

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA-UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS-PPG RGV

Daniel José Rosa

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM VIDEIRA (*Vitis* sp.)
CULTIVADA EM SOLO COM ACÚMULO DE Cu E
FITOPROTEÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES

Florianópolis, 2015

Daniel José Rosa

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM VIDEIRA (*Vitis* sp.)
CULTIVADA EM SOLO COM ACÚMULO DE Cu E
FITOPROTEÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Rosete
Pescador

Florianópolis, 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosa, Daniel José

Alterações fisiológicas em videira (*Vitis sp.*) cultivada em solo com acúmulo de Cu e fitoproteção com fungos micorrízicos arbusculares / Daniel José Rosa ; orientadora, Rosete Pescador - Florianópolis, SC, 2015.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Metal pesado. 3. Fotossíntese. 4. Crescimento de videiras. 5. Micorriza. I. Pescador, Rosete. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Walmor e Marlene, e ao meu irmão Solismar
por todo amor, dedicação e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Walmor e Marlene, e ao meu irmão Solismar por todos os ensinamentos, carinho, amor e pelo apoio incondicional durante toda esta trajetória. Obrigado!

À minha namorada Andreia, por superar a distância, a saudade, o tempo. Obrigado por todo amor, carinho, compreensão e apoio durante estes anos.

À minha orientadora Prof. Dra. Rosete Pescador, pela oportunidade de orientação, receptividade, atenção e compreensão durante todo este trabalho.

Ao Pós-doutorando Marcelo Borghezan, por todas as experiências repassadas, ajudas nos experimentos e nas redações, pela companhia e apoio nos congressos, pelas viagens à São Joaquim e principalmente pela amizade.

Aos professores Gustavo Brunetto, Cláudio Soares, Aparecido Lima da Silva, Jucinei Comim e Afonso Voltolini por todas as orientações e acompanhamento dos trabalhos.

Ao Vítor Ambrosini que fez parte de toda essa formação. Obrigado pela receptividade, pelos conhecimentos repassados, pelas ajudas na parte prática e teórica, pela companhia, amizade e incentivo.

Ao colega Alex Basso pela ajuda nos experimentos, atividades no laboratório e pela amizade.

Aos colegas de laboratório, Daniela De Conti, Rafaela D. Liz, Jenny Paola Corredor, Vivian Almeida, Dilnei Medeiros, Márcia Rossarolla, pela amizade, companhia e incentivo.

Aos integrantes do Núcleo de Estudos da Uva e do Vinho, Laboratório de Análise do Solo, Água e Tecidos Vegetais, Laboratório de Microbiologia do Solo-CCB que participaram das atividades nos experimentos, avaliações e análises.

Ao colega Joseph Ree pelas correções de Inglês que contribuíram para as publicações.

Aos amigos Samuel Kamphorst e Rosenilda Souza pela receptividade, companhia e conselhos.

À professora e amiga Simone Sehnem por todo incentivo e dedicação durante a fase de seleção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de ingressar no curso e participar de minha formação acadêmica.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado, fundamental para minha manutenção e realização deste trabalho.

As agências financiadoras, CNPQ, FAPESC e FAPERGS pelo financiamento do estudo.

À EMBRAPA UVA E VINHO e em especial ao Dr. George Wellington de Melo pela produção das mudas de videira e troca de informações durante a pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

RESUMO

As videiras frequentemente são submetidas às aplicações sucessivas de fungicidas cúpricos que causam acúmulo de Cobre (Cu) no solo, o que pode causar toxidez as videiras transplantadas em solos de vinhedos antigos erradicados. A disponibilidade de Cu às plantas pode ser restringida pela calagem, ou ainda, a toxidez pode ser amenizada através da inoculação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). O objetivo dos estudos foi avaliar o desempenho de videiras jovens cultivadas em solo com alto teor de Cu através da calagem e inoculação com FMA. Com isso, esta dissertação se divide em três capítulos. O experimento de capítulo 1 e 2 foi conduzido em ambiente controlado. Os tratamentos consistiram de duas doses de Cu (0 e 50 mg kg⁻¹) e três de calcário (0,0; 1,5 e 3,0 Mg ha⁻¹) em Argissolo Vermelho. As plantas foram acondicionadas em rhizobox e cultivadas durante dez semanas. Foram determinadas taxas de trocas gasosas, matéria seca de raízes, caule e folhas, número de folhas, diâmetro do colmo, número de nós, e foi quantificado o teor de clorofilas *a*, *b* e total, carboidratos solúveis, amido, proteínas, Cu, N, P, K, Ca e Fe totais nas folhas. O cultivo de videiras jovens 'Niágara Branca' (*Vitis labrusca*) em solo com adição de Cu foi prejudicado quando não houve calagem ou a mesma foi de 1,5 Mg ha⁻¹, resultando em menor desenvolvimento e redução dos teores de nutrientes na folha. A aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário, reduziu os efeitos tóxicos do Cu sobre as plantas de videira cultivadas em solo com a adição de 50mg kg⁻¹ de Cu. O experimento do capítulo 3 foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se solo de um vinhedo comercial com teores elevados de Cu. No momento do transplante das plantas para os vasos, as raízes foram inoculadas com os FMA: *D. heterogama*, *A. morrowiae* e *R. clarus*, além de um tratamento testemunha. O cultivo foi mantido durante 10 semanas, no qual foram obtidos os dados referentes à altura de planta, área foliar de planta, as taxas de trocas gasosas, colonização micorrízica, MS de raízes, caule e folha, número de folhas, diâmetro de colmo, teores de carboidratos solúveis totais, amido total, Clorofila *a*, *b* e total, carotenoides, teores de Cu e P nas plantas. A inoculação com *R. Clarus* foi o responsável pelo maior incremento em altura, MS de folhas, MS de caule e colonização micorrízica e menor teor de Cu nas folhas das videiras. Conclui-se que os FMA são capazes de amenizar a toxidez as plantas e contribuir para o estabelecimento das mudas em vinhedos com alto teor de Cu no solo.

