, p. 319-334, 2013.

FREITAS, T. A. et al. Morphology, ultrastructure and mineral uptake is affected by copper toxicity in young plants of *Inga subnuda* subs. *luschnathiana* (Benth.) TD Penn. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15479-15494, 2015.

GAO, S. et al. Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedling exposed to mercury toxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1, p. 591-597, 2010.

GARCIA, L. et al. Mitochondria and copper homeostasis in plants. **Mitochondrion**, v. 19, p. 269-274, 2014.

GARCIA-MOLINA, A. et al. The intracellular Arabidopsis COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. **The Plant Journal**, v. 65, n. 6, p. 848-860, 2011.

GAUTAM, S. et al. In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L.(variety PBNS-12). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, p. 1-9, 2016.

GILL, M. Heavy metal stress in plants: a review. **International Journal**, v. 2, n. 6, p. 1043-1055, 2014.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 53-64, 2005.

GOMES, M. P. et al. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 5, p. 566-573, 2011.

HALL, J.L. Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11. 2002.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 3, p. 259-266, 2009.

HE, Z. L. et al. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, n. 2, p. 125-140, 2005.

JESUS, A. A. et al. Quality of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. seedlings in function of inoculation and natural nodulation in soils from southwest of Piauí, Brazil. **Revista de Ciências Agrárias (Portugal)**, v. 37, n. 2, p. 198-205, 2014.

KHATUN, S. et al. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, n. 3, p. 279-285, 2008.

KULIKOVA, A. L. et al. Effect of copper excess in environment on soybean root viability and morphology. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, n. 5, p. 836-843, 2011.

LEQUEUX, H. et al. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 673-682, 2010.

LYUBENOVA, L. et al. Comparative study on the impact of copper sulphate and copper nitrate on the detoxification mechanisms in *Typha latifolia*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 657-666, 2015.

LORENZI, H. 2012. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. Plantarum, 6ª ed. v. 1, 384 p. 2012.

MALIK, N.; BISWAS, A. K. Role of higher plants in remediation of metal contaminated sites. **Scientific Reviews and Chemical Communications**, v. 2, p. 141-146, 2012.

MARIANO, D. C.; OKUMURA, R. S. Aspectos agronômicos, uso pelo homem e mecanismos da fitorremediação: uma revisão. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.5, n. Edição Especial, p. 85-101, out. 2012.

MARQUES, M.; et al. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 35, p. 1-11, 2011.

MATEOS-NARANJO, E. et al. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 4, p. 459-465, 2008.

MATEOS-NARANJO, E. et al. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*:

Ecotoxicological implications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 136-142, 2013.

MERCHANT, S. S. et al. Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 578-594, 2006.

MUSARRAT, J. et al. Genotoxicity assessment of heavy metal - contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 20 p. 323–342, 2011.

NAGAJYOTI, P. C. et al. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010.

NAIR, P. M. G. et al. Copper oxide nanoparticle toxicity in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: physiological and molecular level responses of in vitro grown plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 11, p. 2947-2958, 2014.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

O'CONNELL, D. W. et al. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 6709-6724, 2008.

OLIVEIRA, D. L.; et al. Plantas Nativas do Cerrado: Uma Alternativa para Fitorremediação. **Estudos**, Goiânia, v. 36, n. 11/12, p. 1141-1159, nov./dez. 2009.

PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A. M. Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Plant Science**, v. 166, n. 6, p. 1497-1504, 2004.

PARDO, B. S. et al. Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. **Journal of Plant Research**, v. 127, p. 119-129, 2014.

PÄTSIKKÄ, E. et al. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1359-1367, 2002.

PAZ-FERREIRO, J. et al. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: A review. **Solid Earth**, v. 5, n. 1, p. 65-75, 2014.

PEREIRA, A. C. C.; et al. Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43. n. 4, 2012.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 15-39. 2005.

SAIER, M. H.; TREVORS, J. T. Phytoremediation. **Water, Air, Soil Pollution**, v. 205, p. 61-63, 2010.

SHIRDAM, Ravanbakhsh et al. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. **Phytoprotection**, v. 89, n. 1, p. 21-29, 2008.

SILVA, R. F. et al. Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 103-110, 2011.

STANKOVIC, S. et al. Biota as toxic metal indicators. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 63-84, 2014.

RAIJ, B. V. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 1997. 2ª ed. Rev. atual. Campinas, Instituto Agrônomo / Fundação IAC, 1997.

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

WANG, Q. Y. et al. Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees. **Environmental and Experimental Botany**, v. 123, p. 125-131, 2016.

YADAV, S. K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 167-179, 2010.

YOON, J.; et al. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**. v. 368, p. 456-464, 2006.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.17, n. 1, p. 145-156, 2005.

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

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1090-1109, 2013.

ZULPO, A. O Pensador. [20--]. Disponível em:
<<http://pensador.uol.com.br/frase/MTM2ODgyNQ/>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ARBÓREAS EXPOSTAS AO COBRE

AUTORES: Daniele Maria Marques, Dalvana de Sousa Pereira, Adriano Bortolotti da Silva, José Ricardo Mantovani, Marília Carvalho, Márcio Donizetti de Andrade, Thiago Corrêa de Souza

Artigo redigido conforme as normas da revista Environmental Science and Pollution Research.

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES ARBÓREAS EXPOSTAS AO COBRE

Daniele Maria Marques¹ • Dalvana de Sousa Pereira² • Adriano Bortolotti da Silva² • José Ricardo Mantovani² • Marília Carvalho¹ • Márcio Donizetti de Andrade² • Thiago Corrêa de Souza^{1*}

1: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, Instituto de Ciências da Natureza - ICN, Rua Gabriel Monteiro, 700. Telefone: +553 532 991 419, FAX: +553 532 991 419, CEP: 37130-000, Alfenas-MG, Brasil. E-mail: thiago.souza@unifal-mg.edu.com *autor para correspondência

2: Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Ciências Agrárias, Rod MG 39 Km 0, CEP: 37130-000, Alfenas-MG, Brasil.

RESUMO

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial aos vegetais, sendo cofator de várias enzimas e está envolvido em muitos processos biológicos essenciais, mas em excesso torna-se fitotóxico para as plantas, e pode causar várias alterações na morfofisiologia dos vegetais. A busca de plantas tolerantes é crucial para o desenvolvimento de programas de fitorremediação. Nesse contexto o objetivo dessa pesquisa foi avaliar as respostas fisiológicas e a tolerância de espécies arbóreas *Hymenaea courbaril* (Jatobá), *Peltophorum dubium* (Canafístula) e *Myroxylon peruiferum* (Óleo Bálsamo) expostas a diferentes concentrações de cobre no solo. O excesso do Cu no solo não afetou o crescimento vegetativo das três espécies, no entanto foi observado redução da clorofila com o aumento do cobre no solo. As espécies apresentaram sistema de defesa enzimático antioxidante (SOD, APX, CAT, GPX) em combate as espécies reativas de oxigênio (ERO). As enzimas SOD e APX apresentaram maior atividade em *H. courbaril* e *P. dubium*, enquanto nas plantas de *M. peruiferum* foi observado uma maior atividade na enzima APX, e todas as espécies exibiram mecanismo compensatório de defesa ao estresse oxidativo. O excesso do Cu acarretou em ambas as espécies limitação bioquímica da fotossíntese na maior concentração (400 mg Kg⁻¹), enquanto *M. peruiferum* apresentou, também, limitação estomática. As três espécies acumularam o Cu nas raízes como mecanismo de tolerância ao excesso de Cu visando preservar a aparelhagem fotossintética das folhas. Plantas de *M. peruiferum* absorveram menos Cu em seus tecidos, com característica de planta excludora de Cu. *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum* apresentaram tolerância e são indicadas para solos contaminados com cobre e a programas de fitorremediação como a fitoestabilização.

Palavras-chave: metal pesado, enzimas antioxidantes, trocas gasosas, fitotoxicidade, clorofila, prolina, cobre na raiz, fitorremediação.

1 INTRODUÇÃO

A poluição do cobre (Cu) nos solos devido a atividades antrópicas como o uso arbitrário de pesticidas, fungicidas, irrigação a base de águas de efluentes industriais, industrialização, urbanização, mineralização e uso de resíduos urbanos vem causando um aumento desordenado dos níveis desse elemento (Mateos-Naranjo et al. 2013). Concentrações elevadas do cobre na biosfera causam contaminação ambiental, devido ao seu potencial nocivo à qualidade ambiental e a vitalidade dos seres vivos, além da alta persistência no ambiente, podendo causar riscos potenciais na saúde humana (Nagajyoti et al. 2010; Ali et al. 2013; Stankovic et al. 2014).

Nas plantas, o cobre (Cu) é um micronutriente essencial para o crescimento dos vegetais, participando de reações biológicas importantes no transporte de elétrons na fotossíntese e respiração, atividade antioxidante, fixação do nitrogênio e no metabolismo de nutrientes, das proteínas e da parede celular (Yruela 2013; Garcia et al. 2014). No entanto, em excesso pode promover distúrbios fisiológicos, bioquímicos e morfoanatômicos nas plantas, provocando inibição do seu desenvolvimento (Sánchez-Pardo et al. 2014; Gautam et al. 2016). Pode causar estresse oxidativo nos vegetais devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) altamente tóxicos que danificam os lipídios e proteínas das membranas celulares, aminoácidos, ácidos nucleicos dos vegetais (Thounaojam et al. 2012), e gerando perdas de rendimento agrícola e redução da fertilidade dos solos (Gao et al. 2010; Adrees et al. 2015).

Em solos contaminados com Cu as plantas apresentam diferentes mecanismos para lidar com o estresse do metal. Algumas espécies de plantas adotam estratégias de exclusão para evitar a absorção excessiva e transportes de íons metálicos, e acumulam geralmente baixas concentrações de metais em suas raízes, mesmo quando cultivadas em solos altamente contaminados (Malik e Biswas 2012). Em contraste, as plantas acumuladoras podem acumular grandes quantidades de metais pesados em seus tecidos, mesmo na parte aéreas (Ali et al. 2013). Os vegetais exibem mecanismos para combater a toxidez dos metais como a membrana plasmática desempenhando uma importante função na homeostase dos metais, prevenindo ou reduzindo a entrada na célula dos íons metálicos (Ali et al. 2013). O vacúolo armazenando os íons metálicos para diminuir o seu excesso no citoplasma, processo para tolerância aos metais pesados (Wang et al. 2016). O espessamento das paredes das células da raiz (principalmente na exoderme e endoderme) que proporciona maior área de retenção de metais pesados, diminuindo sua translocação para a parte aérea (Adress et al. 2015).

Geralmente, o acúmulo do metal nos vegetais ocorre no sistema radicular como estratégia de tolerância para prevenir eficazmente a sua translocação para tecidos fotossintéticos (Cambrollé et al. 2013a).

A fitorremediação vem ganhando mérito na área de Ciências Ambientais, contudo o conhecimento de espécies tolerantes e os mecanismos utilizados por essas plantas para combater a toxidez dos metais como o cobre é de grande importância para o desenvolvimento da área, mas ainda é pouco explorado, principalmente se considerarmos espécies de regiões tropicais. As espécies deste trabalho são nativas brasileiras e são plantas arbóreas que apresentam qualidades na recuperação ambiental como estabilizadoras de solo. Mas pouco se sabe sobre a capacidade dessas espécies lenhosas em tolerar, absorver e acumular metais pesados. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar as respostas fisiológicas e a tolerância de três espécies arbóreas expostas a diferentes concentrações de cobre no solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de crescimento e delineamento experimental

O experimento foi realizado em vasos, em casa de vegetação, na Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas - MG, Brasil, situada nas coordenadas geográficas: 21° 25' 45" S, 45° 56' 50" W, e altitude média de 881m. Empregou-se solo da camada superficial (0-20 cm) de Cambissolo Háplico, distrófico, que foi seco ao ar, destorroado, peneirado em peneira de 4 mm de abertura de malha, homogeneizado, e caracterizado quimicamente (SILVA 1999) cujos valores são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização química inicial do solo utilizado no experimento.

pH (H ₂ O)	P (Mehlich)	K	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	SB*	V*	M.O.*	Zn	Fe	Mn	Cu
	mg dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³				%	g dm ⁻³	mg dm ⁻³			
5,2	7,5	2,1	35,9	11,4	1,0	49,4	60	26	1,1	29,7	19,8	2,3

* Soma de bases (SB); índice de saturação por bases (V); matéria orgânica (M.O.).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5x3 e quatro repetições, totalizando 60 unidades experimentais (vasos). Os tratamentos foram formados pela combinação de cinco concentrações de cobre: 0, 50, 100, 200 e 400 mg kg⁻¹ e três espécies florestais Jatobá - *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y.T. Lee &

Langenh, Canafístula - *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. e Óleo Bálsamo - *Myroxylon peruiferum* L. f.

Porções de 8 dm³ de solo foram transferidas para os vasos e foi efetuado transplântio das mudas das espécies florestais estudadas (1 muda por vaso). Por ocasião do transplântio, as mudas apresentavam cerca de 120 dias. As doses de Cu foram aplicadas por meio de solução, na superfície do solo de cada vaso, trinta dias após o transplântio das mudas, e foi empregada a fonte p.a. CuSO₄.5H₂O. Durante a condução do experimento, o controle da umidade do solo foi feito de dois em dois dias, por meio de pesagem dos vasos e reposição da água, para manter a umidade do solo a 70% da capacidade de retenção. O experimento foi conduzido no período de outubro de 2013 a fevereiro de 2014.

2.2 Medidas biométricas e de biomassa

No final de noventa dias de condução do experimento foram avaliadas as seguintes características das plantas: altura (H), diâmetro do caule (SD), massa seca da parte aérea (SDW) e massa seca da raiz (RDW). As medidas foram estabelecidas utilizando paquímetro e fita métrica. Para obtenção da massa seca, as folhas, caules e raízes foram lavadas e transferidas para estufa de circulação forçada de ar, a cerca de 60°C, até peso constante.

2.3 Teor de clorofila, enzimas antioxidantes e prolina

As análises dos teores das clorofilas e de prolina nas folhas totalmente expandidas foram realizadas, respectivamente, a partir da metodologia proposta por Arnon (1949) e Bates et al. (1973).

A realização da análise enzimática nas folhas foi de acordo com Souza et al. (2012a) e os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises de todas as enzimas. As atividades das enzimas foram avaliadas espectrofotometricamente e expressas por miligramas (mg) de proteínas que foram determinadas pelo método de Bradford (1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovina (BSA).

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm por 3 minutos (Havir e Mchale 1987). A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do

ascorbato a 290 nm por 3 minutos (Nakano e Asada 1981). A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX, EC 1.11.1.7) foi determinada pela oxidação do guaiacol a 470 nm segundo Lin e Wang (2002) com modificações.

Todas essas análises foram realizadas ao término dos noventa dias de experimento.

2.4 Trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram medidos usando um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, modelo LI-6400XT, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EUA) no final do experimento aos 90 dias. As medições foram realizadas no período da manhã 09:00 - 11:00 horas em uma folha totalmente expandida, na *H. courbaril* e *M. peruiiferum* no quarto nó contando a partir da região apical, e *P. dubium* no quarto folíolo do quarto nó contando a partir da região apical. Os parâmetros avaliados foram a taxa de fotossíntese foliar (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração de CO₂ intercelular (C_i), eficiência do uso da água (A/E) e a eficiência de carboxilação (A/C_i). As medições foram realizadas em uma área de folha de 6 cm² e o fluxo de ar na câmara foi com uma concentração de CO₂ de 380 mmol mol⁻¹. O ar foi coletado de fora da estufa e transportado para um galão de buffer e, em seguida bombeado para a câmara. Foi utilizado uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) de 1000 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, com fonte de luz LED azul-vermelho e a temperatura da câmara foi de 28°C.

2.5 Teor de Cu no solo, nas plantas e índices

Após a colheita das plantas, o solo foi retirado de cada vaso, homogeneizado e foi coletada amostra para determinação dos teores disponíveis de Cu, extraídos por DTPA (Raij et al. 2001). A matéria seca das diferentes partes das espécies florestais (raízes, caule e folhas) foi moída em moinho do tipo Willey. Nas amostras dos tecidos das plantas foi realizada determinação dos teores de Cu de acordo com Carmo et al. (2000). O Cu acumulado nas diferentes partes das plantas foi obtido a partir da multiplicação do teor de Cu no tecido vegetal e da matéria seca (mg planta^{-1}) e o teor de cobre nos tecidos das plantas foi expressado por mg Kg^{-1} .

