

## Anatomia de raízes de videiras jovens submetidas a doses de cobre e de calcário<sup>(1)</sup>

Gustavo Brunetto<sup>(2)</sup>; Vítor Gabriel Ambrosini<sup>(3)</sup>; Daniel José Rosa<sup>(4)</sup>; George Wellington Bastos de Melo<sup>(5)</sup>; Jucinei José Comin<sup>(6)</sup>; Daniela Guimarães Simão<sup>(7)</sup>

<sup>(1)</sup> Parte da dissertação de mestrado do segundo autor. Trabalho executado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

<sup>(2)</sup> Professor; Universidade Federal de Santa Maria; Santa Maria, RS; Email: brunetto.gustavo@gmail.com; <sup>(3)</sup> Estudante de mestrado; Universidade Federal de Santa Catarina; <sup>(4)</sup> Estudante de mestrado; Universidade Federal de Santa Catarina; <sup>(5)</sup> Pesquisador; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; <sup>(6)</sup> Professor; Universidade Federal de Santa Catarina; <sup>(7)</sup> Professora; Universidade Federal de Santa Maria.

**RESUMO:** O trabalho objetivou avaliar os efeitos da toxicidade de Cu sobre a anatomia radicular de videiras jovens e o efeito amenizante da calagem em solo de textura arenosa contaminado. Os tratamentos consistiram da adição de duas doses de calcário (0,0 e 3,0 Mg ha<sup>-1</sup>) e de Cu (0 e 50 mg kg<sup>-1</sup>), em solo de textura arenosa. Videiras jovens 'Niágara Branca' (*Vitis labrusca* L.) foram cultivadas por 70 dias em ambiente controlado. No final do cultivo, por meio de técnicas de microscopia óptica, avaliaram-se diâmetro, áreas do córtex e do cilindro vascular das raízes e números de células contendo compostos fenólicos. As avaliações foram realizadas por observações de secções transversais das raízes. O excesso de Cu no solo aumenta o diâmetro e as áreas do córtex e do cilindro vascular das raízes e causa o acúmulo de compostos fenólicos nas células do córtex do ápice radicular. A calagem reduz a toxidez de Cu, evitando alterações anatômicas e reduzindo o acúmulo de compostos fenólicos nas raízes das plantas expostas a este metal pesado.

**Termos de indexação:** *Vitis* sp., toxidez de Cu, calagem.

### INTRODUÇÃO

As frequentes aplicações de fungicidas à base de cobre (Cu) para o controle de doenças fúngicas foliares em videiras (*Vitis* sp.) tem causado o acúmulo do metal pesado no solo ao longo dos anos (Brunetto et al., 2014).

O Cu, apesar de ser um nutriente essencial às plantas, quando em excesso pode ser tóxico, provocando, por exemplo, alterações anatômicas nas raízes das plantas e, conseqüentemente, prejudicar o seu crescimento (Michaud et al., 2008).

A toxidez de Cu também provoca estresse oxidativo nas plantas, reduzindo a sua taxa fotossintética e prejudicando seu crescimento (Michalak, 2006). Sendo assim, para proteger-se dos danos oxidativos causados por metais pesado,

as plantas podem estimular a síntese de compostos fenólicos, que possuem propriedades antioxidantes e podem se acumular em diferentes órgãos da planta (Michalak, 2006). Portanto, o acúmulo de compostos fenólicos no interior da planta, além de ser um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, pode ser um indicativo de toxidez.

A disponibilidade do Cu no solo é maior em condições de acidez; por isso, a calagem, que normalmente é realizada antes da implantação de um vinhedo, pode reduzir a disponibilidade do metal pesado e, conseqüentemente, a sua absorção pelas plantas (Agbenin & Olojo, 2004). Sendo assim, a calagem tem potencial para amenizar a toxidez de Cu em plantas cultivadas em solo com alto teor do metal pesado. Porém, ainda é necessário estabelecer a dose de calcário adequada em cada tipo de solo para amenizar a toxidez de Cu em videiras jovens.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da toxicidade de Cu sobre a anatomia radicular de videiras jovens e o efeito amenizante da calagem em solo de textura arenosa contaminado.