Palavras-chave: Metal pesado, calagem, teor de nutrientes, micorriza, fotossíntese, *Vitis* sp.

ABSTRACT

Successive applications of copper fungicides to grape vines can cause accumulation of copper (Cu) in soil, this potentially causing toxic effects on grape vines cultivated at old vineyards. However, Cu availability in the soil may be reduced through liming and the toxic effects of on plants alleviated through inoculation of mycorrhizal fungi (MF). The goal of this dissertation, divided into three chapters, was to evaluate the performance of young grape vines grown in soil with high Cu content, treated by liming, and inoculated with MF. Experiments for chapter one and two were conducted in a controlled environment. Treatments consisted of two doses of Cu (0 and 50 mg kg⁻¹) and three of limestone (0.0, 1.5 and 3.0 Mg ha⁻¹) in red agrisoil. The plants were placed in rhizoboxes and cultured for ten weeks. Gas exchange rates, root, stem, and leaf dry matter, number of leaves, stem diameter, number of nodes, quantity of chlorophylls *a* and *b*, total soluble carbohydrates, starch, proteins, Cu, N, P, K, Ca, and Fe in leaves were recorded. Young 'Niagara Branca' grape (*Vitis labrusca*) vines grown in soil with Cu with 0 or 1.5 Mg ha⁻¹ limestone had restricted growth, resulting in lower development and reduction of leaf nutrient content. Application of 3.0 Mg ha⁻¹ lime reduced the toxic on grape vines grown in soil with the addition of 50 mg kg⁻¹ Cu. The experiment of Chapter 3 was conducted in a greenhouse using soil with high levels of Cu from a commercial vineyard. Grape vine roots were inoculated with MF: *D. heterogama*, *A. morrowiae* and *R. clarus*, plus a control treatment during transplant to pots for ten weeks. Plant height, leaf area, gas exchange rates, mycorrhizal colonization, root, stem, and leaf dry mass, number of leaves, stem diameter, total soluble carbohydrates, total starch, chlorophyll *a* and *b* content, total carotenoids and concentration of Cu and P were recorded. Inoculation with *R. clarus* promoted the greatest height growth, leaf and stem dry weight, mycorrhizal colonization and decreased Cu leaf content. It was concluded that the MF are able to alleviate Cu toxicity and contribute to improved grape cultivation in vineyards with heavy Cu content.

Keywords: Heavy Metal, liming, nutrient content, mycorrhiza, photosynthesis, *Vitis* sp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. Height (cm) of young plants of “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations. Means followed by the same capital letters factor for copper within the liming factor and lowercase to liming factor in the factor copper do not differ by Tukey test (5%).....35

CAPÍTULO 2

Figura 1. Modelo matemático para estimativa da área foliar em plantas jovens de ‘Niágara Branca’ através do comprimento da nervura central46

Figura 2. Altura (cm) de plantas jovens ‘Niagara Branca’, cultivadas em solo com diferentes níveis de calagem e teores de cobre.....51

Figura 3- Área foliar de videiras jovens de ‘Niágara Branca’ cultivadas em solo com diferentes níveis de calagem e teores de cobre.....52

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Modelo matemático para estimativa da área foliar de videiras jovens ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*)70

Figura 2 – Porcentagem de colonização micorrízica de videiras jovens do porta-enxerto ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*), com e sem inoculação com FMA, em solo com alto teor de Cu72

Figura 3 – Matéria seca de folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA73

Figura 4 – Altura de plantas (cm) de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA74

Figura 5 – Teor de P nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videiras ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA76

Figura 6 – Acúmulo de P nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videiras ‘P1103’ cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA76

Figura 7 – Teor de Cu nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videiras ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA77

Figura 8 – Acúmulo de Cu nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videiras ‘P1103’ (<i>Vitis berlandieri x rupestris</i>) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA	78
Figura 9 – Percentual de acúmulo de Cu nas raízes, caule e folhas de videiras ‘P1103’ cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA	79
Figura 10 – Taxa de assimilação de CO ₂ , condutância estomática e transpiração de videiras ‘P1103’ (<i>Vitis berlandieri x rupestris</i>) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA	80
Figura 11 – Carboidratos solúveis totais de videiras ‘P1103’ (<i>Vitis berlandieri x rupestris</i>) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Fresh weight and dry weight (g) of shoots of seedlings vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations.....	34
Table 2. Chlorophyll <i>a</i> , chlorophyll <i>b</i> seedling vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations (mg g ⁻¹).....	35
Table 3. Total chlorophyll and carotenoids seedling vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations (mg g ⁻¹).....	36
Table 4. CO ₂ assimilation rate and stomatal conductance (μmol m ² s ⁻¹) of seedlings vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations	37
Table 5. Transpiration rate (μmol m ² s ⁻¹) seedling vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations.....	37