Alguns índices foram calculados para avaliar a tolerância das espécies para com o Cu e a capacidade de acumular esse metal. O fator de translocação (TF) indica a capacidade da planta em translocar metais a partir das raízes para a parte aérea, calculado como: TF =

$As/Ar*100$, onde As (mg kg^{-1}) representa o Cu total acumulado na parte aérea e Ar (mg kg^{-1}) representa o total acumulado Cu nas raízes (Shi et al. 2011).

O índice de tolerância (TI) baseia-se na produção de biomassa (Shi et al. 2011) e foi utilizado para avaliar a tolerância das três espécies estudadas para cada concentração de Cu. O índice foi calculado como: $TI = Bt/Bc$, onde Bt (g/planta) representa a biomassa de plantas cultivadas em solos com Cu e Bc (g/planta) representa a biomassa de plantas controle.

O fator de bioconcentração (BCF) corresponde a relação entre o metal presente nas raízes e a quantidade de metal presente no solo, calculado como: $BCF = Cr/Csoil$, onde Cr (mg kg^{-1}) representa a concentração de metais na raiz e $Csoil$ (mg kg^{-1}) representa a concentração de metais no solo disponível para as plantas (Branzini et al. 2012).

2.6 Análises dos dados

Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias e o \pm erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, com o emprego do programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil) quando não houve significância na análise de regressão. O cobre bioacumulado nas plantas e o cobre no solo foram determinados por análise de regressão linear e não linear utilizando o programa TableCurve 2D versão 5.01.

3 RESULTADOS

3.1 Medidas biométricas e de biomassa

Os parâmetros biométricos foram semelhantes estatisticamente para as concentrações nas três espécies estudadas (Tabela 2) ($p < 0,05$). *H. courbaril* apresentou nos diferentes tratamentos altura média de ($H=74,00\text{cm}$), diâmetro do caule ($SD=1,17\text{cm}$), massa seca da parte aérea ($SDW=30,87\text{g}$) e massa seca da raiz ($RDW=12,63\text{g}$). Em *P. dubuim* foi observado $78,65\text{ cm}$ (H), $1,92\text{ cm}$ (SD), $72,60\text{ g}$ (SDW) e $35,64\text{ g}$ (RDW). Nas plantas de *M. peruiferum*, para as diferentes variáveis, as médias foram: $124,30\text{ cm}$ (H), $1,49\text{ cm}$ (SD), $48,85\text{ g}$ (SDW) e $19,20\text{ g}$ (RDW) (Tabela 2).

Tabela 2 Altura das plantas (H), diâmetro do caule (SD), massa seca da parte aérea (SDW), massa seca da raiz (RDW), das espécies *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum* cultivadas em solo com Cu.

Species	Cu (mg Kg ⁻¹)	H (cm)*	SD (cm)*	SDW (g)*	RDW (g)*
<i>H. courbaril</i>	0	72,50 ± 5,06	1,10 ± 0,03	27,98 ± 8,28	13,13 ± 2,95
	50	75,00 ± 7,61	1,13 ± 0,13	34,02 ± 3,65	11,38 ± 2,47
	100	75,75 ± 7,08	1,17 ± 0,27	30,06 ± 11,44	12,97 ± 5,81
	200	79,00 ± 7,34	1,25 ± 0,08	33,48 ± 3,43	12,86 ± 1,82
	400	67,75 ± 2,63	1,21 ± 0,21	28,83 ± 11,67	12,81 ± 6,94
Média (X̄)	--	74,00 ± 4,20	1,17 ± 0,06	30,87 ± 2,73	12,63 ± 0,71
<i>P. dubium</i>	0	77,75 ± 5,18	1,93 ± 0,09	69,76 ± 8,11	34,12 ± 3,10
	50	75,75 ± 8,80	1,87 ± 0,18	69,19 ± 10,50	34,25 ± 0,70
	100	78,00 ± 7,52	1,88 ± 0,19	75,12 ± 9,93	32,44 ± 4,73
	200	82,00 ± 5,09	1,96 ± 0,08	71,43 ± 6,52	38,50 ± 2,51
	400	79,75 ± 5,73	1,94 ± 0,11	77,46 ± 5,20	38,90 ± 9,50
Média (X̄)	--	78,65 ± 2,35	1,92 ± 0,04	72,60 ± 4,57	35,64 ± 2,88
<i>M. peruiferum</i>	0	118,25 ± 3,94	1,48 ± 0,03	49,05 ± 7,53	18,32 ± 3,51
	50	128,75 ± 14,26	1,40 ± 0,26	50,44 ± 6,01	17,88 ± 2,46
	100	122,50 ± 6,45	1,46 ± 0,20	49,83 ± 5,08	21,92 ± 4,92
	200	141,50 ± 14,15	1,68 ± 0,23	54,80 ± 4,76	19,14 ± 4,08
	400	110,50 ± 15,86	1,45 ± 0,06	40,14 ± 12,86	18,73 ± 4,20
Média (X̄)	--	124,30 ± 11,68	1,49 ± 0,11	48,85 ± 5,36	19,20 ± 1,59

Cada valor indica a média por tratamento ± SE (n.4); ns: Não houve diferença estatística pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2 Teor de clorofila, enzimas antioxidantes e prolina

O teor de clorofila “a” apresentou pico na concentração de Cu de 100 mg Kg⁻¹ em todas as espécies arbóreas estudadas e, nas concentrações seguintes (200 e 400 mg Kg⁻¹) foi observado redução do teor desse pigmento nas plantas (Fig. 1a). Com relação a clorofila “b” não foi observado um comportamento comum entre as espécies estudadas. Em *H. courbaril* o teor de clorofila “b” reduziu a partir da concentração de 50 mg Kg⁻¹. Já *M. peruiferum* foi observado a redução da clorofila “b” a partir de 100 mg Kg⁻¹. Para todas as espécies pesquisadas foi observada diminuição do teor de clorofila “b” na concentração de 400 mg Kg⁻¹. As curvas do teor de clorofila total apresentaram comportamento semelhante ao observado para a clorofila “b” (Fig. 1b e c).

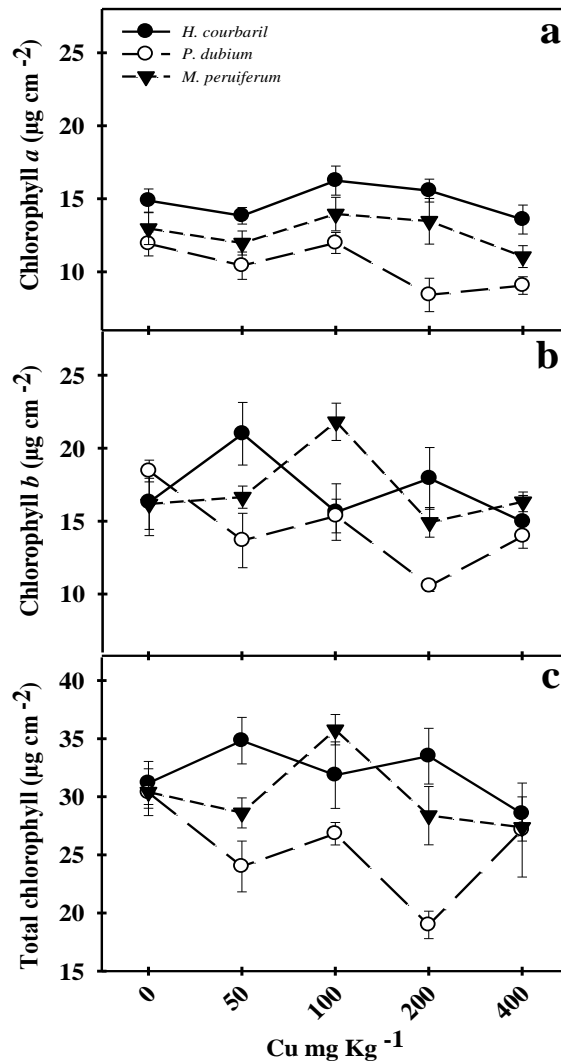


Fig. 1 Teor de clorofila a (a), clorofila b (b) e clorofila total (c) para as espécies *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiiferum* cultivadas em solo com Cu. Cada valor indica a média por tratamento \pm SE.

Plantas de *H. courbaril* com o aumento do Cu no solo apresentaram alta atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) com pico de atividade para essa espécie na concentração de 200 mg Kg⁻¹, sendo inibida na maior concentração (400 mg Kg⁻¹) (Fig. 2a). As enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e a catalase (CAT) mantiveram atividade semelhante ao controle com o aumento de Cu no solo (Fig. 2b e c). Vale ressaltar que a peroxidase do guaiacol (GPX) não apresentou atividade (Fig. 2d) para essa espécie.

Em *P. dubium* observou-se alta atividade da SOD na concentração de 200 mg Kg⁻¹, sendo inibida na concentração seguinte (400 mg Kg⁻¹), e a atividade da APX e CAT mantiveram semelhante ao controle (Fig. 2a, b e c). A enzima GPX também não apresentou atividade nessa espécie (Fig. 2d). Dessa forma, percebe-se que a SOD e a APX foram as

principais enzimas responsáveis pela eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO) para essa espécie quando comparada as demais enzimas (Fig. 2a e b).

As plantas de *M. peruiferum* apresentaram maior atividade da APX, sobretudo nas maiores concentrações de Cu (Fig. 2b). A SOD e a CAT apresentaram atividade constante, semelhante ao controle (Fig. 2a e c). A atividade da GPX foi inibida com o aumento do Cu no solo (Fig. 2b e d). Para essa espécie a APX foi a principal enzima em combater o estresse oxidativo (Fig. 2b).

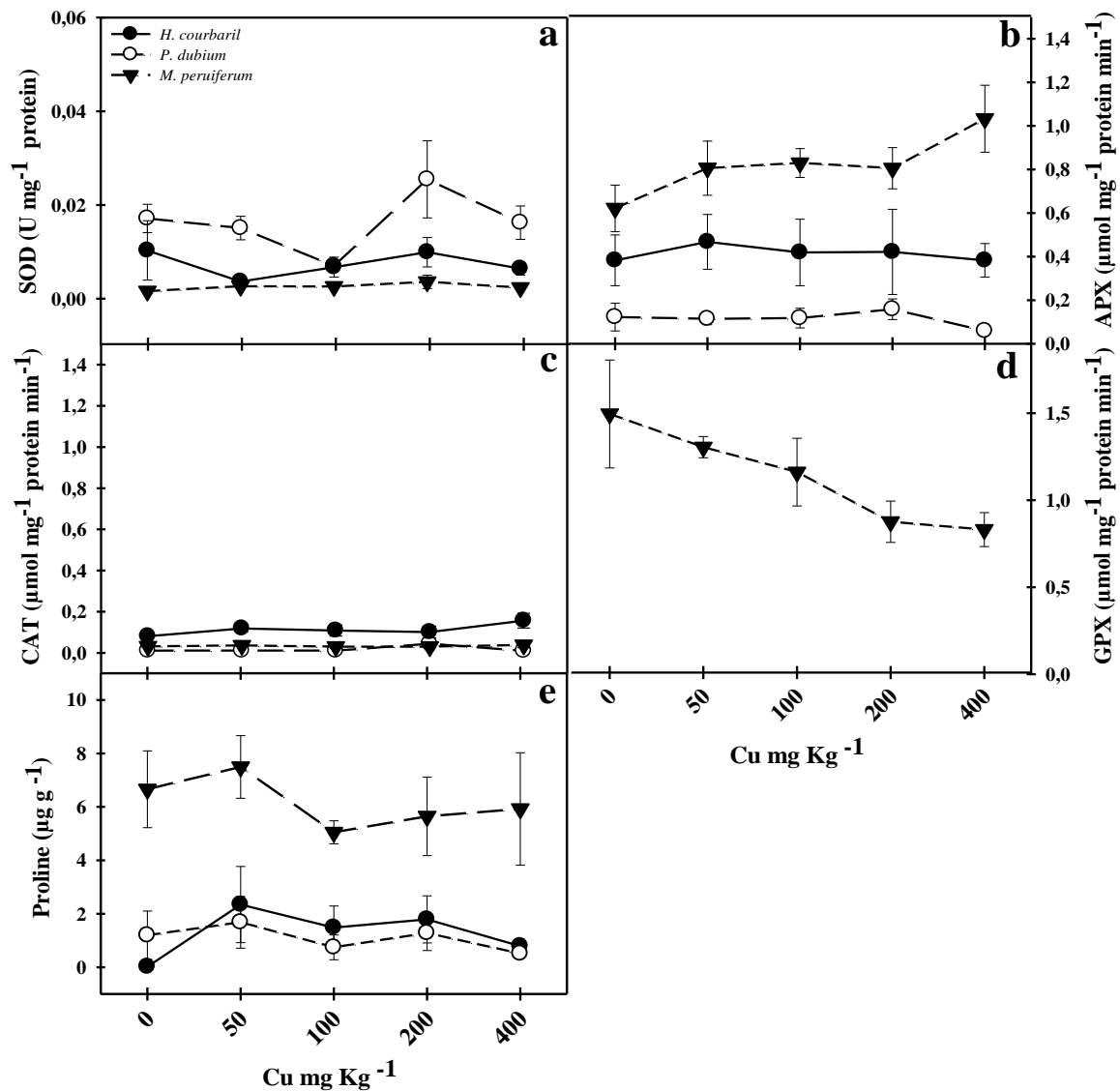


Fig. 2 Atividade das enzimas antioxidantes (a) dismutase do superóxido (SOD), (b) peroxidase do ascorbato (APX), (c) catalase (CAT), (d) peroxidase do guaiacol (GPX) e teor de prolina (e) das espécies *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum* cultivadas em solo com Cu. Cada valor indica a média por tratamento \pm SE.

O teor de prolina para *H. courbaril* seguiu tendência de aumento até a concentração (50 mg Kg⁻¹) e nas demais concentrações de Cu, um ligeiro decréscimo (Fig. 2e). Não foi

observada em *P. dubium* grandes variações de prolina com o acréscimo de cobre no solo (Fig. 2e). A *M. peruiiferum* obteve valores mais elevados de prolina e pode ser observado que o maior teor de prolina foi na concentração de 50 mg Kg⁻¹ de cobre aplicado no solo (Fig. 2e).

3.3 Trocas gasosas foliares

Em relação às trocas gasosas foliares, as três espécies em estudo apresentaram maior taxa de fotossíntese (A) na concentração (100 mg Kg⁻¹) e nas concentrações subsequentes o cobre influenciou negativamente a fotossíntese por apresentar aparente declínio da taxa fotossintética (Fig. 3a).

Em *H. courbaril* e *P. dubium* ocorreu aumento na condutância estomática com o aumento do cobre no solo, mas as médias das duas espécies na maior concentração (400 mg Kg⁻¹) ficaram similares ao controle (0 mg Kg⁻¹) (Fig. 3b). Já em *M. peruiiferum*, a condutância estomática diminuiu com o aumento da aplicação do Cu no solo, exceto para a concentração (100 mg Kg⁻¹) (Fig. 3b).

Com relação ao carbono interno (C_i), percebe-se um aumento nas três espécies na concentração (400 mg Kg⁻¹) (Fig. 3c). Em *H. courbaril* houve aumento do C_i na concentração (50 mg Kg⁻¹) mantendo-se no mesmo patamar até a concentração de (200 mg Kg⁻¹). Já em *M. peruiiferum* foi observado aumento C_i na dose (50 mg Kg⁻¹), seguido de queda até (200 mg Kg⁻¹) (Fig. 3c) e na espécie *P. dubium* foi evidenciado a mesma tendência observada na condutância estomática (Fig. 3b e c).

As taxas de transpiração (E) seguiram a mesma tendência observada no parâmetro condutância estomática (g_s) para as espécies em estudo (Fig. 3b e d). A espécie *M. peruiiferum* diminuiu a transpiração com o aumento do cobre no solo, observando declínio acentuado na concentração de 400 mg Kg⁻¹ (Fig. 3d), o que difere das demais espécies onde foi encontrado um aumento na maior concentração (Fig. 3d).