### MATERIAL E MÉTODOS

O solo utilizado no experimento foi coletado na camada de 0-20 cm em uma área de campo nativo adjacente a vinhedos no município de Santana do Livramento, região da Campanha Gaúcha (RS), região Sul do Brasil, e foi classificado como Argissolo Vermelho (Embrapa, 2013). Antes da implantação do experimento o solo possuía as seguintes características: teores de argila, silte e areia 61, 30 e 909 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente; MOS 8,8 g kg<sup>-1</sup> (Embrapa, 1997); pH em água (1:1) 4,5; Al, Ca e Mg trocáveis (extraídos com KCl 1 mol L<sup>-1</sup>), 3,1; 2,0 e 1,8 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>, respectivamente; P disponível 4,8 mg kg<sup>-1</sup> e K trocável 30,7 mg kg<sup>-1</sup> (Tedesco et al., 1995); e Cu disponível 2,4 mg kg<sup>-1</sup> (extraído com Na<sub>2</sub>-EDTA 0,05 mol L<sup>-1</sup>/acetato de amônio 1,0 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0) (Chaignon & Hinsinger,

2003).

Após a coleta, o solo foi seco ao ar, passado em peneira com malha de 2 mm e homogeneizado. Posteriormente, o solo foi dividido em três partes, nas quais foram adicionadas doses de calcário equivalentes a 0,0, 1,5 e 3,0 Mg ha<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (PRNT 100%), sendo incubado por 40 dias. O calcário aplicado era composto por uma mistura de CaCO<sub>3</sub> e MgCO<sub>3</sub>, com proporção para manter a relação Ca:Mg de 2:1. Cada uma das três partes de solo foi novamente separada em duas: a primeira foi mantida sem a aplicação de Cu e a segunda recebeu a aplicação de 50 mg kg<sup>-1</sup> de Cu na forma de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O. As amostras de solo foram incubadas novamente por 30 dias. Nas duas incubações, o solo foi mantido com água a 70% da capacidade de campo.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com seis repetições. Neste resumo foram apresentados apenas quatro dos seis tratamentos, sendo duas doses de calcário (0,0 e 3,0 Mg ha<sup>-1</sup>) e duas de cobre (0 e 50 mg kg<sup>-1</sup>), constituindo um arranjo experimental 2x2.

Foram cultivadas videiras jovens 'Niágara Branca' (*Vitis labrusca* L.) por 70 dias em ambiente controlado (fitotron), com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz dia<sup>-1</sup> e radiação fotossinteticamente ativa de 200 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Cada unidade experimental foi composta por um recipiente do tipo rhizobox de dimensões 20 x 32 x 4 cm (largura x altura x profundidade), contendo 1,2 kg de solo, disposto na bancada com inclinação aproximada de 30°, onde foi transplantada uma muda de videira.

Ao longo do cultivo, foi aplicada a solução de Hoagland & Arnon (1950) modificada (sem Cu, Ca e Mg), adicionada parceladamente a cada semana. Ao todo, foram adicionados, por kg de solo: 15,8 mg de N; 2,4 mg de P; 17,6 mg de K; 5,0 mg de S; 5,4 mg de Cl; 0,4 mg de Fe; 0,2 mg de Na; 37,0 µg de B; 37,6 µg de Mn; 3,8 µg de Zn e 0,2 µg de Mo. Além disso, a umidade do solo foi monitorada diariamente e, quando necessário, foi realizada a irrigação.

No final do experimento, foram selecionadas aleatoriamente cinco raízes no terço inferior de cada rhizobox, sendo seccionadas, com auxílio de um bisturi e de uma pinça, amostras de 1,5 cm a partir do ápice radicular. Cada amostra foi dividida em dois segmentos: um com 0,5 cm de comprimento a partir do ápice para as secções longitudinais, e o outro com 1,0 cm para as secções transversais. Neste resumo estão os resultados apenas das secções transversais.

As amostras foram fixadas em solução de

paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (1:1) com pH 7,2, por 24 horas (Schmidt et al., 2009). Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e, em seguida, desidratadas em série etílica crescente. Na sequência, o solo foi retirado da superfície das raízes utilizando uma lavadora ultrassônica (modelo MaxiClean 750, Unique®). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de inclusão em glicol-metacrilato (Historesin, Leica®), de acordo com as indicações do fabricante. Após a secagem, as secções foram realizadas com espessura de 5 µm em micrótomo manual (modelo RM 2135, Leica®) com navalha de aço. As secções foram alocadas em lâminas histológicas, coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8 (O'Brien et al., 1964) e montadas com bálsamo-do-canadá. Na sequência, as lâminas foram observadas em microscópio óptico (modelo BX40, Olympus®). A captura das imagens foi realizada por uma câmera fotográfica (modelo DP71, Olympus®) acoplada ao microscópio.

O diâmetro das raízes e as áreas do córtex e do cilindro vascular foram determinados analisando as imagens das secções transversais com o software ImageJ®. O número de células do córtex contendo compostos fenólicos foram determinados por contagem, utilizando as imagens das secções transversais das raízes.

Neste resumo não foram apresentados dados numéricos, sendo apresentadas apenas as imagens das secções transversais. Mas, a magnitude das alterações provocadas pelos tratamentos foi discutida no texto.