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores de F e coeficientes de variação calculados na análise de variância para as variáveis analisadas em videiras jovens ‘Niágara Branca’ <i>Vitis labrusca</i> , cultivadas em solo com e sem adição de Cu, e com doses crescentes de calcário.....	48
Tabela 2. Matéria seca das folhas, caules e raízes, número de folhas, diâmetro do colmo (cm), número de nós, carboidratos solúveis totais, amido total e proteínas totais (mg g ⁻¹ MF) em videiras jovens ‘Niágara Branca’ (<i>Vitis labrusca</i>) cultivadas em solo com e sem adição de Cu e com doses crescentes de calcário.....	49
Tabela 3. Teor total de Cu, N, P, K, Ca, Mg e Fe em folhas de videiras jovens ‘Niágara Branca’, cultivadas em solo com e sem adição de Cu, e com doses crescentes de calcário	54
Anexo 1. Atributos físicos e químicos do Argissolo Vermelho usado para o cultivo de videiras jovens ‘Niágara Branca’ (<i>Vitis labrusca</i>) com e sem adição de Cu, e com doses crescentes de calcário.....	63

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Número de folhas, diâmetro do colmo, área foliar, amido total, clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total, carotenoides nas plantas de porta-enxerto de videira	
--	--

‘P1103’ (<i>Vitis berlandieri x rupestris</i>) cultivadas em solo com alto teor de Cobre e inoculação com FMA	75
Tabela 2 – Amido total, clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total, carotenoides nas plantas de porta-enxerto de videira ‘P1103’ (<i>Vitis berlandieri x rupestris</i>) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação com FMA.....	82
Anexo 1: Valores de F e coeficientes de variação calculados na análise de variância para todas as variáveis analisadas em plantas de porta-enxerto de videiras ‘P1103’ (<i>Vitis berlandieri x rupestris</i>) cultivadas em solo com alto teor de Cobre e inoculação com FMA	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μg – Micrograma
 μmol – Micromol
ABA – Ácido abcísico
As – Arsênio
ATP – Adenosina trifosfato
B – Boro
Ca – Cálcio
Cd - Cádmiio
Cl – Cloro
cm – Centímetro
 cm^2 - Centímetro quadrado
 CO_2 – Gás carbônico
CTC – Capacidade de troca de cátions
Cu – Cobre
DMSO – Dimetilsulfóxido
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
ERRO – Espécie reativa a oxigênio
Fe – Ferro
FMA – Fungo Micorrízico Arbuscular
g – grama
ha – Hectare
IRGA – Infrared Gaz Analyzer
K – Potássio
kg – quilograma
 m^2 - Metro quadrado
MF – Massa fresca
Mg – Megagrama
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mm – milímetro
mmol – Milimol
MS – Matéria seca
N – Nitrogênio
Na – Sódio
 O_2 – Oxigênio
 OH^- - Hidroxila
P – Fósforo
ppm – Parte por milhão

PRNT – Poder reativo de neutralização total

S – Enxofre

s – Segundo

Zn – Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	25
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 1	31
PHOTOSYNTHESIS AND GROWTH OF YOUNG VINES “NIÁGARA BRANCA” (<i>Vitis Labrusca</i>) CULTIVATED IN SOIL WITH HIGH LEVELS OF COPPER AND LIMING	31
1. INTRODUCTION	32
2. MATERIALS AND METHODS	33
3. RESULTS AND DISCUSSION	34
4. CONCLUSION	37
REFERENCES	38
CAPÍTULO 2	41
DESENVOLVIMENTO DE VIDEIRAS JOVENS ‘NIÁGARA BRANCA’ (<i>Vitis labrusca</i>) EM SOLO COM ALTO TEOR DE COBRE E DOSES DE CALCÁRIO	41
RESUMO	42
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Coleta e preparo do solo	43
2.2 Obtenção do material vegetal e condução experimental.....	44
2.3 Coleta do material vegetal	45
2.4 Modelo matemático para estimativa de área foliar	45
2.5 Análises de nutrientes nas folhas	46
2.6 Açúcares solúveis totais e amido total.....	46
2.7 Extração e determinação do conteúdo de proteínas totais	47
2.8 Análises estatísticas	47
3 RESULTADOS	47
3.1 Produção de matéria seca das videiras jovens	47

3.2	Número de folhas, diâmetro do colmo e número de nós.....	50
3.3	Altura e área foliar das videiras jovens	50
3.4	Carboidratos solúveis totais, amido total e proteínas totais..	52
3.5	Teor de nutrientes nas folhas.....	53
4	DISCUSSÃO.....	55
4.1	Produção de matéria seca, altura e área foliar das videiras jovens	55
4.2	Carboidratos solúveis totais, amido e proteínas totais.....	56
4.3	Teor de nutrientes nas folhas.....	57
5	CONCLUSÃO.....	58
	ANEXOS	63
	CAPÍTULO 3.....	65
	ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO CULTIVO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA PAULSEN 1103 (<i>Vitis berlandieri x rupestris</i>) CULTIVADAS EM SOLO COM ALTO TEOR DE COBRE.....	65
	RESUMO.....	66
1	INTRODUÇÃO.....	66
2	MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1	Coleta e preparo do solo.....	68
2.2	Obtenção do material vegetal e condução experimental	68
2.3	Coleta do material vegetal.....	69
2.4	Colonização micorrízica.....	69
2.5	Modelo matemático para estimativa de área foliar.....	69
2.6	Análises dos teores totais de P e Cu nas folhas, caule e raízes	70
2.7	Trocas gasosas.....	70
2.8	Análises de pigmentos fotossintéticos e açúcares	71
2.9	Análises estatísticas.....	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71

4	CONCLUSÃO	83
	ANEXOS.....	87
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	89

INTRODUÇÃO GERAL

A viticultura possui grande importância socioeconômica em nível mundial sendo produzida nos cinco continentes com, aproximadamente, 7,2 milhões de hectares. Segundo dados da FAO, (2014), a produção mundial de uvas atingiu 67,06 milhões de toneladas no ano de 2012, sendo que está em crescimento constante a mais de 20 anos (MELLO, 2013).