Na eficiência do uso da água (A/E), as plantas cultivadas no solo com Cu (400 mg Kg⁻¹), foi afetada negativamente em *H. courbaril* e *P. dubium* (Fig. 3e). Entretanto, em *H. courbaril* obervou-se diminuição no A/E com o aumento das concentrações de Cu aplicadas no solo (Fig. 3e). A espécie *P. dubium* apresentou aumento do A/E com o aumento das concentrações de cobre até a dose 200 mg Kg⁻¹ (Fig. 3e). As plantas de *M. peruiiferum* crescendo nos diferentes tratamentos, com relação ao A/E, tiveram comportamento semelhante ao controle (Fig. 3e), com pequeno declínio na maior concentração (400 mg Kg⁻¹).

Em relação à eficiência de carboxilação (A/C_i), *H. courbaril* apresenta declínio com o aumento das concentrações de Cu no solo (Fig. 3f). Já as plantas de *P. dubium* e *M. peruiferum* apresentaram comportamento semelhante, com aumento do A/C_i até a concentração de 200 mg Kg^{-1} de Cu, entretanto, houve diminuição desse parâmetro no tratamento (400 mg Kg^{-1}) (Fig. 3f).

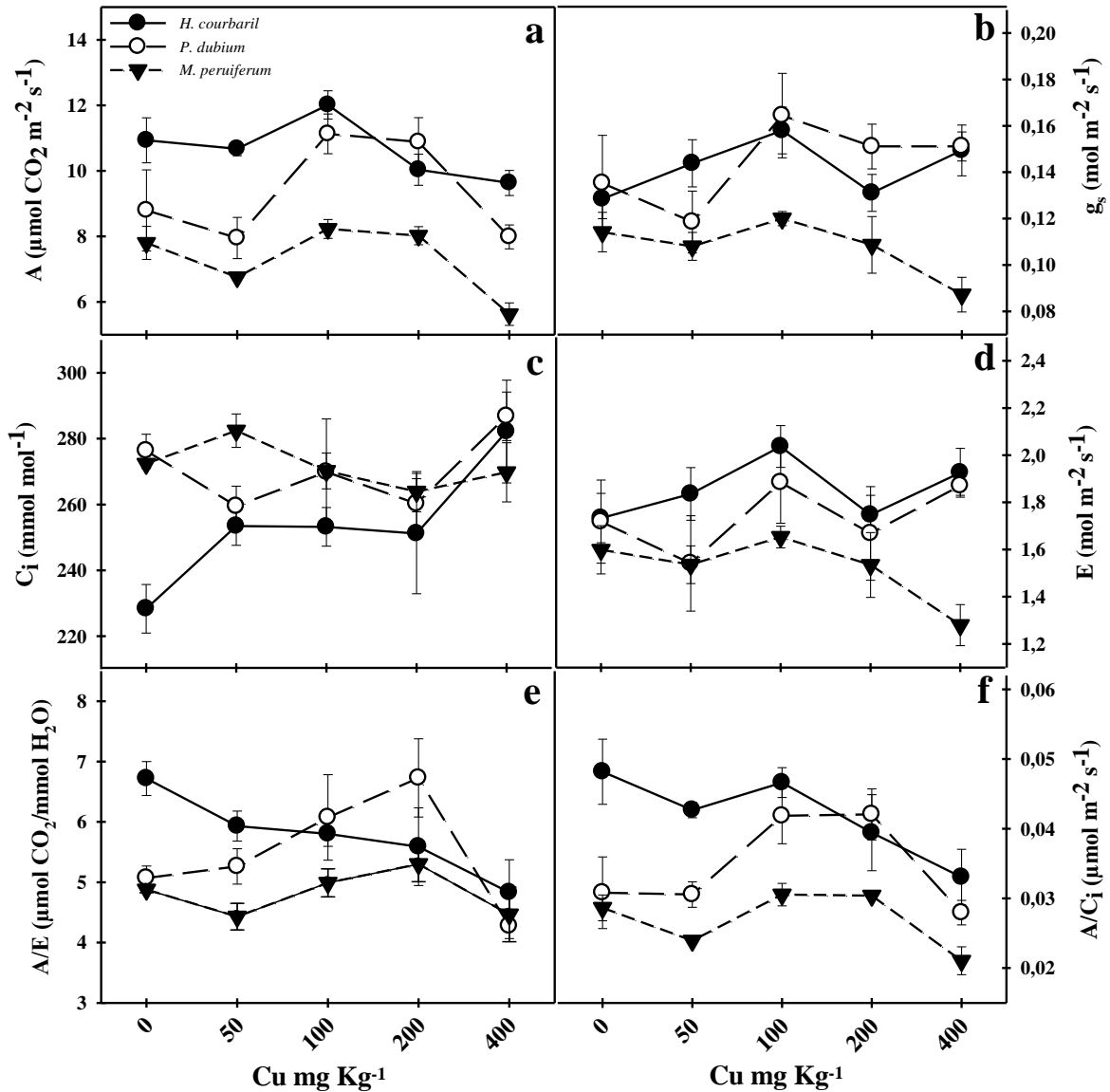


Fig. 3 Trocas gasosas em *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum* (a) taxa fotossintética (A); (b) condutância estomática (g_s); (c) CO_2 carbono interno (C_i); (d) transpiração (E); (e) uso eficiente da água (A/E) (f) eficiência de carboxilação (A/C_i) em solos com Cu. Cada valor indica a média por tratamento \pm SE.

3.4 Teor de Cu no solo, nas plantas e índices

O teor de cobre no solo aumentou com as concentrações aplicadas (Fig. 4). O comportamento das três espécies com relação ao Cu no solo foi semelhante até a concentração

(100 mg Kg⁻¹). As plantas da espécie *P. dubium* crescendo no tratamento (400 mg Kg⁻¹) apresentaram menor teor de Cu no solo, sendo seguida respectivamente, pelas plantas das espécies *H. courbaril* e *M. peruiferum* (Fig. 4). Para as plantas *H. courbaril* crescendo nos diferentes tratamentos, o cobre no solo variou de 2,72 a 138,88 mg Kg⁻¹, *P. dubium* variou de 3,12 a 81,90 mg Kg⁻¹ e na *M. peruiferum* variou de 3,23 a 109,78 mg Kg⁻¹ (Fig. 4).

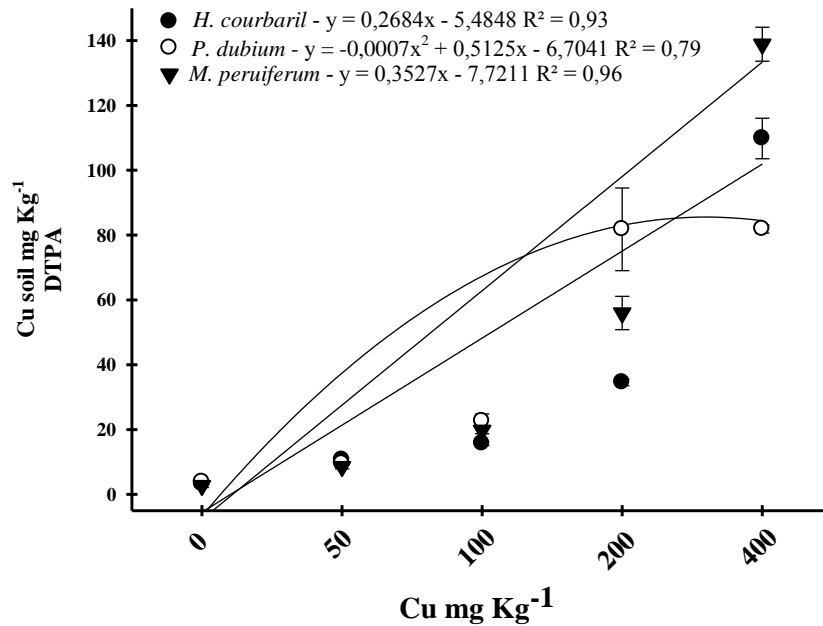


Fig. 4 Teores de cobre no solo após a colheita das espécies *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum* em função das concentrações de Cu. Cada valor indica a média do tratamento \pm SE.

Em relação ao teor total de cobre, as plantas de *H. courbaril* apresentaram aumento linear desse elemento químico nos tecidos com o aumento das concentrações de cobre no solo (Fig. 5a). *P. dubium* teve comportamento de crescimento quadrático com aumento das doses de Cu no solo (Fig. 5a), sendo a espécie que apresentou maior bioacumulação de Cu em seus tecidos, principalmente na raiz, atingindo 4,47 mg Kg⁻¹ (Fig. 5b). Já *M. peruiferum* apresentou comportamento quadrático com aumento das concentrações de Cu no solo, sendo a espécie com menor bioacumulação (Fig. 5b).

A espécie *P. dubium* apresentou menores teores de Cu nos diferentes compartimentos da planta quando comparado com a *H. courbaril* (Fig. 5a), no entanto o comportamento para o Cu bioacumulado foi inverso, ou seja, maior bioacumulação de Cu na planta foi observado na *P. dubium* (Fig. 5b), que pode estar relacionado a maior biomassa (Tabela 2).

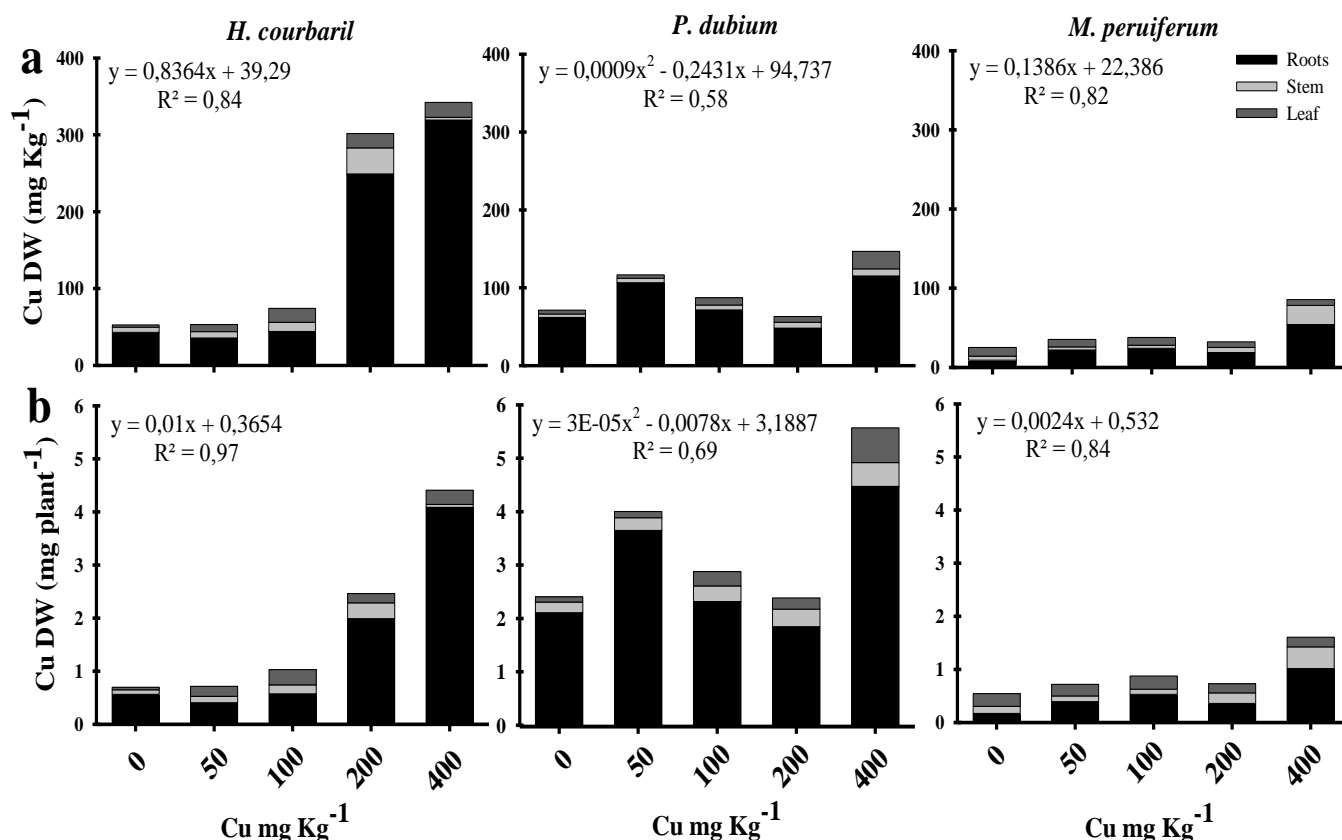


Figura 5 Teor de Cu nos tecidos raiz, caule e folha (A) e concentração do Cu bioacumulado nos diferentes órgãos da planta (B) de *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum*. Cada valor indica a média do tratamento \pm SE.

De maneira geral, a bioacumulação do cobre nas espécies ocorreu no sistema radicular das plantas (Fig. 5b), sendo que no tratamento Cu (400 mg Kg⁻¹), em *H. courbaril* correspondeu a 4,39 mg Kg⁻¹, *P. dubium* 5,56 mg Kg⁻¹ e *M. peruiferum* 1,56 mg Kg⁻¹ da biomassa total (Fig. 5b). Houve distribuição diferenciada de Cu nos órgãos dos diferentes tratamentos, onde *H. courbaril* apresentou 56 a 92% do cobre retido nas raízes, sendo observado o mesmo comportamento para a *P. dubium* (77-91%) (Fig. 5b). No entanto, *M. peruiferum* diferenciou-se das demais espécies estudadas por ter apresentado nas folhas maiores teores do Cu bioacumulado (11-44%), mostrando uma maior translocação do Cu para a parte aérea (Fig. 5b).

H. courbaril e *P. dubium* apresentaram fator de translocação (TF) inferior a 31,5% nas maiores concentrações de Cu (200 e 400 mg Kg⁻¹) (Tabela 3). Já *M. peruiferum* apresentou valores de translocação superiores 56% para todas as doses de Cu testadas (Tabela 3). No índice de tolerância (TI) as espécies pesquisadas apresentaram valores semelhantes entre os diferentes tratamentos, com queda nesse índice para as plantas crescendo no tratamento (400

mg Kg⁻¹) (Tabela 3). O fator de bioconcentração (BCF) foi maior para *H. courbaril*, sendo seguido pela *P. dubium* e *M. peruiiferum* (Tabela 3).

Tabela 3 Fator de translocação (TF), Índice de tolerância (TI) e Fator de bioconcentração (BCF) de cobre para espécies *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiiferum* cultivadas em solo com Cu.

	<i>H. courbaril</i>				<i>P. dubium</i>				<i>M. peruiiferum</i>			
	----- Cu mg kg ⁻¹ -----				----- Cu mg kg ⁻¹ -----				----- Cu mg kg ⁻¹ -----			
	50	100	200	400	50	100	200	400	50	100	200	400
TF	72,50	68,04	21,07	7,16	9,32	21,89	31,48	27,70	60,14	56,37	72,49	58,11
TI	1,10	1,16	1,03	0,82	0,99	1,03	1,05	0,85	0,98	1,04	1,06	0,87
BCF	0,71	0,44	1,24	0,80	2,13	0,71	0,24	0,29	0,44	0,24	0,09	0,13

4 DISCUSSÃO

Elevadas concentrações de cobre são potencialmente tóxicas para a maioria das plantas. Entretanto, no presente trabalho não foi observado sintomas visíveis de toxicidade de Cu, tais como clorose causada por danos nas membranas dos tilacóides (Adrees et al. 2015). No período estudado também não foi notado inibição do crescimento das plantas mesmo nas altas concentrações de Cu. Estes resultados são semelhantes ao encontrado por Cambrollé et al. (2013b).

As espécies em estudo apresentaram diminuição nos teores de clorofila “a”, “b” e total nas concentrações elevadas de Cu. Diversos autores (Mateos-Naranjo et al. 2008; Gomes et al. 2011; Yruela 2013; Nair et al. 2014; Adress et al. 2015) relataram o efeito do excesso de cobre sobre a clorofila resultando em degradação desse pigmento, o que assemelha-se com os resultados encontrados nessa pesquisa. Entretanto, é interessante ressaltar que em plantas tolerantes o conteúdo de clorofila pode aumentar ou não sofrer alterações significativas em resposta ao tratamento com metais (Borghi et al. 2008).