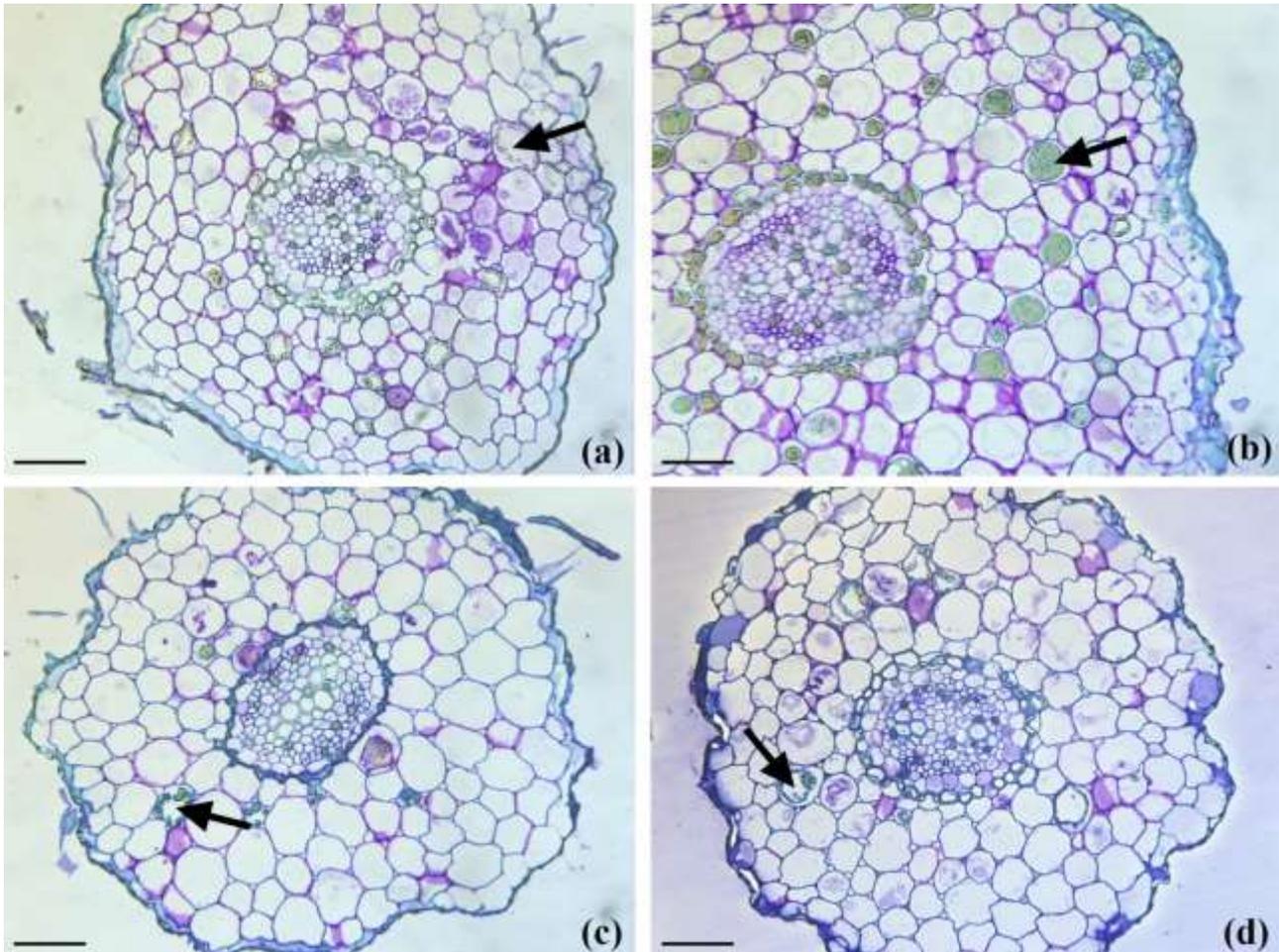
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de secções transversais das raízes sob diferentes tratamentos (Figura 1a-d) revelou alterações estruturais apenas quando adicionado 50 mg kg<sup>-1</sup> de Cu sem a calagem (Figura 1b). Nestas condições, houve o aumento de 47% no diâmetro, de 128% na área do córtex e de 93% na área do cilindro vascular das raízes, em média (dados não apresentados). Com a adição de 3,0 Mg ha<sup>-1</sup> de calcário (Figura 1d), as raízes apresentaram redução nessas variáveis, exibindo medidas semelhantes às raízes das plantas cultivadas em solo sem adição de Cu.