No Brasil, a viticultura abrange 82.507 hectares que compreendem uma produção anual aproximada de 1,46 milhão de toneladas de uva, sendo que o Rio Grande do Sul é o maior produtor, seguido do Vale do São Francisco (Bahia e Pernambuco), São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais (MELLO, 2013).

O cultivo da videira no Brasil é realizado normalmente em pequenas propriedades, com topografia acidentada, onde predomina o uso da mão-de-obra familiar e pelo uso de variedades de origem americana (*Vitis labrusca*), devido à maior tolerância as doenças fúngicas existentes, especialmente o míldio (*Plasmopara vitícola*) e antracnose (*Elsinoe ampelina*), causadores de grande perda econômica (MELLO, 2010).

Em geral, as áreas utilizadas para o cultivo da videira no sul do Brasil apresentam elevados índices pluviométricos, com elevada umidade relativa do ar e altas temperaturas durante o ciclo produtivo (TONIETTO, 2007). Essas condições favorecem o desenvolvimento de doenças fúngicas que provocam danos a produção e qualidade da uva (SANTOS, 2006).

Com isso, as videiras são submetidas a sucessivas aplicações de fungicidas foliares que causam acúmulo de cobre (Cu) no solo, principalmente nas camadas mais superficiais (BRUNETTO *et al.*, 2014). A prática de revolvimento do solo, no momento da replantagem dos vinhedos, acelera a mineralização da matéria orgânica do solo (MO) e, como grande parte do Cu está ligado a MO ocorre uma elevada liberação do metal pesado as plantas jovens.

O alto teor de Cu podem provocar toxidez às plantas levando a efeitos negativos na taxa fotossintética (BRUNETTO *et al.*, 2007), podendo ocasionar alteração da arquitetura e a diminuição do comprimento de raízes (SHELDON; MENZIES, 2005), bem como, alterar a estrutura celular das raízes e da parte aérea das plantas (WÓJCIK; PAWLIKOWSKA-PAWLĘGA; TUKIENDORF, 2009).

Os pigmentos foliares, como a clorofila e os carotenoides, têm suas concentrações diminuídas progressivamente quando submetidos a frações

de Cu (CAMBROLLÉ *et al.*, 2013). Por sua vez, esses pigmentos são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia para o desenvolvimento das plantas, estando diretamente ligados à eficiência fotossintética (LASHBROOKE *et al.*, 2010).

O Cu em elevadas concentrações pode afetar nutricionalmente as plantas de videira, ocorrendo diminuição do metabolismo do nitrogênio (N) ocasionado pela redução das atividades enzimáticas responsáveis, tendo por consequência baixos teores de (N) nas folhas e demais partes da planta (LLORENS *et al.*, 2000).

O potássio (K) também tem sua translocação afetada, tendo consequência direta na translocação de água e crescimento das plantas. Isso pode ser considerado um mecanismo de defesa da planta, na qual a redução do metabolismo é menos prejudicial, do que, em relação à entrada de Cu pelas vias simplásticas e apoplásticas (ROMEUMORENO; MAS, 1999), além da diminuição da absorção de água e nutrientes minerais causadas pela deformação das raízes (SHELDON; MENZIES, 2005).

Quando em teores tóxicos, os metais podem causar danos nas membranas celulares, ácidos nucleicos e cloroplastos, gerando aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) que precisam ser catalisadas e eliminadas para proteger a planta do estresse oxidativo (TEWARI *et al.*, 2002; YRUELA, 2009).

No entanto, a disponibilidade de Cu às plantas pode ser restringida pela correção da acidez do solo através da calagem (MEIER *et al.*, 2012; NACHTIGALL *et al.*, 2007). Elevar o pH do solo diminui a disponibilidade de Cu disponível na solução do solo por formar complexos de esfera interna com óxidos de alumínio e ferro (MEIER *et al.*, 2012).

Os efeitos negativos causados as plantas, também podem ser amenizados através de associações simbióticas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Esses microrganismos desempenham mecanismos de proteção à toxicidade de metais pesados, dentre eles o Cu, através da melhoria do estado nutricional de fósforo (P) das plantas simbióticas (SOARES; SIQUEIRA, 2008) ou ainda pela sua capacidade de armazenar o Cu em compartimentos com funções metabólicas restritas, como esporos e vesículas, onde esse metal possa causar menos danos (CORNEJO *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho fisiológico de videiras jovens (*Vitis* sp.) cultivadas em solo

com alto teor de Cu através do uso da calagem e inoculação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares.

Esta dissertação está dividida em três capítulos, sendo o Primeiro: Fotossíntese e crescimento de videiras jovens “Niágara Branca” (*Vitis labrusca*) cultivadas em solo com alto teor de cobre e calagem. O Segundo: Desempenho de mudas de videira ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*) em solo com alto teor de cobre e calcareado. O terceiro: Associação de fungos micorrízicos arbusculares no cultivo do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de cobre.

REFERÊNCIAS

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

BRUNETTO, GUSTAVO; MELO, G. W. B; SCHÄFER JUNIOR, A; KAMINSKI, J; CERETTA, C. A. Taxa fotossintética e acúmulo de matéria seca e nutrientes em videiras jovens na Serra Gaúcha cultivadas em solos com excesso de Cu. **Embrapa Uva e Vinho**, 2007.

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; OCETE, R.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 294–301, 2013.

CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; et al. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 925–928, 2013. Elsevier Ltd.

FAO. Faostat agriculture data – croops and crops processed – grape an wine, 2014.