O excesso de Cu pode causar estresse oxidativo nos vegetais, devido ao aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) altamente tóxicos. As espécies reativas de oxigênio (ERO), como radicais de superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]) causam danos às proteínas e lipídios das membranas celulares dos vegetais (Thounaojam et al. 2012; Sánchez-Pardo et al. 2014). Para combater a produção de ERO as plantas apresentam mecanismos antioxidantes que incluem as enzimas antioxidantes, como a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e

peroxidase do guaiacol (GPX) que impede desse modo, danos oxidativos (Adress et al. 2015). É interessante notar que frente às enzimas as espécie estudadas apresentaram mecanismo compensatório de defesa ao estresse oxidativo (Cargnelutti et al. 2006), contribuindo para a tolerância ao cobre, onde para as espécies *H. courbaril* e *P. dubium*, a SOD e APX foram as principais enzimas responsáveis em combater um possível estresse oxidativo. O aumento da atividade da enzima SOD pode ser atribuído ao acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) induzido pelo cobre, considerada a primeira ERO formada na qual a SOD participa da primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (Gill e Tuteja 2010). A remoção do radical superóxido pode prevenir a formação de radicais hidroxila antes de sua interação com moléculas-alvo (Xu et al. 2013). Após a formação do H_2O_2 pela enzima SOD, a APX juntamente com a CAT são as principais enzimas responsáveis pelo processo de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, formando produtos não tóxicos à célula (Sharma et al. 2012). Com isso, a coordenação adequada da atividade da SOD, CAT e peroxidases é fundamental para manter o equilíbrio entre produção e remoção de OH^\bullet . A APX é a principal enzima do ciclo ascorbato-glutationa, que sequestra H_2O_2 formando água como produto final (Asada e Takahashi 1987), já a CAT é uma proteína que catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Frugoli et al. 1996). Para as plantas de todas as espécies pesquisadas a APX exerceu papel principal na remoção da ERO quando comparada a CAT. Independentemente da espécie estudada, a atividade da enzima APX foi maior quando comparada a enzima CAT, isso ocorre porque, embora a CAT tenha uma alta especificidade pelo H_2O_2 , a sua afinidade é menor quando comparada a APX (Meng et al. 2007; Sharma et al. 2012), sendo menos eficiente em remover o H_2O_2 , isso explica a menor atividade da CAT em relação a APX. Além disso, a APX está mais amplamente distribuída na célula o que resulta no aumento de sua eficiência (Willekens et al. 1995). As enzimas de todas as espécies apresentaram mecanismo compensatório no qual houve aumento da atividade da APX e redução da GPX com o aumento da concentração do cobre. Lyubenova et al. (2015) relataram aumento da APX em concentrações crescente de Cu em *Typha latifolia*. Entretanto, a atividade das enzimas antioxidantes pode ser aumentada até um certo nível e, em seguida, diminuir devido a inibição enzimática pelo aumento do estresse oxidativo (Adress et al. 2015), sendo observado esse comportamento nas plantas de *P. dubium* na concentração mais elevada de Cu.

A prolina pode desempenhar diferentes funções em resposta ao estresse abiótico nas plantas, dentre elas a de osmoprotetora destacando-se no papel de proteção das membranas contra os efeitos deletérios, causados por excesso de metais pesados. Geralmente, ocorrem

teores elevados dessas substâncias em condições de estresse (Gautam et al. 2016). A *M. peruvianum* apresentou maiores teores de prolina no tecido foliar em relação às demais espécies. Esse resultado provavelmente se explica pela prolina funcionar com um recurso para a desintoxicação das ERO, protegendo e estabilizando as enzimas e ativar vias de desintoxicação alternativas (Szabados e Savoure 2010). Já *H. courbaril* e *P. dubium* apresentaram tendência linear de diminuição da prolina em relação aos tratamentos, possivelmente por essas espécies terem alocado mais cobre em suas raízes não permitindo a sua translocação para as folhas.

A exposição das três espécies a concentração de 100 mg Kg^{-1} Cu não afetou negativamente a fotossíntese (A), mostrando efeito benéfico para as plantas, possivelmente como um micronutriente dentro dos limites favoráveis (Souza et al. 2014) e pelo Cu ser componente da plastocianina, apresentando assim, participação direta no transporte de elétrons entre PS II e PS I na fase fotoquímica da fotossíntese (DalCorso et al. 2014). Outra possível explicação para a A alta é a relação dependente do aumento na condutância estomática (g_s), estômato aberto maior fixação de CO_2 o que resulta em maior fotossíntese.

O estresse abiótico causado pelo excesso de cobre pode acarretar danos nos fotossistemas, resultando no declínio da fotossíntese (Bazihizina et al. 2015; Küpper e Andresen 2016). A fotossíntese das três espécies em estudo apresentou efeito negativo ao excesso do Cu, sobretudo na concentração mais elevada (400 mg Kg^{-1}). O declínio em A pode ser atribuída a limitação estomática ou não-estomática (Cambrollé et al. 2013b). As plantas de *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruvianum* apresentaram limitação não-estomática ou bioquímica quando se observa redução da A e o aumento da concentração de CO_2 intercelular (C_i) no mesófilo, possivelmente devido a redução das taxas de assimilação de CO_2 pela inibição das enzimas carboxilativas (por exemplo a rubisco) (Mateos-Naranjo et al. 2013). Outra provável explicação para declínio em A é a desnaturação das proteínas do complexo antena ou da inibição direta do centro de reações FSII pela inserção de Cu em feofitina (Yruela 2009) e o subsequente comprometimento da doação de elétrons do PSII (Bazihizina et al. 2015), bem como na redução do teor de clorofila nas folhas em 400 mg Kg^{-1} . Outra possível explicação para efeito/limitação não-estomática que ocorrem nessas plantas é o aumento da fluorescência (Zhang et al. 2013), que pode levar a diminuição da fotossíntese nas maiores concentrações de Cu. Já em *M. peruvianum* a redução de A pode ser atribuída também, a limitação estomática devido ao fechamento dos estômatos (diminuição da g_s) no maior teor de Cu aplicado no solo (Bazihizina et al. 2015). A diminuição da A com o aumento do Cu no solo corrobora com vários trabalhos encontrados como em Souza et al. (2014) em

cacao (*Theobroma cacao*) e em Cambrollé et al. (2011) em *Glaucium flavum* que descreveram o efeito adverso do excesso de cobre na fotossíntese dessas espécies.

A diminuição da transpiração (E) com o aumento de cobre no solo em *M. periferum* pode ter influenciado a menor a concentração de cobre nos tecidos dessa planta, já que a sua translocação da raiz para a parte aérea está diretamente relacionada com o fluxo transpiratório (Bazihizina et al. 2015). Esse fato também pode ser explicado devido *M. periferum* apresentar maior teor de prolina em seus tecidos, mesmo havendo declínio desse aminoácido a partir da concentração de 50 mg Kg⁻¹, que apresenta funções como de regulação osmótica, ou seja, agindo no equilíbrio do balanço hídrico, proteção contra a desnaturação das enzimas, bem como a estabilização de síntese de proteína nas células, quelação de metais, prevenção da fotoinibição (Gill et al. 2014).

No geral, a eficiência do uso da água (A/E) foi afetada para ambas as espécies estudadas na maior concentração de Cu (400 mg Kg⁻¹). Mas em plantas de *H. courbaril* percebe-se diminuição acentuada com o aumento do Cu e em *P. dubium* um aumento até (200 mg Kg⁻¹). Plantas que passam por estresse abiótico, como o hídrico por exemplo, são mais tolerantes quando apresentam maior A/E (Tomás et al. 2014). Assim, em um possível uso futuro dessas plantas em programas de fitorremediação, plantas de *P. dubium* poderiam tolerar mais as variações ambientais como a seca, levando a um melhor desempenho. A tolerância a estresses abióticos de plantas é um fator crucial em programas de fitorremediação.

Ao analisar a eficiência de carboxilação (A/C_i) pode-se observar que *H. courbaril* e *P. dubium* têm a relação A/C_i reduzida com o aumento da concentração de cobre, em especial na concentração 400 mg Kg⁻¹, esse fato ocorre porque essas plantas possuem maior condutância estomática e maior transpiração. Isso favorece a translocação do Cu para a parte aérea ocasionando um estresse nas folhas, inibição das enzimas fotossintéticas (limitação bioquímica) com acúmulo de gás carbônico no mesófilo (C_i). Por outro lado, nessa mesma concentração as plantas de *M. periferum* fecham os estômatos (g_s), reduzindo a transpiração (E) e conseqüentemente, a fotossíntese (A) levando a redução da relação A/C_i pelo fato dessas plantas possivelmente pararem de assimilar carbono, devido a limitação estomática. Bazihizina et al. (2015) encontraram declínio na A da *Silene paradoxa* L. devido a limitação estomática na população sensível e limitação bioquímica na população tolerante quando exposta ao cobre.

A absorção do metal pelo vegetal depende da disponibilidade dos metais do solo e da exigência fisiológica da planta (DalCorso et al. 2014). Devido ao cobre ser um micronutriente essencial aos vegetais, é prontamente absorvido pelas raízes das plantas. Observa-se que as

três espécies estudadas foram capazes de extrair o Cu a partir do solo e concentra-lo em todos os órgãos examinados: folhas, caules e nas raízes. Com destaque para a *H. courbaril* e *P. dubium* onde a bioacumulação do cobre, principalmente, no sistema radicular dessas espécies aumentou nos tecidos com aumento das concentrações de Cu. Estudos realizados com as espécies *Peltophorum. dubium*, *Parapiptadenia rígida*, *Enterolobium contortisiliquum* (Silva et al. 2011), *Bauhinia forficata* Link, *Pterogyne nitens* Tul (Silva et al. 2015a) e com duas cultivares de macieira (*Malus hupehensis* Rehd.) (Wang et al. 2016) relataram que o Cu nessas espécies acumula-se preferencialmente no sistema radicular, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo.

H. courbaril, *P. dubium* e *M. peruiferum* apresentaram capacidade de crescer e tolerar as altas concentrações de Cu no solo. Este fato corrobora com o resultado do índice de tolerância (TI), sendo os melhores desempenhos observados nos valores próximos a 1,0 (Souza et al. 2012b). As espécies pesquisadas apresentaram valores próximo de 1,0 na concentração mais elevada (400 mg Kg^{-1}), evidenciando tolerância mesmo em concentrações elevadas de Cu no solo.

O fator de translocação (TF) demonstrou que para *H. courbaril* e *P. dubium* houve baixa translocação nas maiores concentrações de Cu. Esse fato assemelha-se ao encontrado por Silva et al. (2015b), onde relataram que *Anadenanthera macrocarpa* foi a espécie florestal que apresentou menor translocação de cobre a parte aérea das mudas. Já *M. peruiferum* apresentou valores maiores de translocação, atingindo aproximadamente 60% na dose de Cu mais elevada (400 mg Kg^{-1}), entretanto, dentre todas as espécies estudadas foi a que teve menor teor de cobre absorvido do solo. Isso possivelmente pode estar relacionado a diferentes mecanismos de tolerância ao estresse por Cu, onde *H. courbaril* e *P. dubium* apresentaram compartimentalização desse metal no sistema radicular, e possivelmente também, maior capacidade dessas espécies de desintoxicação dentro dos tecidos pelas enzimas antioxidantes (Bazihizina et al. 2015) e *M. peruiferum* apresentando baixa absorção do Cu, evidenciando característica de planta excludora de Cu (Cambrollé et al. 2013b). Esta característica de planta excludora pode estar relacionado com a menor transpiração que é fator importante que determina se as plantas absorvem ou excluem o Cu (Fu et al. 2015). O fator de bioconcentração (BCF) veio confirmar o desempenho das três espécies frente à exposição de Cu no solo. Para todas as concentrações testadas, as espécies *H. courbaril* e *P. dubium* apresentaram maiores valores de BCF quando comparado com a *M. peruiferum*. Por tolerarem e absorverem o metal essas espécies (principalmente *H. courbaril* e *P. dubium*) podem ser indicadas a programas de fitoestabilização em locais contaminados com cobre.

O acúmulo de cobre no sistema radicular pode representar estratégia de tolerância da planta ao excesso de metal pesado no solo (Silva et al. 2011; Cambrollé et al. 2013b), visando preservar os tecidos metabolicamente mais ativos (Branzini et al. 2012) e a aparelhagem fotossintética presente nas folhas. Este acúmulo nas raízes pode ser explicado anatomicamente por barreiras apoplásticas conhecidas como exoderme e endoderme. Elas desempenham papel importante na proteção do vegetal, minimizando a translocação dos metais das raízes para a parte aérea (Gomes et al. 2011; Freitas et al. 2015). O espessamento das paredes das células do sistema radicular (principalmente na exoderme e endoderme) proporciona maior área de retenção de metais pesados, diminuindo sua translocação para a parte aérea (Adress et al. 2015). Wang et al. (2016) trabalhando com a cultivar *Malus hupehensis* Rehd. Ralls relataram maiores quantidades de Cu sequestrados, principalmente, na parede celular e vacúolo das raízes fibrosas. Possivelmente, as plantas das espécies *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiiferum* utilizaram alguns desses mecanismos, com o intuito de manter o crescimento das plantas, que não foi afetado pelas doses de cobre, no período estudado, além disso, não foram observadas alterações visuais nos tecidos foliares. Este comportamento indica que a translocação do Cu a partir de raízes para a parte aérea parece estar muito restrita em todas as espécies, o que evidêcia a limitada mobilidade do cobre dentro dessas plantas e mecanismos utilizados para restringir a translocação para a parte aérea (Branzini et al. 2012).