O aumento na área do córtex e, conseqüentemente, do diâmetro das raízes nas videiras jovens pode ter sido provocado pela desorganização no arranjo das células do córtex (constatado nas secções longitudinais, não

apresentadas neste resumo). Mas, além disso, o aumento do diâmetro das raízes expostas a altos teores de metais pesados normalmente é relacionado à inibição do comprimento das raízes

(Arduini et al., 1995; Rucinska et al., 1999), o que, por sua vez, está associado a distúrbios na divisão celular (Rucinska et al., 1999).



**Figura 1.** Secções transversais a 0,5–2,0 cm do ápice radicular de videiras jovens ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca* L.) cultivadas em solo com e sem adição de Cu e de calcário.

(a) – sem adição de Cu e sem calcário; (b) – com adição de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu e sem calcário; (c) – sem adição de Cu e com  $3,0 \text{ Mg ha}^{-1}$  de calcário; (d) – com adição de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu e com  $3,0 \text{ Mg ha}^{-1}$  de calcário. Setas: células do córtex com acúmulo de compostos fenólicos. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

As raízes das videiras jovens cultivadas em todos os tratamentos apresentaram células contendo compostos fenólicos (Figura 1a-d). No entanto, para essa variável, a adição de Cu no solo sem a calagem promoveu incremento médio de 132% no número de células do córtex com compostos fenólicos (Figura 1b); mas, quando foi adicionado  $3,0 \text{ Mg ha}^{-1}$  de calcário (Figura 1d), observou-se um menor número de células do córtex contendo esses compostos.

Nas secções transversais também é possível observar o acúmulo de compostos fenólicos em células da endoderme (Figura 1a-d). E, assim como

nas demais camadas do córtex, o acúmulo mais intenso desses compostos ocorreu nas raízes das plantas cultivadas em solo com adição de Cu e sem calagem (Figura 1b).

Segundo Michalak (2006), o acúmulo desses compostos nas plantas com estresse por metais pesados é uma estratégia de defesa contra o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas com mais intensidade nessa situação. Ainda segundo esse autor, alguns compostos fenólicos também atuam na síntese de lignina nas plantas e, por isso, o seu incremento nas raízes poderia promover o reforço da parede celular e formar barreiras físicas contra a entrada e

a distribuição dos metais pesados na planta.

Os sintomas do excesso de Cu na estrutura anatômica das raízes das videiras jovens foram amenizados com a adição de calcário. Em parte, isso por ser explicado porque a calagem aumenta o pH do solo, reduzindo a disponibilidade do Cu (Agbenin & Olojo, 2004). Além disso, isso pode ser atribuído ao incremento, pela calagem, de Ca e o Mg no solo, que são constituintes da pectina presente na lamela média e, por isso, o seu incremento na planta (dados não apresentados) pode promover o reforço da parede celular, reduzindo os efeitos tóxicos do Cu sobre os tecidos radiculares (Hawkesford et al., 2012).

### CONCLUSÕES

O excesso de Cu no solo aumenta o diâmetro e as áreas do córtex e do cilindro vascular das raízes e causa o acúmulo de compostos fenólicos nas células do córtex do ápice radicular.

A calagem reduz a toxidez de Cu, evitando alterações anatômicas e reduzindo o acúmulo de compostos fenólicos nas raízes das plantas expostas a este metal pesado.

### AGRADECIMENTOS

À FAPERGS e ao CNPq, pelo financiamento do trabalho; e à professora Marisa Santos, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelas contribuições na interpretação dos resultados.

### REFERÊNCIAS

AGBENIN, J.O. & OLOJO, L.A. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. *Geoderma*, 119:85-95, 2004.

ARDUINI, I.; GODBOLD, D.L.; ONNIS, A. Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Tree Physiology*, 15:411-415, 1995.

BRUNETTO, G; MIOTTO, A; CERETTA, C.A.; SCHMITT, D.E.; HEINZEN, J.; MORAES, M.P.; CANTON, L.; TIECHER, T.L.; COMIN, J.J.; GIROTTO, E. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide amended vineyard sandy soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60:609-624, 2014.

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

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: Embrapa-CPNS, 1997. 212p.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3 ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353p.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MOLLER, I.S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P., ed. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)*. London: Academic Press, 2012. p.135-189.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.T. The water culture method for growth plants without soil. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32p. (University of California, Circular 347).

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15:523-530, 2006.

MICHAUD, A.M.; CHAPPELLAZ, C.; HINSINGER, P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant and Soil*, 310:151-165, 2008.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59:368-373, 1964.

RUCINSKA, R.; WAPLAK, S.; GWÓZDZ, E.A. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37:187-194, 1999.

SCHMIDT, E.C.; SCARIOT, L.A.; ROVER, T; BOUZON, Z.L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*, 40:860-869, 2009.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p.