LASHBROOKE, J. G.; YOUNG, P. R.; STREVER, A. E.; STANDER, C.; VIVIER, M. A. The development of a method for the extraction of carotenoids and chlorophylls from grapevine leaves and berries for HPLC profiling. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, n. 2, p. 349–360, 2010.

LLORENS, N.; AROLA, L.; BLADÉ, C.; MAS, A. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v. 160, p. 159–163, 2000.

MEIER, S.; BORIE, F.; CURAQUEO, G.; BOLAN, N.; CORNEJO, P. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 280–287, 2012.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira : panorama 2010. **Embrapa**, 2010.

MELLO, L. M. R. Viticultura Brasileira: Panorama 2012. **Embrapa**, v. 2011, n. Tabela 1, p. 1–5, 2013.

NACHTIGALL, G. R.; CORRÊA, R.; REYNALDO, L.; ALLEONI, F. Formas de cobre em solos de vinhedos em função do pH e da adição de cama-de-frango. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, p. 427–434, 2007.

ROMEU-MORENO, A.; MAS, A. Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2519–22, 1999.

SANTOS, H. DOS. Aspectos ecofisiológicos na condução da videira e sua influência na produtividade do vinhedo e na qualidade dos vinhos. 2006.

SHELDON, A. R.; MENZIES, N. W. The Effect of Copper Toxicity on the Growth and Root Morphology of Rhodes Grass (*Chloris gayana* Knuth.) in Resin Buffered Solution Culture. **Plant and Soil**, v. 278, n. 1-2, p. 341–349, 2005.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 6, p. 833–841, 2008.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N.; BISHT, S. S. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt, v. 162, p. 381–388, 2002.

TONIETTO, J. Evaluación climática global de las zonas vitícolas, p. 1–11, 2007.

WÓJCIK, M.; PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA, B.; TUKIENDORF, A. Physiological and ultrastructural changes in *Arabidopsis thaliana* as affected by changed GSH level and Cu excess. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, n. 6, p. 820–829, 2009.

YRUELA, I. Copper in plants : acquisition , transport and interactions, n. i, p. 409–430, 2009.

CAPÍTULO 1

PHOTOSYNTHESIS AND GROWTH OF YOUNG VINES “NIÁGARA BRANCA” (*Vitis Labrusca*) CULTIVATED IN SOIL WITH HIGH LEVELS OF COPPER AND LIMING

Artigo publicado:

Daniel José Rosa, Vítor Gabriel Ambrosini, Alex Basso, Marcelo Borghezan, Gustavo Bruneto, Rosete Pescador. Photosynthesis and growth of young vines “Niágara Branca” (*Vitis labrusca*) cultivated in soil with high levels of copper and liming. **BIO Web off Conferences**. 2014. DOI: 10.1051/bioconf/20140301005

Abstract. The objective of this study was to evaluate the photosynthetic response and growth of young vines 'White Niagara' grown in soil with high content of Cu and liming. The experiment was conducted in controlled environment with soil subjected to three levels of liming, with 0, 1.5 and 3.0 Mg ha⁻¹ of lime. Also, part of the soil was added 50 mg kg⁻¹ Cu and the other part of the soil received no Cu. The CO₂ measurements, assimilation rate, stomatal conductance and transpiration were carried out in the tenth cultivation week using the IRGA equipment (Infrared Gaz Analyzer). Was also measured plant height, fresh weight and dry weight, the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids. For most variables, the Cu had damaging effect of liming with 0 and 1.5 Mg ha⁻¹, as with the setting of 3.0 Mg ha⁻¹ there was no significant damage. Rates of CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration were superior with the addition of 50 mg kg⁻¹ Cu. Liming to raise the pH of the soil is an effective practice to reduce the effects of Cu toxicity in young vines "Niagara Branca".

1. INTRODUCTION

Young "Niagara Branca" grape vines (*Vitis labrusca*) are routinely subjected to successive applications of fungicides and copper (Cu)-based Bordeaux mixture for preventive control of foliar fungal diseases. Residual Cu can accumulate in soils after continuous application, increasing the available form of the element [5; 3].

Cu is an essential to the growth and development of plants micronutrient, but when the soil at high levels can be absorbed by plants in excessive amounts and cause decreased concentrations of photosynthetic pigments, such as chlorophyll and carotenoids, which are responsible for the conversion of light into chemical energy in the form of NADPH and ATP with the releasing O₂ [4]. However, impairment of the photosynthetic efficiency of plants, resulting in reduced growth. Therefore, become necessary strategies to mitigate the toxic effects of Cu to young vines.

When the pH of the soil is low, Cu forms are available in greater amounts in soil [1] and therefore, the use of lime for its repair may be an important tool to reduce the availability of the element in the soil, and hence its uptake by plants. Therefore, the application of lime to raise the pH can be an important strategy to reduce the toxicity of Cu to plants.

The study aimed to evaluate the photosynthetic response and growth of young vines “Niágara Banca” grown in soil with high content of Cu and liming levels.

2. MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at Federal University of Santa Catarina-SC, in a controlled environment room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a $16 \text{ h light day}^{-1}$ photoperiod with photosynthetically active radiation of $200 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1} \pm 10$ using seedlings produced by *in vitro* propagation, after about 60 days of acclimatization. The soil was 0-20 cm from the area and was not subjected to anthropic application. Then was incubation with lime at doses of 0, 1.5 and 3.0 Mg ha^{-1} to obtain the values of pH 5.2; 6.0 and 7.0, with lime termed 1, 2 and 3 respectively. Limestone was used (MgCO_3 e CaCO_3) PA (PRNT 100%), Synth the mark with relation Ca:Mg of 2:1. After incubation of the soil, the pH of the treatment was 4.5; 5.5 and 6.2. Also added 50 mg kg^{-1} Cu, and part of the soil received no Cu. The experimental design was a randomized block design with six replications in a 3×2 factorial. Each experimental unit consisted of an allocated plant in a ‘rizobox’ vessel containing 1.2 kg of plant soil.