CONCLUSÃO

Conclui-se que as plantas de *Hymenaea courbaril*, *Peltophorum dubium* e *Myroxylon peruiferum* não foram afetadas pelo excesso de cobre no crescimento vegetativo, entretanto o excesso de Cu resultou em menor teor de clorofila. As espécies apresentaram sistema de defesa enzimático antioxidante (SOD, APX, CAT, GPX) em combate a (ERO) com um comportamento diferenciado frente às enzimas, onde *H. courbaril* e *P. dubium* a enzima SOD e APX apresentaram maior atividade e *M. peruiferum* a APX, exibindo mecanismo compensatório de defesa ao estresse oxidativo. O excesso do Cu gerou em ambas as espécies limitação bioquímica da fotossíntese na maior concentração (400 mg Kg⁻¹). Alta concentração de Cu nas plantas de *M. peruiferum* causou também, limitação estomática devido ao fechamento dos estômatos (g_s). As três espécies apresentaram como mecanismo de tolerância ao excesso de Cu acúmulo desse metal nas raízes como estratégia para preservar a aparelhagem fotossintética nas folhas. *M. peruiferum* mostrou-se uma planta exclusiva,

enquanto *H. courbaril* e *P. dubium* mostraram-se acumuladoras de Cu na raiz. *H. courbaril*, *P. dubium* e *M. peruiferum* apresentaram tolerância e são indicadas para revegetação de solos contaminados com cobre e a programas de fitorremediação como a fitoestabilização.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao viveiro florestal de Itutinga-MG da Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG pela doação das mudas das espécies usadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere* 91(7) 869-881
- Adrees M et al (2015) The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22(11) 8148-8162
- Asada K; Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: Kyle J, Osmond CB, Arntzen K (ed.) *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam
- Arnon D I (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1) 1
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39(1) 205-207
- Bazihizina N et al (2015) Photosynthesizing on metal excess: Copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. populations. *Journal of Plant Physiology* 174 137-146
- Borghini M et al (2008) Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus canadensis*) to high copper concentrations. *Environmental and Experimental Botany* 62(3) 290-299
- 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(1-2) 248-254
- Branzini A, González RS, Zubillaga M (2012) Absorption and translocation of copper, zinc and chromium by *Sesbania virgata*. *Journal of Environmental Management* 102 50-54
- Cambrollé J et al (2011) Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. *Environmental and Experimental Botany* 71(1) 57-64

- Cambrollé J et al (2013a) Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. *Chemosphere* 93(2) 294-301
- Cambrollé J et al (2013b) Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monopetalum*. *Environmental Science and Pollution Research* 20(12) 8839-8847
- Carmo CAFS et al (2000) Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Embrapa Solos, Rio de Janeiro (em português)
- Cargnelutti D et al (2006) Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere* 65(6) 999-1006
- DalCorso G, Manara A, Piasentin S, Furini A (2014) Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* 6 (10) 1770-1788
- Fu L et al (2015) Differences in copper absorption and accumulation between copper-exclusion and copper-enrichment plants: a comparison of structure and physiological responses. *PloS one* 10(7) e0133424
- Frugoli JA et al (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 112(1) 327-336
- Freitas T A et al (2015) Morphology, ultrastructure and mineral uptake is affected by copper toxicity in young plants of *Inga subnuda* subs. *luschnathiana* (Benth.) TD Penn. *Environmental Science and Pollution Research* 22(20) 15479-15494
- Gao S et al (2010) Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedling exposed to mercury toxicity. *Journal of Hazardous Materials* 182(1) 591-597
- Garcia L, Welchen E, Gonzalez DH (2014) Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion* 19 269-274
- Gautam S, Anjani K, Srivastava N (2016) In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 1-9
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59(2) 309-314
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12) 909-930
- Gill SS, Gill R, Anjum NA (2014) Target osmoprotectants for abiotic stress tolerance in crop plants—glycine betaine and proline. *Plant Adaptation to Environmental Change: Significance of Amino Acids and Their Derivatives* 97-108
- Gomes M P et al (2011) Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. *Scientia Agricola* 68(5) 566-573

- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84(2) 450-455
- Küpper H, Andresen E (2016) Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics* 8 269-285
- Lin JS, Wang GX (2002) Doubled CO₂ could improve the drought tolerance better in sensitive cultivars than in tolerant cultivars in spring wheat. *Plant Science*, 163(3) 627-637
- Lyubenova L et al (2015) Comparative study on the impact of copper sulphate and copper nitrate on the detoxification mechanisms in *Typha latifolia*. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1) 657-666
- Malik N, Biswas AK (2012) Role of higher plants in remediation of metal contaminated sites. *Scientific Reviews and Chemical Communications* 2 141-146
- Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Cambrollé J, Figueroa ME (2008) Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research* 66(4) 459-465
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90 136-142
- Meng QM et al (2007) Effect of Cu²⁺ concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in Garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Biologica Cracoviensia* 49(1) 95-101
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8(3) 199-216
- Nair PMG, Kim SH, Chung IM (2014) Copper oxide nanoparticle toxicity in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: physiological and molecular level responses of in vitro grown plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 36(11) 2947-2958
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22(5) 867-880
- Raij Bvan, Andrade JC, Cantarella H, Quaggio JA (2001) Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Instituto Agronômico, Campinas (em português)
- Sánchez-Pardo B, Fernández-Pascual M, Zornoza P (2014) Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. *Journal of Plant Research* 127(1) 119-129
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 1-26

- Sheoran V, Sheoran AS, Poonia P (2010) Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41(2) 168-214
- Shi X et al (2011) Seedling growth and metal accumulation of selected woody species in copper and lead/zinc mine tailings. *Journal of Environmental Sciences* 23(2) 266-274
- Silva FC (1999) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Solos/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília (em português)
- Silva RF et al (2011) Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. *Ciência Florestal* 21(1) 103-110 (em português)
- Silva RFD et al (2015a) Copper translocation and tolerance in seedlings of tree species grown in contaminated soil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 19(11) 1093-1099
- Silva RF et al (2015b) Growth of tropical tree species and absorption of copper in soil artificially contaminated. *Brazilian Journal of Biology (AHEAD)* 0-0
- Souza TC et al (2012a). Early characterization of maize plants in selection cycles under soil flooding*. *Plant breeding* 131(4) 493-501
- Souza SCR, Andrade SAL, Souza LA, Schiavinato MA (2012b) Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. *Journal of Environmental Management* 110 299-307.
- Souza VL et al (2014) Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 21(2) 1217-1230
- Stankovic S, Kalaba P, Stankovic AR (2014) Biota as toxic metal indicators. *Environmental Chemistry Letters* 12(1) 63-84
- Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15(2) 89-97
- Tomás M et al (2014) Variability of mesophyll conductance in grapevine cultivars under water stress conditions in relation to leaf anatomy and water use efficiency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20(2) 272-280
- Thounaojam TC et al (2012) Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 53 33-39
- Wang QY, Liu JS, Hu B (2016) Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees. *Environmental and Experimental Botany* 123 125-131

Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1(3) 207-228

Xu J, Duan X, Yang J, Beeching JR, Zhang P (2013) Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Plant Physiology* 161(3) 1517-1528

Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology* 36(5) 409-430

Yruela I (2013) Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics* 5(9) 1090-1109

Zhang L et al (2013) Inhibition of dsDNA-templated copper nanoparticles by pyrophosphate as a label-free fluorescent strategy for alkaline phosphatase assay. *Analytical chemistry* 85(8) 3797-3801

ANEXO B - ARTIGO: Toxicidade do cobre na morfologia e fotossíntese de *Hymenaea courbaril* L.

AUTORES: Daniele Maria Marques, Adriano Bortolotti da Silva, José Ricardo Mantovani, Valdir Veroneze Júnior, Paulo César Magalhães, Thiago Corrêa de Souza.

Artigo redigido conforme as normas da revista Tree Physiology.

Toxicidade do cobre na morfologia e fotossíntese de *Hymenaea courbaril* L.

Daniele Maria Marques¹ • Valdir Veroneze Júnior¹ • Adriano Bortolotti da Silva² • José Ricardo Mantovani² • Paulo César Magalhães³ • Thiago Corrêa de Souza^{1*}

1: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, Instituto de Ciências da Natureza - ICN, Rua Gabriel Monteiro, 700. Telefone: +553 532 991 419, FAX: +553 532 991 419, CEP: 37130-000, Alfenas-MG, Brasil. E-mail: thiago.souza@unifal-mg.edu.com

2: Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Ciências Agrárias, Rod MG 39 Km 0, CEP: 37130-000, Alfenas-MG, Brasil.

3: Embrapa Milho e Sorgo, Caixa postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brazil.

*autor para correspondência

RESUMO

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial ao desenvolvimento das plantas e está envolvido em muitos processos biológicos importantes. Mas, em excesso é tóxico para os vegetais, e pode causar várias alterações na morfologia e nas respostas fotossintéticas das plantas. O conhecimento das respostas morfológicas e fisiológicas ao excesso do Cu é importante para o desenvolvimento de programas de fitorremediação e para o entendimento dos mecanismos envolvidos na tolerância a este metal. Nesse contexto o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito do excesso do cobre na morfologia radicular e nas respostas fotossintéticas em *Hymenaea courbaril* L. O Cu até a concentração de 200 mg Kg⁻¹ favoreceu o crescimento, trocas gasosas e morfologia radicular das plantas de *H. courbaril*. O excesso do Cu no solo afetou o crescimento vegetativo e causou declínio na taxa fotossintética. Foi observado limitação bioquímica da fotossíntese na maior concentração (800 mg Kg⁻¹) e menor taxa fotossintética líquida máxima (A_{max}), taxa de respiração no escuro (R_d), ponto de compensação de luz (LCP), ponto de saturação de luz (LSP) e rendimento quântico aparente (α) quando exposta ao excesso do Cu. O crescimento radicular, área superficial, diâmetro médio, volume raízes, biomassa seca, comprimento específico da raiz diminuíram com as altas concentrações de Cu aplicadas no solo. As plantas de *H. courbaril* apresentaram quantidade maior de raízes finas até a 400 mg Kg⁻¹ com inibição em 800 mg Kg⁻¹. O Cu foi acumulado nas raízes como mecanismo de tolerância ao excesso do metal visando preservar a aparelhagem fotossintética presente nas folhas. Na concentração de 800 mg Kg⁻¹ o cobre causou inibição do sistema radicular e alterações nas respostas fotossintéticas. As plantas de *H. courbaril* apresentaram tolerância ao excesso de Cu no solo, e essa arbórea é indicada para recuperação de áreas contaminadas com esse metal.

Palavras-chave: metal pesado, trocas gasosas, comprimento específico da raiz, fitorremediação, tolerância ao cobre, WinRhizo.

1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial ao desenvolvimento dos vegetais com participação em reações biológicas importantes (Küpper e Andresen 2016), como elemento estrutural de proteínas, enzimas, mitocôndrias e cloroplastos, assim como na resposta ao estresse oxidativo e em reações redox (Yruela 2013). Na fotossíntese é constituinte da plastocianina que está envolvida na cadeia transportadora de elétrons entre o PSII e PSI na fase fotoquímica (DalCorso et al., 2014; Adress et al., 2015).

O cobre em excesso no solo torna-se fitotóxico para as plantas, interferindo em inúmeros processos fisiológicos (Yruela 2013; Küpper e Andresen 2016). A síntese dos pigmentos fotossintéticos, permeabilidade da membrana celular, homeostase e equilíbrio dos nutrientes para as plantas são alterados nas altas concentrações de Cu (Adress et al., 2015; Gautam et al., 2016). Íons de Cu em excesso nas plantas causa distúrbios na fotossíntese - podendo gerar estresse oxidativo com aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuindo a fixação de carbono e reduzindo ou inibindo o desenvolvimento da planta (Küpper e Andresen 2016). A exposição ao estresse por Cu conduz a uma remodelação na morfologia radicular (Cai et al., 2014), visto que as raízes é o primeiro órgão ao entrar em contato com o contaminante. Alta concentração de cobre reflete na redução da biomassa radicular, bem como na redução da biomassa da parte aérea (Feigl et al., 2013).

O conhecimento das respostas fisiológicas, bioquímicas e morfoanatômicas das plantas quando expostas aos metais pesados é de grande importância para recuperação de áreas contaminadas. A fitorremediação com os processos fisiológicos envolvidos vem despertando interesse mundial (Ent et al., 2013), mas as respostas morfológicas e fisiológicas ainda são poucas conhecidas em espécies florestais. E o emprego de arbóreas em programas de fitorremediação apresenta vantagens devido ao metal ficar por um período maior imobilizados nos tecidos vegetais e pelas raízes apresentar uma barreira contra a lixiviação do contaminante. A espécie *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae) nativa brasileira apresenta qualidades na recuperação de áreas degradadas devido à ampla distribuição dessa espécie e a tolerância e adaptação a uma variedade de ambientes (Lorenzi 2012), contudo ainda não se conhece a sua tolerância ao cobre e nem seus mecanismos de adaptação a este estresse. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito do excesso do cobre na morfologia radicular e nas respostas fotossintéticas de *Hymenaea courbaril* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), em Alfenas - MG, Brasil, situada nas coordenadas geográficas: 21° 25' 45'' S, 45° 56' 50'' W, e altitude média de 881m. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC), e os tratamentos empregados foram cinco concentrações de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0, 100, 200, 400 e 800 mg kg^{-1} , com quatro repetições. A espécie arbórea utilizada foi Jatobá - *Hymenaea courbaril* L. (mudas), com idade aproximada de 120 dias.

No experimento foi empregado solo da camada subsuperficial, com a seguinte caracterização química (Tabela 1). Em amostra de 360 dm^3 do solo foi adicionado 3,6 Kg de húmus de minhoca, 160g de calcário e 230g de superfosfato simples. Plantas de *H. courbaril* foram transferidas para vasos (18 dm^3) e mantidas em casa de vegetação com cobertura plástica (150 microns) e revestidas nas laterais com telado (sombrite 50%). Durante a condução do experimento, o controle da umidade do solo foi feito de dois em dois dias, por meio de pesagem dos vasos e reposição da água, para manter a umidade do solo a 70% da capacidade de retenção. Aos trinta dias após o transplântio das mudas foi efetuada a aplicação das concentrações de cobre via solução na superfície do solo como $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Sessenta dias após a aplicação do cobre foi efetuada adubação nitrogenada na dose de 10 mg Kg^{-1} de N, na forma de ureia. A condução do experimento ocorreu de dezembro de 2014 a maio de 2015.

Tabela 1 – Caracterização química inicial do solo utilizado no experimento.

pH (H_2O)	P (Mehlich) mg dm^{-3}	K	Ca^{+2}	Mg^{+2}	Al^{+3}	SB*	V*	M.O.* dag kg^{-1}	Zn	Fe	Mn	Cu
		----- $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ -----					%		----- mg dm^{-3} -----			
5,7	0,4	0,2	0,5	0,3	0,1	1,0	29	0,9	0,2	3,0	2,5	0,2

* Somatório de bases (SB); índice de saturação de bases (V); matéria orgânica (M.O.).

2.2 Medidas biométricas

Foram realizadas seis medições de altura (H) e diâmetro do caule (SD) no período de 120 dias de cultivo. As medidas foram estabelecidas utilizando paquímetro digital e fita métrica no 20, 40, 60, 80, 100 e 120 dias de cultivo.

2.3 Trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram medidos usando um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, modelo LI-6400XT, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EUA) com câmara com fonte de luz artificial (LI-6400-02B RedBlue, Li-Cor) aos 20, 40, 60, 80, 100 e 120 dias de cultivo após a aplicação do cobre no solo. As medições pontuais foram realizadas no período da manhã 09:00 - 11:00 horas em uma folha totalmente expandida, no quarto nó contando a partir da região apical. Os parâmetros avaliados foram à taxa de fotossíntese foliar (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração de CO_2 intercelular (C_i), eficiência do uso da água (A/g_s) e eficiência de carboxilação (A/C_i). As medições foram realizadas em uma área de folha de 6 cm^2 e o fluxo de ar na câmara foi com uma concentração de CO_2 de 380 mmol mol^{-1} . O ar foi coletado de fora da estufa e transportado para um galão de buffer e, em seguida bombeado para a câmara. Foi utilizado uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) de $1000\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, com fonte de luz LED azul-vermelho e a temperatura da câmara foi de 28°C .

As curvas da taxa fotossintética líquida (A) em resposta a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PAR) foram determinadas, também, através do mesmo sistema portátil de fotossíntese. Todas as medidas foram realizadas na mesma folha utilizada para as medidas pontuais em três plantas por tratamento. As PAR utilizadas foram 1400, 1000, 800, 200, 100, 50, 25, e $0\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ por 5 minutos, a 28°C e com condições ambientes de CO_2 (aproximadamente $380\text{ }\mu\text{mol mol}^{-1}$). As curvas foram realizadas em quatro momentos distintos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo. Os dados referentes às curvas foram ajustados a função hiperbólica retangular: $A = a + [(A_{\text{max}} \times \text{PAR}) / (b + \text{PAR})]$, em que A_{max} é a taxa máxima de fotossíntese líquida e 'a' e 'b' são coeficientes de ajuste da equação. Através da curva foram obtidos: taxa fotossintética líquida máxima (A_{max}), taxa de respiração no escuro (R_d) medidas em folhas adaptadas ao escuro, ponto de compensação de luz (LCP) e ponto de saturação de luz (LSP). O rendimento quântico aparente (α) foi estimado por meio de regressão linear da região inicial da curva ($0 \leq \text{PAR} \leq 200\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) sendo $A = c + (\alpha \times \text{PAR})$, e 'c' e ' α ' são coeficientes de ajuste.

2.4 Morfologia radicular

Para a morfologia radicular foram utilizadas três raízes por tratamentos no final do experimento. Após o processo de lavagem, as plantas foram separadas em sistema radicular e parte aérea, na altura do coleto. Para a análise da morfologia do sistema radicular utilizou-se o sistema de análise de imagens WinRhizo Pro 2007a (Regent Instruments, Sainte-Foy, QC, Canadá) acoplado a um scanner profissional (Epson, Expression 10000 XL, Epson America, Inc., USA) equipado com unidade de luz adicional (TPU). Os procedimentos para a obtenção das imagens foram feitos de acordo com Souza et al. (2012a). Foram determinadas as seguintes características: comprimento de raiz (RL) (cm), área de superfície de raiz (SA) (cm²), diâmetro médio de raiz (RMD) (mm) e volume de raiz (RV) (cm³). O comprimento radicular também foi analisado por classes de diâmetro (0 a 4.5 milímetros) pelo mesmo software. Em seguida as raízes foram armazenadas em sacos de papel e transportadas para uma estufa de circulação forçada de ar a 72 °C até obtenção de massa constante. Outros atributos envolvendo dados morfológicos e de massa seca foram feitos: a relação entre massa seca radicular e massa seca parte aérea (RDW/SDW g g⁻¹), comprimento específico de raiz (SRL cm g⁻¹), finura de raiz (RF cm cm³) e densidade de tecido de raiz (RMDe g cm³).