CO_2 measurements, assimilation rate, stomatal conductance and transpiration were carried out in the tenth cultivation week in time from 10 to 12 using the IRGA equipment (Infrared Gaz Analyzer) model Li-6140XT under a closed system with 380 ppm CO_2 and photosynthetic active radiation of $1000 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and leaf area of 6 cm^2 . The plant height was measured using a ruler.

At the end of the experiment, the plants were segmented, weighed and dried at 65°C until constant mass and then to shoot biomass was determined with a precision balance. The concentration of chlorophyll a, b, total and carotenoid was determined by the method dimethylsulfoxide (DMSO), using 100 mg of sound foliar and incubated in a water bath with 7 mL DMSO at 65°C for two hours, with no maceration. After filtering, the total volume was adjusted to 10 mL . The values obtained by spectrometry were used in equations Wellburn (1994) being data expressed in $\mu\text{g mL}$: chlorophyll a = $[12.19 * (\text{A}665) - 3.45 * (\text{A}649)]$; chlorophyll b = $[21.99 * (\text{A}649) - 5.32 * (\text{A}665)]$. The total chlorophyll content was determined from the sum of Chl a and Chl b. The content of carotenoids was estimated from the formula: total carotenoids = $[1.000 * (\text{A}480) - 2.14 * (\text{Chl a}) - 70.16 * (\text{Chl b})] / 220$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The fresh weight and dry weight of shoots were reduced with the increase of Cu in soil, with the exception of plants grown in soil with addition of 3.0 Mg ha⁻¹ of lime (Table 1). With this level of liming biomass production of 50 Cu treatment increased significantly and did not differ significantly from the treatments without added Cu. For treatments without the addition of copper, liming factor was not significant. (Table 1). For both treatments, the percentage of dry mass was 35% of the fresh weight.

Table 1. Fresh weight and dry weight (g) of shoots of seedlings vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations.

	Fresh weigth of aerial			Dry weigth of aerial		
	Cu 0	Cu 50	Average	Cu 0	Cu 50	Average
Liming 1	6,04 aA	4,00 bB	5,02 b	2,14 aA	1,48 bB	1,81 b
Liming 2	6,53 aA	4,61 bB	5,57 ab	2,35 aA	1,69 bAB	2,02 ab
Liming 3	6,34 aA	5,93 aA	6,13 a	2,15 aA	1,95 aA	2,05 a
Average	6,30 A	4,85 B		2,21 A	1,71 B	
CV(%)	11,33			11,58		

(*) Means followed by different lowercase letters in the column differ by Tukey test at 5% probability of error for the liming factor. Means followed by different capital letters in the line differ by Tukey test (5%) for Cu factor.

The increment in height (Figure 1), chlorophyll (Table 2 e 3) and carotenoids (Table 3) of the plants did not differ between the levels of liming for Cu 0. However, for the Cu 50 liming factor was significant for limeing of 0 and 1.5 Mg ha⁻¹ Cu addition impaired growth and the concentration of the foliar plant pigments. For the liming of 3 Mg ha⁻¹ average equaled factor for Cu.

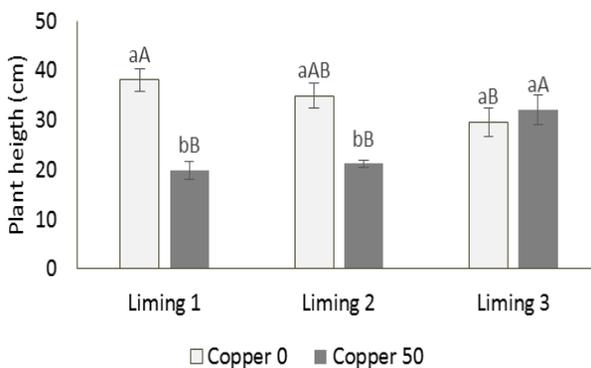


Figure 1. Height (cm) of young plants of “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations. Means followed by the same capital letters factor for copper within the liming factor and lowercase to liming factor in the factor copper do not differ by Tukey test (5%).

Table 2. Chlorophyll *a*, chlorophyll *b* seedling vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations (mg g^{-1}).

	Chlorophyll <i>a</i> *			Chlorophyll <i>b</i> *		
	Cu 0	Cu 50	Average	Cu 0	Cu 50	Average
Liming 1	1,39 aA	1,00 bB	1,20 ab	0,50 aB	0,39 bA	0,45 a
Liming 2	1,36 aA	0,82 bB	1,09 b	0,63 aA	0,39 bA	0,51 a
Liming 3	1,31 aA	1,24 aA	1,28 a	0,49 aB	0,49 aA	0,49 a
Average	1,35 A	1,02B		0,54 A	0,42 B	
CV(%)	10,96			16,73		

(*)Means followed by different lowercase letters in the column differ by Tukey test at 5% probability of error for the liming factor. Means followed by different capital letters in the line differ for Cu factor.

Table 3. Total chlorophyll and carotenoids seedling vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations (mg g^{-1}).

	Total chlorophyll *			Carotenoids		
	Cu 0	Cu 50	Average	Cu 0	Cu 50	Average
Liming 1	1,89 aA	1,39 bB	1,64 a	0,24	0,19	0,21 a
Liming 2	1,99 aA	1,21 bB	1,60 a	0,18	0,15	0,16 b
Liming 3	1,81 aA	1,73 aA	1,77 a	0,22	0,2	0,21 a
Average	1,90 A	1,45 B		0,21 A	0,18 B	
CV(%)	10,06			13,8		

(*) Means followed by different lowercase letters in the column differ by Tukey test at 5% probability of error for the liming factor. Means followed by different capital letters in the line differ for Cu factor.

Alteration in biomass in height increment and in levels of leaf pigments caused by liming may be a consequence of the reduced availability of Cu by increasing the pH of the soil [1]. Furthermore, the increase of calcium and magnesium in the soil by the addition of lime may have been beneficial for young vines because there is a competition for the absorption of these elements and Cu by plant roots, thereby reducing the content of the trace element in the tissues vegetables [6].

Chlorophyll *a* was more abundant than chlorophyll *b* for all treatments (Table 2). The relation chlorophyll *a/b* showed an average standard of 2.5, which is consistent with the values and proportions found by [2] who worked with young plants of Cabernet Sauvignon.

For the variable content of carotenoids had no effect on the interaction between factors, but it was found that the addition of Cu reduced its concentration in the leaves of young vines (Table 3).

The rate of CO_2 assimilation, stomatal conductance and transpiration behaved similarly to each other, and there was superiority of fees for treatments with the addition of Cu and no difference for the liming factor in both cases (Tables 4 and 5) . The reduction in leaf area with addition of copper caused an increase in photosynthetic activity. This effect is possibly related to offset the reduction in leaf area, a result of lower seedling development. Similar effects were observed by several authors [9, 10] to evaluate the behavior of plants at different levels of defoliation. These authors suggest that in plants with leaf restriction, the photosynthetic rate is stimulated in organs font due to a situation of stress, resulting in increased redistribution of assimilates. This effect is known as photosynthesis offset [10]. Furthermore, increasing the number of

stomata which would allow an increase in gas exchange can occur, but this variable was not assessed.

Table 4. CO₂ assimilation rate and stomatal conductance ($\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) of seedlings vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations.

	CO ₂ assimilation rate			Stomatal conductance		
	Cu 0	Cu 50	Average	Cu 0	Cu 50	Average
Liming 1	5,3 Ba	7,2 Aab	6,2 a	0,00359 Ba	0,00525 Ab	0,00442 a
Liming 2	6,6 Aa	5,4 Ab	6,0 a	0,00413 Aa	0,00365 Aab	0,00389 a
Liming 3	5,8 Ba	8,6 Aa	7,2 a	0,00311 Ba	0,00633 Aa	0,00472 a
Average	5,9 B	7,1 A		0,00361 B	0,00507 A	
CV (%)	20,61			25,97		

(*) Means followed by different lowercase letters in the column differ by Tukey test at 5% probability of error for the liming factor. Means followed by different capital letters in the line differ for Cu factor.

Tabela 5. Transpiration rate ($\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) seedling vine “Niágara Branca” grown in soil with different levels of lime and copper concentrations.

	Transpiration rate		
	Cu 0	Cu 50	Average
Liming 1	0,142 Ba	0,238 Aa	0,190 a
Liming 2	0,189 Aa	0,153 Ab	0,171 a
Liming 3	0,137 Ba	0,288 Aa	0,212 a
Average	0,156 B	0,226 A	
CV (%)	26,56		

(*) Means followed by different lowercase letters in the column differ by Tukey test at 5% probability of error for the liming factor. Means followed by different capital letters in the line differ for Cu factor.

4. CONCLUSION

The high Cu contamination in the soil causes harmful effects of the vine physiology. Liming to raise the pH of the soil is an effective practice to reduce the effects of Cu toxicity in young vines “Niágara Branca”, coming to neutralize the toxic effect with the application of 3.0 Mg ha⁻¹ for the case study.

REFERENCES

1. 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*, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 85-95, (2004).
2. Amarante, C. V. T.; Zanardi, O. D.; Miqueloto, A.; Steffens, C.; Erhart, J.; Almeida, J. Quantificação da área e do teor de clorofilas em folhas de plantas jovens de videira ‘cabernet sauvignon’ mediante métodos não destrutivos. *Rev. Brasileira de fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p. 680-686, (2009).
3. 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* (2013).
4. Cambrollé, J.; García, J. L.; Figueroa, M. E.; Cantos, M. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. *Chemosphere Vol. 93*, Issue 2, Pages 294–301, (2013).
5. Komarek M, Čadková E, Chrástný V, Bordas F, Bollinger J. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int.* 36:138-151, (2010).
6. Kopittke, P. M.; Kinraide, T. B.; Wang, P.; Blamey, F. P. C.; Reichman, S. M.; Menzies, M. W. Alleviation of Cu and Pb rhizotoxicities in cowpea (*Vigna unguiculata*) as related to ion activities at root-cell plasma membrane surface. *Environ. Sci. Technol.*, Iowa, v. 45, n. 11, p. 4966-4973, (2011).
7. Meuer, E. J. *Fundamentos de Química do solo*. 4 ed. Porto Alegre: Evangraf, (2012).
8. Wellburn, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, v. 144, p. 307-3013, (1994).

9. Chanishvili, S.S.; Bafridze, G.S.; Barblishvili, T.F.; Dolidze, M.D. Defoliation, photosynthetic rates, and assimilate transport in grapevine plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 52, n. 4, p. 448-453, (2005).

10. Poni, S.; Casalini, L.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Intrieri, C. Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition. *American Journal of Viticulture and Enology*, v. 57, n. 4, p. 397-407, (2006).