2.5 Teor de Cu nos tecidos e índices

A massa seca das raízes, caules e folhas foram moídas em moinho do tipo Willey, e com as amostras dos tecidos das plantas foi realizada determinação dos teores de Cu por espectroscopia de absorção atômica de acordo com Carmo et al. (2000).

Para avaliar a tolerância das plantas de *H. courbaril* e a capacidade de acumular o cobre foram calculados o índice de tolerância e o fator de translocação. O índice de tolerância (TI) baseia-se na produção de biomassa (Shi et al., 2011) e foi utilizado para avaliar a tolerância das três espécies estudadas para cada concentração de Cu. O índice foi calculado como: $TI = Bt/Bc$, onde Bt (g/planta) representa a biomassa de plantas cultivadas em solos com Cu e Bc (g/planta) representa a biomassa de plantas controle.

O fator de translocação (TF) indica a capacidade da planta em translocar metais a partir das raízes para a parte aérea, calculado como: $TF = As/Ar * 100$, onde As (mg kg⁻¹) representa o Cu total acumulado na parte aérea e Ar (mg kg⁻¹) representa o total acumulado Cu nas raízes (Shi et al., 2011).

2.6 Análises dos dados

Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias e o \pm erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de regressão linear e não linear utilizando o programa TableCurve 2D versão 5.01.

3 RESULTADOS

3.1 Medidas biométricas

As plantas de *H. courbaril* em todos os tratamentos com o cobre (Cu) mantiveram crescimento linear em altura (H) e diâmetro do caule (SD) ($p < 0,05$) (Figura 1A, 1B), com maior crescimento nas concentrações de 100 e 200 mg Kg⁻¹. No entanto, observa-se que o excesso do Cu afetou negativamente a H e SD na concentração mais elevada (800 mg Kg⁻¹) (Figura 1A, 1B).

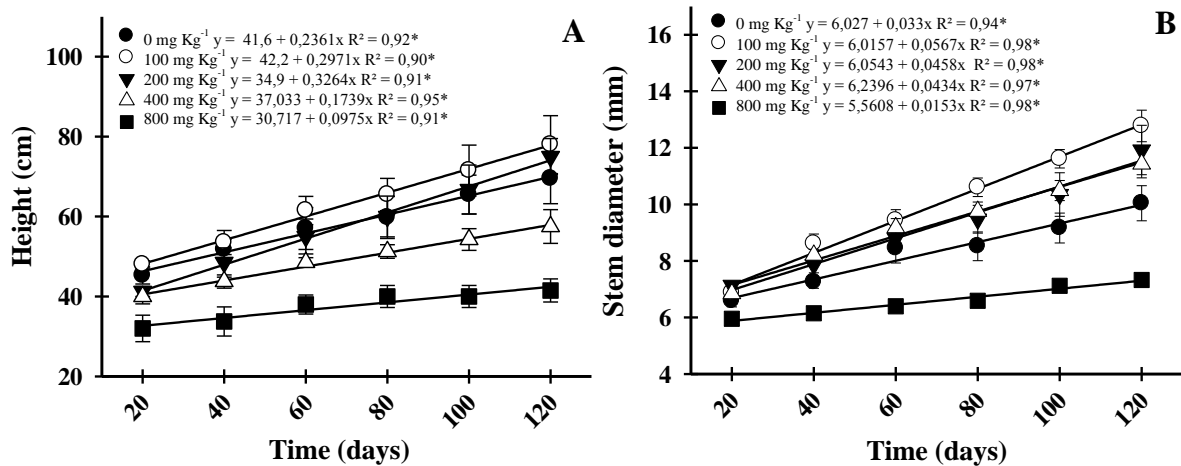


Figura 1 – Altura (H) e diâmetro do caule (SD) da *H. courbaril* exposta a diferentes concentrações de Cu. * $p < 0,05\%$ de probabilidade.

3.2 Trocas gasosas

Na concentração de 200 mg Kg⁻¹ de Cu as plantas de *H. courbaril* apresentaram maior fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), carbono interno (C_i), transpiração (E) e eficiência de carboxilação (A/C_i) até o período de cem dias, sendo observado declínio dos mesmo parâmetro aos 120 dias (Figura 2A, 2B, 2C, 2D, 2E). Entretanto, foi observado que o excesso de Cu no solo (800 mg kg⁻¹) causou diminuição nos parâmetros de A, G_s , E e A/C_i

(Figura 2A, 2B, 2C, 2D, 2E). Vale ressaltar que houve aumento do C_i na maior concentração na última medida realizada (120 dias) (Figura 2C). *H. courbaril* apresentou aumento na eficiência do uso da água (A/g_s) na concentração de 800 mg kg^{-1} Cu aplicado no solo, sendo observado diminuição aos 120 dias (Figura 2E).

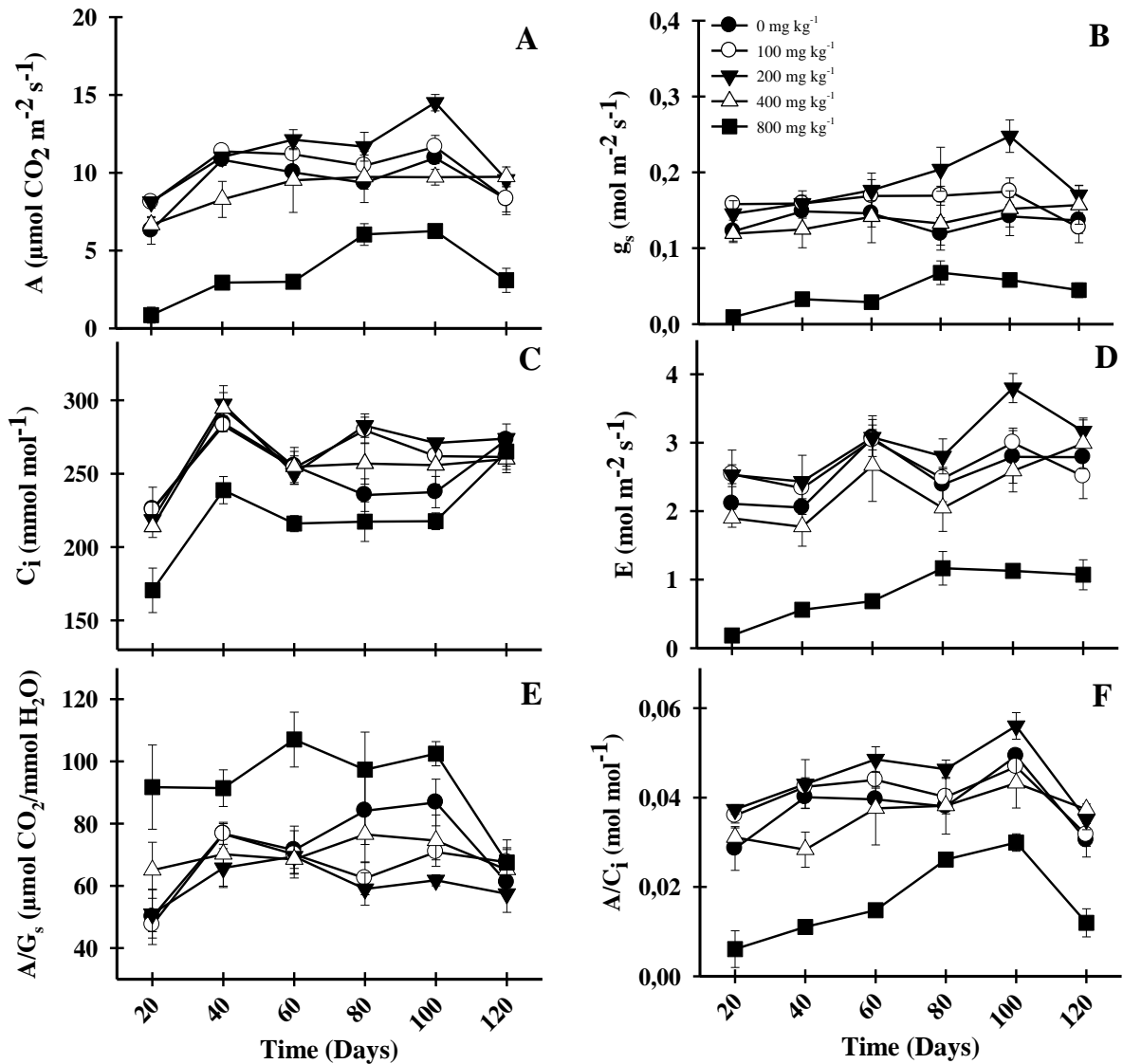


Figura 2 – Trocas gasosas de *H. courbaril* exposta a diferentes concentrações de Cu. A fotossíntese (A); B condutância estomática (g_s); C carbono interno (C_i); D transpiração (E); E eficiência do uso da água (A/g_s) e F eficiência de carboxilação (A/C_i). Cada valor indica média por tratamento \pm SE.

Nas plantas de *H. courbaril* a taxa fotossintética líquida máxima (A_{\max}) foi maior no tratamento de 200 mg Kg^{-1} , seguida pela concentração de 100 mg Kg^{-1} de Cu, com crescente aumento nas medições realizadas (Figura 3A). Em 800 mg Kg^{-1} de Cu aplicado no solo foi observada a menor A_{\max} (Figura 3A). Em relação a taxa de respiração no escuro (R_d) foi observado maior R_d em 100 mg Kg^{-1} aos 30 dias de cultivo, seguido de aparente declínio

(Figura 3B). Em 800 mg Kg^{-1} ocorreu menor R_d em relação as demais concentrações (Figura 3B). Ao longo do tempo a R_d permaneceu sem grandes variações para essa concentração. Nas medidas realizadas foi observado menor ponto de compensação de luz (LCP) na concentração 800 mg Kg^{-1} (Figura 3C). Após os sessenta dias de cultivo ocorreu aumento significativo e estabilização desse parâmetro para o excesso de Cu (800 mg Kg^{-1}). Já para o ponto de saturação de luz (LSP), *H. courbaril* apresentou maiores médias na concentração de 200 e 100 mg Kg^{-1} , e menor LSP na maior concentração de Cu (800 mg Kg^{-1}) (Figura 3C) Percebe-se que com o passar do tempo houve um aumento de LSP em todas as concentrações, exceto em 0 mg kg^{-1} . Com relação aos valores de rendimento quântico aparente (α) obtidos para *H. courbaril*, observou-se que o excesso de Cu (800 mg Kg^{-1}) ocasionou diminuição e com o aumento dos dias de cultivo observa-se um aumento e estabilização no α (Figura 3D).

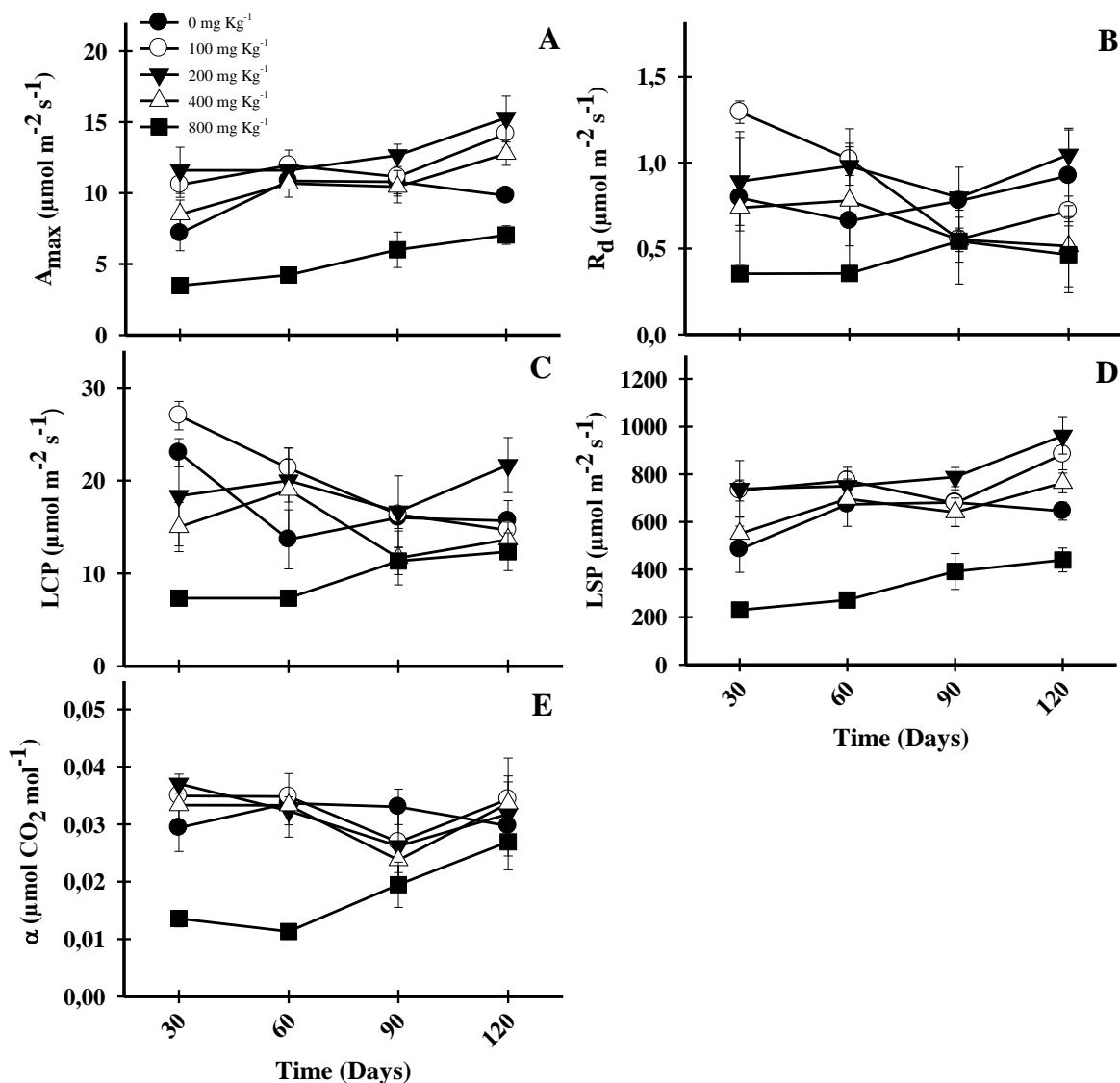


Figura 3 - (A) Taxa fotossintética líquida máxima (A_{max}); (B) taxa de respiração no escuro (R_d); (C) ponto de

compensação de luz (LCP); (D) ponto de saturação de luz (LSP) e (E) rendimento quântico aparente (α) nas plantas de *H. courbaril* exposta a diferentes concentrações de Cu. Cada valor indica a média do tratamento \pm SE.

3.3 Morfologia do sistema radicular e atributos de massa seca

O excesso do Cu afetou negativamente todos os parâmetros estudados da morfologia do sistema radicular, sendo observado declínio acentuado em 800 mg Kg⁻¹ de Cu para o comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume das raízes das plantas de *H. courbaril* (Figura 4A, 4B, 4C e 4D). Entretanto, foi observado que para os parâmetros de comprimento de raiz até a concentração de 172,68 mg Kg⁻¹, área superficial até (169,37 mg Kg⁻¹), diâmetro médio da raiz até 166,66 mg Kg⁻¹ e volume de raiz até (193,16 mg Kg⁻¹) ocorre favorecimento para o desenvolvimento da raiz e após estas concentrações de Cu ocorre efeito tóxico e inibidor sobre o sistema radicular (Figura 4A, 4B, 4C e 4D).

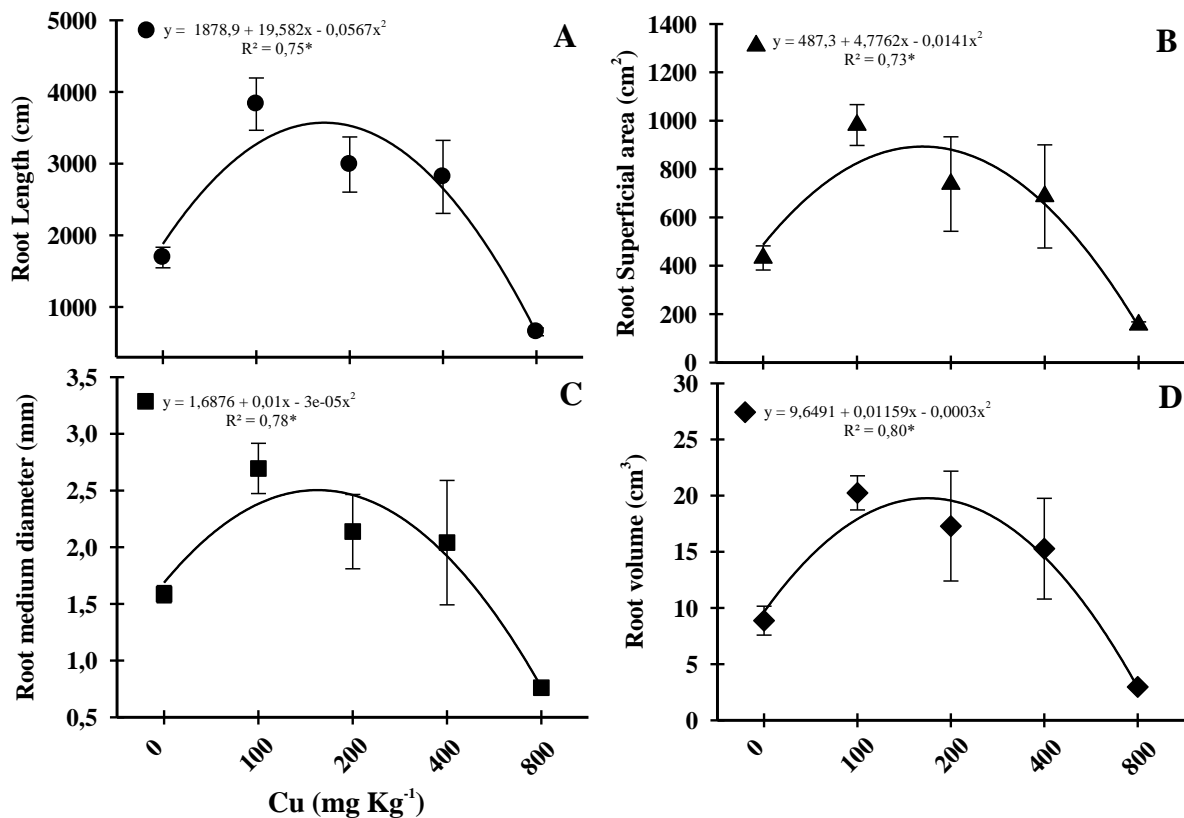


Figura 4 - Características de raiz: (A) comprimento, (B) área superficial, (C) diâmetro médio e (D) volume da espécie *H. courbaril* exposta a diferentes concentrações de cobre. * $p < 0,05\%$.

Nas plantas de *H. courbaril* a distribuição do comprimento, área superficial e volume por classes de diâmetro observou-se o mesmo comportamento dos parâmetros anteriores (Figura 4 e 5) com crescimento radicular nas concentrações iniciais acima do controle (0 mg

Kg^{-1}) e inibição do crescimento radicular nas maiores concentrações de cobre. No geral, o sistema radicular em *H. courbaril* é dominado por raízes de diâmetro fino. Contudo foi observado que as concentrações 100, 200 e 400 mg Kg^{-1} de Cu apresentam maior comprimento, área superficial e volume de raízes mais finas (0 a 1 mm) quando se compara ao tratamento controle (0 mg Kg^{-1}). Vale ressaltar que apesar da concentração 200 e 400 mg Kg^{-1} de Cu levar a um aumento dessas características em raízes finas observa-se simultaneamente um aumento em raízes de diâmetro médio (com diâmetro de 2 mm). Em 800 mg Kg^{-1} ocorre uma diminuição do comprimento, área superficial e volume de raízes mais finas (Figura 5A, 5B e 5C).

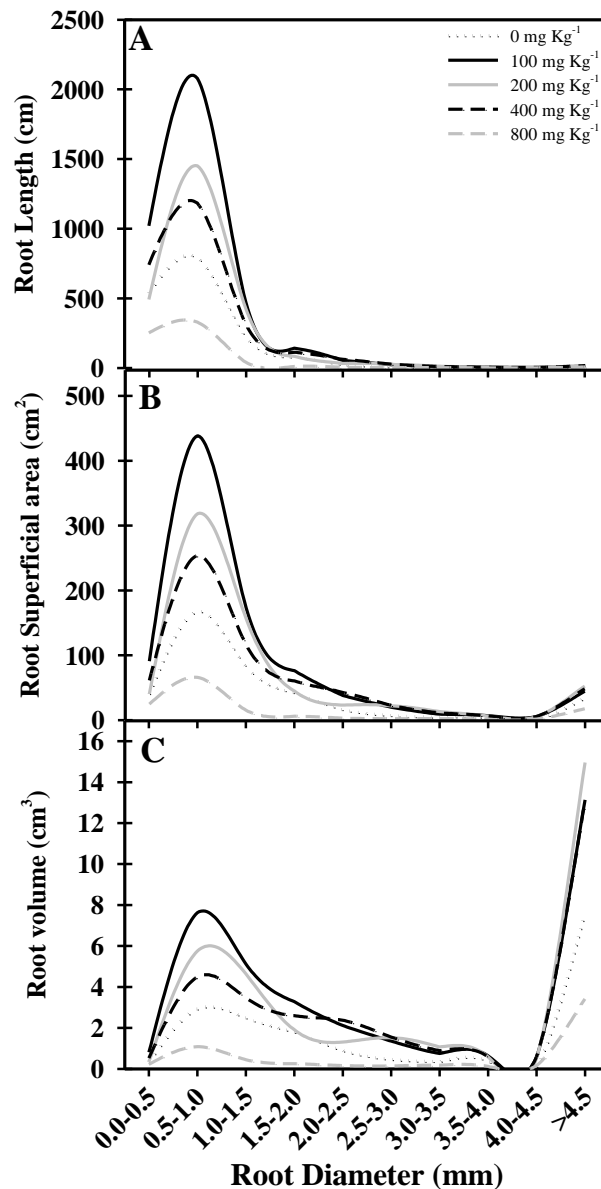


Figura 5 - (A) Comprimento de raiz, (B) área superficial de raiz, (C) volume de raiz distribuídos por classes de diâmetro em *H. courbaril* exposta a diferentes concentrações de Cu.

Para a massa seca da parte aérea (DWS) até a concentração 100 mg Kg^{-1} e massa seca radicular (DWR) até 200 mg Kg^{-1} ocorre aumento da biomassa, seguido de decréscimo para esses parâmetros nas demais concentrações (Figura 6A e 6B). A relação entre RDW/SDW aumenta nas maiores concentrações (Figura 6C). Para o comprimento específico de raiz (SRL) os maiores valores foram observados no controle e em 100 mg Kg^{-1} , com declínio nas concentrações 200 , 400 e 800 mg Kg^{-1} (Figura 6D). A finura de raiz (RF) até a concentração de 200 mg Kg^{-1} ocorre um favorecimento, seguido de decréscimo nas concentrações seguintes (400 e 800 mg Kg^{-1}) devido a efeito tóxico do Cu (Figura 6E). A densidade de tecido de raiz (RMDe) apresentou aumento com as altas concentrações de Cu aplicadas no solo (Figura 6F).

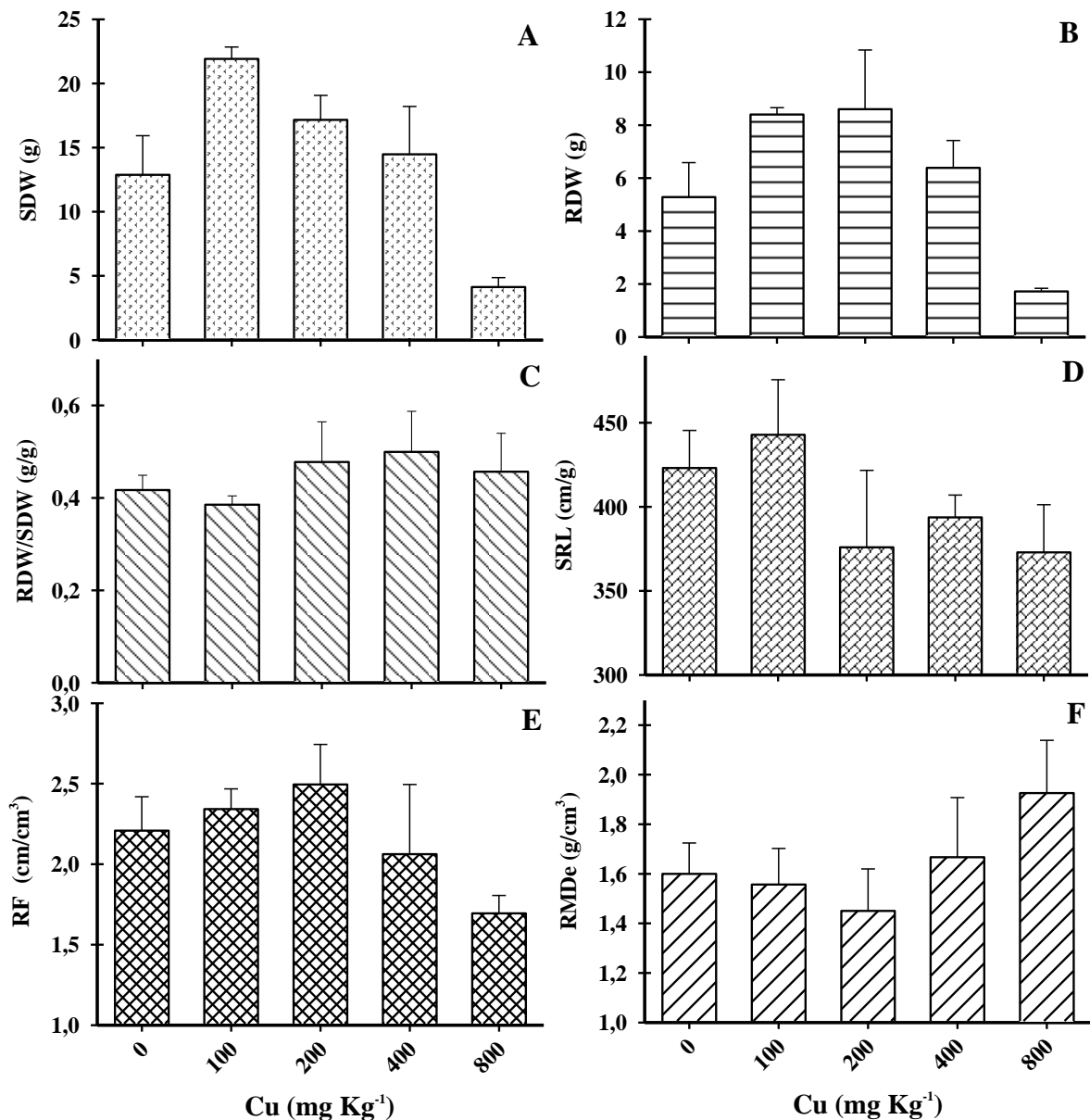


Figura 6 - Atributos de massa seca e morfologia das plantas de *H. courbaril* expostas a diferentes concentrações

de Cu. (A) massa seca da parte aérea (SDW); (B) massa seca raiz (RDW); (C) relação entre massa seca radicular e massa seca parte aérea (RDW/SDW); (D) comprimento específico da raiz (SRL); (E) Finura de raiz (RF); (F) densidade de tecido da raiz (RMD_e). Cada valor indica a média do tratamento \pm SE.

3.4 Teor de cobre nos tecidos e índices

Com o aumento do cobre no solo foi observado seu aumento também nos tecidos das plantas de *H. courbaril* (Figura 7). O Cu foi absorvido e alocado principalmente nas raízes dessa espécie (Figura 7).

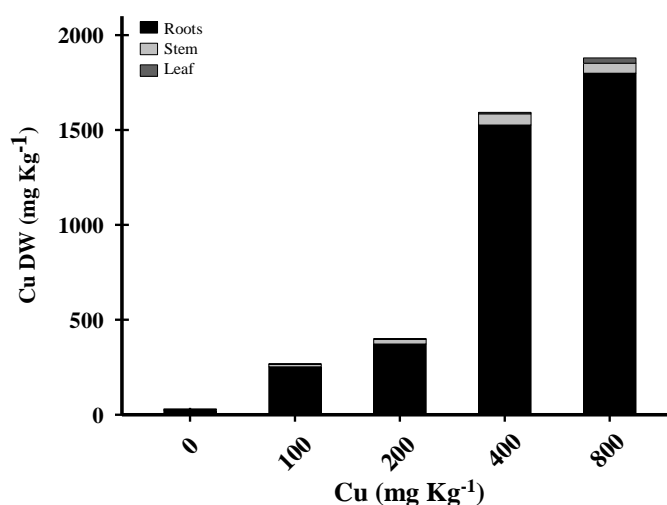


Figura 7 – Teor de cobre na raiz, caule e folha das plantas de *H. courbaril* expostas a diferentes concentrações de Cu.

Para o índice de tolerância (TI) e o fator de translocação (TF) nas plantas de *H. courbaril* observa-se que os valores diminuíram com o aumento das concentrações de Cu aplicadas no solo (Tabela 2).

Tabela 2 - Índice de tolerância (TI) e Fator de translocação (TF) das plantas de *H. courbaril* expostas a diferentes concentrações de Cu. Cada valor indica a média por tratamento \pm SE.

Cu (mg Kg ⁻¹)	TI	TF
100	1,67 \pm 0,11	6,46 \pm 0,66
200	1,42 \pm 0,45	7,73 \pm 0,95
400	1,16 \pm 0,52	4,35 \pm 0,28
800	0,32 \pm 0,08	4,45 \pm 0,72

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeito do cobre no crescimento e trocas gasosas

O cobre até a concentração de 200 mg kg^{-1} favoreceu o crescimento, trocas gasosas e morfologia radicular das plantas de *H. courbaril* possivelmente por ser um micronutriente e estar dentro dos limites favoráveis ao desenvolvimento das plantas (Souza et al., 2014). Porém, em excesso no solo o Cu ocasionou redução do crescimento dessa arbórea devido ao seu potencial tóxico em elevadas concentrações causando limitação no desenvolvimento dos vegetais (DalCorso et al., 2014; Adrees et al., 2015). Esse resultado assemelha-se com o encontrado com Marco et al. (2016) pesquisando excesso de Cu nas arbóreas *Senna multijuga* e *Erythrina crista-galli*, onde encontraram diminuição no crescimento dessas espécies provavelmente porque o Cu em excesso reduz o crescimento e estabilização das plantas nas etapas subsequentes no seu desenvolvimento. A redução do crescimento registrada nas plantas expostas às concentrações mais elevadas de Cu, também, pode ser atribuído à redução na assimilação de carbono (Cambrollé et al., 2015).

O excesso de íons de Cu nas plantas pode causar competição com outros íons metálicos (Fe, Ni, Zn) e substituição de elemento estrutural nas enzimas, como por exemplo, a ribulose 1-5 difosfato oxigenase/carboxilase (RuBisco), ocasionando distúrbio na fotossíntese; gerando aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular nas folhas que são altamente tóxicos e aumentando a peroxidação lipídica; diminuindo a fixação de carbono e produção de energia, e conseqüentemente reduzindo ou inibindo o desenvolvimento da planta (Küpper e Andresen 2016). Possivelmente isso explica à menor fotossíntese (A) e a baixa taxa fotossintética líquida máxima (A_{max}) encontrada nas plantas *H. courbaril* na concentração mais elevada (800 mg Kg^{-1}).

A alta concentração de Cu (800 mg Kg^{-1}) afetou a fotossíntese (A) e condutância estomática (g_s), porém não houve redução na concentração de CO_2 interno (C_i). Estes resultados sugerem que a redução da A e A_{max} poderia ser atribuída aos diferentes efeitos do Cu sobre a integridade ou a função do aparelho fotoquímico – limitação bioquímica, bem como ao seu impacto sobre as concentrações de clorofila nas folhas (Cambrollé et al., 2015). Outra provável limitação para A é a fluorescência sugerindo que o excesso de Cu aumenta a fotoinibição induzida pelo estresse a luz (Zang et al., 2013; Cambrollé et al., 2015). Fato que pode ser observado quando se analisa a eficiência de carboxilação (A/C_i) que na concentração de 800 mg Kg^{-1} é reduzida, possivelmente devido a inibição das enzimas carboxilativas (rubisco) (Mateos-Naranjo et al., 2013).

A taxa fotossintética líquida máxima (A_{max}) reflete a capacidade máxima fotossintética da folha (Zhang et al., 2014). A A_{max} foi influenciada pela alta concentração de Cu (800 mg Kg^{-1}) indicando que a capacidade fotossintética das plantas de *H. courbaril* diminuiu com o

excesso do Cu. Esse fato pode ser reforçado pelo ponto de compensação de luz (LCP) e pelo ponto de saturação de luz (LSP) que refletem a capacidade das plantas de usar os níveis mais baixos e maior de luz, respectivamente, refletindo a relação entre luz e fotossíntese (Zhang et al., 2014), que foi limitada em 800 mg Kg^{-1} quando comparado aos demais tratamentos. Esses resultados diferem aos encontrados por Zhang et al. (2014) onde LCP e LSP foram maiores com excesso de metal pesado, indicando que o metal poderia aumentar a eficiência do uso da luz em luz alta e reduzir a eficiência do uso da luz em níveis baixos de luz. O LCP é o valor de luminosidade em que a taxa de fixação de CO_2 na fotossíntese é igual à taxa de liberação de CO_2 na respiração e a fotorrespiração (Nunes et al., 2009). O LCP elevado reflete uma maior respiração e uma menor atividade da Rubisco carboxilase e uma maior atividade da Rubisco oxigenase sugerindo um possível mecanismo de proteção para evitar fotoinibição, dissipando o excesso de ATP e NADPH, produzindo CO_2 interno (manutenção da atividade de Rubisco) e consumindo oxidantes (H_2O_2) através de catálise (Baccio et al., 2009). Possivelmente o Cu está em nível muito tóxico no solo refletindo em grande quantidade de íons intracelular, impedindo que ocorra esse mecanismo de proteção com aumento em LCP. A taxa de respiração no escuro (R_d) foi menor em 800 mg Kg^{-1} quando comparada aos demais tratamentos, possivelmente devido a toxicidade do Cu. No rendimento quântico aparente (α) observa-se o efeito negativo do excesso do Cu, porém com o passar do tempo (dias) as plantas de *H. courbaril* tenta adapta-se a condição de estresse induzida por esse metal mostrando-se tolerante.

O Cu atua como elemento estrutural de mitocôndrias, cloroplastos e proteínas como a plastocianina que está envolvida na cadeia transportadora de elétrons entre o PS II e PS I na fase fotoquímica da fotossíntese (Yruela 2013; DalCorso et al., 2014; Adrees et al., 2015). A presença de cobre no solo até 200 mg Kg^{-1} influenciou positivamente resultando na maior fotossíntese (A) nas plantas de *H. courbaril*. Outro fator provável para a alta A é a alta condutância estomática (g_s) para essa concentração, favorecendo assim maior fixação de CO_2 por essas plantas.

A maior eficiência do uso da água (A/g_s) nas plantas de *H. courbaril* na concentração mais elevada de cobre reflete em economia de água. Plantas que economizam água em ambientes com excesso de metais pesados são importantes para programas de fitorremediação devido não se perturbarem tanto com estresses adicionais como o hídrico, sugerindo o possível emprego dessa espécie em programas de fitorremediação por tolerar mais variações ambientais como a seca. Esse fato favorece melhor desempenho (sobrevivência) da planta, já que a A/g_s é um parâmetro indicador de tolerância à seca (Pinheiro et al., 2014). Um dos

grandes entraves da fitorremediação é a influência de outros estresses ambientais (além da presença do metal) na absorção de contaminantes pelas plantas (Ali et al., 2013).

4.2 Implicações do cobre na morfologia radicular

Fatores bióticos e também abióticos como metais pesados podem influenciar nos parâmetros da morfologia radicular que determinará a sobrevivência de uma planta em um determinado ambiente (Cai et al., 2014). O sistema radicular bem desenvolvido é uma característica importante para tolerância a estresses. De um modo geral, a exposição ao estresse conduz a uma remodelação na morfologia da raiz (Cai et al., 2014). Altas concentrações de cobre afetaram a morfologia/arquitetura radicular em *H. courbaril*. O efeito tóxico do Cu acarretou diminuição no comprimento, área superficial, diâmetro médio e volume da raiz que refletiu tanto na redução da biomassa radicular como na redução da biomassa da parte aérea nessas concentrações. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Cai et al. (2014) na análise da morfologia radicular de *Elsholtzia haichowensis*, ressaltando que a acentuada redução do volume de raiz sob estresse por Cu reflete na diminuição relevante da biomassa radicular, que depende diretamente da divisão e alongamento celular. Efeitos semelhantes foram encontrados por Bochicchio et al. (2015) em combinação por metais pesados Cd, Cu e Zn na morfologia radicular em *Arabidopsis thaliana*. Marco et al. (2016) relataram que o aumento do Cu reduziu os parâmetros morfológicos nas arbóreas pesquisadas (*Senna multijuga* e *Erythrina crista-galli*). Feigl et al. (2013) encontraram o efeito inibidor no sistema radicular mais acentuado em *Brassica juncea* em comparação com *Brassica napus* causado por estresse ao Cu mostrando variabilidade genética entre as espécies na tolerância a este metal.

Por outro lado, o Cu em condições de micronutriente favoreceu o desenvolvimento radicular de *H. courbaril*, que segundo a Imada et al. (2008) a área superficial de raiz é a que está mais relacionada com a absorção de nutrientes, e um aumento do volume radicular propicia maior eficiência de absorção de nutrientes que favorece um bom desenvolvimento da planta.

O Cu favoreceu o desenvolvimento do comprimento radicular, área superficial e volume da raiz por classes de diâmetro até a concentração de 400 mg Kg⁻¹ das raízes finas que são propícias a absorção de água. Mas ainda na concentração de 400 mg Kg⁻¹ observa-se que o favorecimento das raízes classificadas como grossas ($\varnothing > 2,0$ mm) (Magalhães et al., 2012), ocorreu sendo sinal de investimento de raízes de sustentação e não de absorção. Assim até

200 mg Kg⁻¹ a concentração parece ter realmente favorecido o sistema radicular de *H. courbaril* na exploração do solo. Entretanto, observa-se o efeito tóxico e inibidor para os mesmos parâmetros quando em elevadas concentrações no solo. Uma vez que as raízes finas são sensíveis sob níveis altos de Cu. Além da diminuição das raízes primárias e laterais, o número e a densidade, também, são reduzidos por efeito do Cu (Feigl et al., 2013).

A aplicação de Cu em concentrações elevadas no solo causou redução nos atributos de massa seca, com aumento na relação da massa seca da raiz sobre a parte aérea (RDW/SDW), sugerindo que nessa arbórea ocorre aumento da densidade do tecido de raiz nas maiores concentrações. As plantas de *H. courbaril* apresentaram os maiores valores para comprimento específico de raiz (SRL) nas concentrações iniciais de Cu. Sabe-se que um maior SRL reflete em uma maior exploração e aquisição de água e nutrientes no solo por unidade de carbono investido (Bouma et al., 2001). Fato que corrobora com o resultado encontrado na finura de raiz (RF). Em 100 mg Kg⁻¹ ocorre favorecimento em SRL, que também foi observado com aumento de raízes finas (RF). Em áreas de reflorestamento poderia ser indicada essa concentração de Cu, devido ao estímulo no aumento de raízes na exploração do solo.

A alta densidade de tecido da raiz (RMDe) (raízes com grandes quantidades de massa morta e fibrosa) é um exemplo da característica de espécies inseridas em ambientes de estresse, que acabam por reduzir o comprimento específico radicular (Wahl et al., 2000). Fato que pode ser observado nas plantas de *H. courbaril* submetidas ao excesso de Cu. O Cu pode aumentar a lignificação em espécies tolerantes por se acumular na parede celular das células (Colzi et al., 2015) e por ficar aderido nas barreiras apoplásticas na exoderme e endoderme (estrias de Caspary) (Freitas et al., 2015).

Apesar de ocorrer inibição do crescimento, morfologia, trocas gasosas das plantas de *H. courbaril* não houve morte dessas plantas e elas acumularam cobre em seus tecidos.

4.3 Cobre nos tecidos

A absorção do metal pelas plantas depende da exigência fisiológica e da disponibilidade do metal no solo (DalCorso et al., 2014). O cobre é absorvido e encontrado em maior concentração nas raízes das plantas por se ligar fortemente a parede celular das células das raízes, e assim não é facilmente móvel na planta, resultando em uma baixa translocação desse metal para a parte aérea (Kabata-Pendias 2011). O Cu absorvido pelas plantas de *H. courbaril* foi retido nas raízes, principalmente nas maiores concentrações. Esse resultado assemelha-se ao encontrado por Silva et al. (2015) com destaque para a arbórea

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong., sendo a principal espécie estudada em acumular o Cu no sistema radicular. Este comportamento é utilizado por muitas plantas como um mecanismo de tolerância aos metais pesados para reduzir a translocação do metal a parte aérea, e assim evitar danos causados pela toxicidade do metal pesado a aparelhagem fotossintética presente nas folhas (Marco et al., 2016). Este fato corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, pois apesar das plantas sofrerem com a presença do cobre em excesso elas não morreram e ainda acumularam o metal nas raízes.

Mesmo com efeito tóxico do Cu nas concentrações elevadas, as plantas de *H. courbaril* apresentaram capacidade de tolerância e sobrevivência. E o índice de tolerância (TI) baseado na produção de biomassa vem a confirmar esse fato, mesmo na mais alta concentração, onde essa arbórea conseguiu sobreviver. Resultados de TI próximos a 1,0 indica maior tolerância ao estresse causado pelo metal (Souza et al., 2012b). As concentrações crescentes de Cu incorporado no solo reduziram o fator de translocação (TF) dessa arbórea, sendo observado que apenas 4,45% do Cu foi translocado das raízes para a parte aérea pelas plantas em 800 mg Kg⁻¹. Concentrações de Cu maiores nas raízes e menores na parte aérea sugerem que pode haver alguns mecanismos de proteção pelo qual a translocação de Cu das raízes a parte aérea foi limitada (Wang et al., 2016). Esse fato provavelmente está relacionado a mecanismos de tolerância contra os efeitos deletérios que o excesso de Cu pode acarretar no vegetal (Cambrollé et al., 2013). Estudo realizado por Marco et al. (2016) com arbóreas apresentou resultados semelhantes com redução do TF em solos com Cu em *Senna multijuga* e *Erythrina crista-galli*.

5 CONCLUSÃO

O cobre até a concentração de 200 mg kg⁻¹ favoreceu e estimulou o crescimento, trocas gasosas e morfologia radicular das plantas de *H. courbaril*. Entretanto, o excesso do Cu (800 mg Kg⁻¹) causou declínio na fotossíntese com limitação bioquímica, e inibição do desenvolvimento radicular, principalmente de raízes finas para essa arbórea. O Cu foi acumulado nas raízes dessas plantas como mecanismos de proteção ao aparato fotossintético presente nas folhas. Plantas de *Hymenaea courbaril* L. apresentaram tolerância ao excesso do cobre e são indicadas para áreas contaminadas por esse metal, e a programas de fitorremediação como a fitoestabilização.

5 REFERÊNCIAS

- Adrees M et al (2015) The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22(11) 8148-8162.
- Ali H et al (2013) Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. *Chemosphere* 91(7) 869-881.
- Baccio D, Tognetti R, Minnocci A, Sebastiani L (2009) Responses of the *Populus × euramericana* clone I-214 to excess zinc: carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1) 153-163.
- Bohicchio R et al (2015) Root architecture and morphometric analysis of *Arabidopsis thaliana* grown in Cd/Cu/Zn-gradient agar dishes: A new screening technique for studying plant response to metals. *Plant Physiology and Biochemistry* 91:20-27.
- Bouma TJ et al (2001) Root system topology and diameter distribution of species from habitats differing in inundation frequency. *Journal Ecology* 15:360-369.
- Cai S et al (2014) Differential responses of root growth, acid invertase activity and transcript level to copper stress in two contrasting populations of *Elsholtzia haichowensis*. *Ecotoxicology* 23(1) 76-91.
- Cambrollé J et al (2013) Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monopetalum*. *Environmental Science and Pollution Research* 20(12) 8839-8847.
- Cambrollé J et al (2015). Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere* 120:171-178.
- Carmo CAFS et al (2000) Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Embrapa Solos, Rio de Janeiro. (em português)
- DalCorso G, Manara A, Piasentin S, Furini A (2014) Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* 6 (10) 1770-1788.
- Ent AVD et al (2013) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant and Soil* 362(1-2) 319-334.
- Feigl G et al (2013) Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 94:179-189.
- Freitas TA et al (2015) Morphology, ultrastructure and mineral uptake is affected by copper toxicity in young plants of *Inga subnuda* subs. *luschnathiana* (Benth.) TD Penn. *Environmental Science and Pollution Research* 22(20) 15479-15494.

Gautam S, Anjani K, Srivastava N (2016) In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 1-9.

Imada S, Yamanaka N, Tamai S (2008) Water table depth effects *Populus alba* fine root growth and whole plant biomass. *Functional Ecology* 22:1018–1026.

Lorenzi H (6 ed) (2012) *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*. Plantarum. (em português)

Marco R et al (2016) Copper Phytoaccumulation and Tolerance by Seedlings of Native Brazilian Trees. *Environmental Engineering Science* 33(3) 176-184.

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. *Ecotoxicology and environmental safety* 90:136-142.

Kabata-Pendias A (4 ed) (2011) *Trace Elements in Soils and Plants*. London, Boca Raton: CRC Press.

Küpper H, Andresen E (2016) Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics* 8:269-285.

Magalhães PC et al (2012) Root morphology of maize lines with contrasting drought resistance under three toxic levels of aluminum. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 11(1) 35-4.

Nunes C et al (2009) Photosynthesis light curves: a method for screening water deficit resistance in the model legume *Medicago truncatula*. *Annals of Applied Biology* 155(3) 321-332.

Pinheiro DG et al (2014) Soil water threshold for transpiration and leaf growth in cassava plants in two water deficit periods. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 38(6) 1740-1749.

Silva RFD et al (2015) Copper translocation and tolerance in seedlings of tree species grown in contaminated soil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 19(11) 1093-1099.

Shi X et al (2011) Seedling growth and metal accumulation of selected woody species in copper and lead/zinc mine tailings. *Journal of Environmental Sciences* 23(2) 266-274.

Souza TC et al (2012a) Early characterization of maize plants in selection cycles under soil flooding*. *Plant Breeding* 131(4) 493-501.

Souza SCR, Andrade SAL, Souza LA, Schiavinato MA (2012b) Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. *Journal of Environmental Management* 110 299-307.

Souza VL et al (2014) Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 21(2) 1217-1230.

Wahl S, Ryser P, Edwards PJ (2000) Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytol.* 148:459-471.

Wang QY, Liu JS, Hu B (2016) Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees. *Environmental and Experimental Botany* 123 125-131.

Yruela I (2013) Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics* 5(9) 1090-1109.

Zhang L et al (2013) Inhibition of dsDNA-templated copper nanoparticles by pyrophosphate as a label-free fluorescent strategy for alkaline phosphatase assay. *Analytical chemistry* 85(8) 3797-3801.

Zhang X et al (2014) Effect of cadmium on growth, photosynthesis, mineral nutrition and metal accumulation of an energy crop, king grass (*Pennisetum americanum* × *P. purpureum*). *Biomass and Bioenergy* 67:179-187.