CAPÍTULO 2

**DESENVOLVIMENTO DE VIDEIRAS JOVENS 'NIÁGARA
BRANCA' (*Vitis labrusca*) EM SOLO COM ALTO TEOR DE
COBRE E DOSES DE CALCÁRIO**

RESUMO

As videiras anualmente são submetidas a aplicações sucessivas de fungicidas que causam acúmulo de Cu no solo, o que pode causar toxidez as plantas jovens no momento da replantação das mudas. No entanto, a disponibilidade de Cu às plantas pode ser restringida pela calagem. O trabalho objetivou avaliar o comportamento fisiológico de videiras jovens ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*), cultivadas em solo com e sem adição de Cu e com doses crescentes de calcário. O experimento foi conduzido em ambiente controlado utilizando-se solo coletado em uma área sem histórico de cultivo. Os tratamentos consistiram de duas doses de Cu (0 e 50 mg kg⁻¹) e três de calcário (0,0; 1,5 e 3,0 Mg ha⁻¹). As plantas foram acondicionadas em rhizobox e cultivadas durante dez semanas. Ao final do experimento foi determinado matéria seca de raízes, caule e folhas, número de folhas, diâmetro do colmo, número de nós, e foi quantificado o teor de carboidratos solúveis, amido, proteínas, Cu, N, P, K, Ca e Fe totais nas folhas. O cultivo de videiras jovens ‘Niágara Branca’ em solo com adição de Cu foi prejudicado quando não houve calagem ou com adição de calcário de 1,5 Mg ha⁻¹, resultando em menor crescimento e redução dos teores de nutrientes na folha. A aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário, que obteve o valor de pH do solo de 6,2, reduziu os efeitos tóxicos do Cu sobre as plantas de videira cultivadas em solo com a adição de 50mg kg⁻¹ de Cu no Argissolo Vermelho.

Palavras-chave: metal pesado, calagem, teor de nutrientes *Vitis* sp.

1 INTRODUÇÃO

No Sul do Brasil, onde a umidade relativa do ar é elevada, são necessárias aplicações sucessivas de fungicidas e caldas à base de cobre (Cu) para o controle preventivo e curativo de doenças fúngicas foliares, como o míldio (*Plasmopara viticola*) (CASALI *et al.*, 2008; GIROTTO *et al.*, 2013). O Cu aplicado sobre as plantas chega ao solo pela precipitação direta ou, pela senescência das folhas de videira, causando acúmulo, especialmente, nas camadas mais superficiais do solo (BRUNETTO *et al.*, 2014).

No momento da renovação do vinhedo, o revolvimento do solo para o plantio de videiras jovens tende a acelerar a mineralização da matéria orgânica do solo (MOS) e aumentar a disponibilidade de Cu às plantas jovens, uma vez que grande parte do metal está complexado à MOS (BRUNETTO *et al.*, 2014; COUTO *et al.*, 2014).

O excesso de Cu na planta, pode causar danos na anatomia das raízes e, conseqüentemente, distúrbios nutricionais (KOPITTKKE *et al.*,

2009; TOSELLI *et al.*, 2009), que afetam de forma negativa os processos fisiológicos das plantas (CAMBROLLÉ *et al.*, 2014). Por exemplo, pode interferir na síntese de proteínas e enzimas que atuam no DNA e RNA da planta, no transporte de elétrons da fotossíntese e na distribuição dos carboidratos no interior da planta (KABATA-PENDIAS, 2011).

Os sintomas de toxidez de Cu também podem resultar em redução do crescimento das videiras jovens, como relatado por TOSELLI *et al.*, (2009), CHEN *et al.*, (2013), JUANG *et al.*, (2014) e CAMBROLLÉ *et al.*, (2015). Por consequência, a toxidez pode dificultar o estabelecimento das plantas jovens no pomar, inclusive deixando-as mais suscetíveis a patógenos (SPANN; SCHUMANN, 2010).

A disponibilidade de Cu às plantas pode ser restringida pela correção da acidez do solo através da calagem. O incremento OH^- na solução do solo e provoca a precipitação do Cu e aumento da capacidade de trocar cátions (CTC) (MEURER, 2012). Além disso, a calagem incrementa grande quantidade de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) no solo, que competem com o Cu pelas vias de absorção (KOPITTKE, *et al.*, 2011) e auxilia a planta a aumentar a tolerância a toxidez por Cu e reduz o transporte para a parte aérea (CHEN *et al.*, 2013; JUANG *et al.*, 2014).

O trabalho objetivou avaliar o comportamento fisiológico de videiras jovens ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*), cultivadas em solo com e sem adição de Cu e com doses de calcário.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo do solo

O solo utilizado no experimento foi coletado na camada de 0-20 cm em uma área de campo natural adjacente a vinhedos no município de Santana do Livramento, região da Campanha Gaúcha (RS), região Sul do Brasil, classificado como Argissolo Vermelho (EMBRAPA, 2013) com os parâmetros químicos apresentados no Anexo 1. Após a coleta, o solo foi seco ao ar, passado em peneira com malha de 2 mm, homogeneizado e reservado.

O solo reservado foi dividido em três porções, nas quais foram adicionadas doses de calcário equivalentes a 0,0; 1,5 e 3,0 Mg ha⁻¹ de CaCO₃ (PRNT 100%), homogeneizados e, posteriormente, incubado por 40 dias. O calcário era uma mistura de CaCO₃ e MgCO₃, ambos da marca Synth (reagentes PA), com proporção para manter a relação Ca:Mg de 2:1. Cada uma das três porções 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⁻¹ de Cu na forma de CuSO₄.5H₂O (reagente PA da marca Synth). O solo ficou incubado novamente por 30 dias. Nas duas incubações, o solo foi mantido com água a 70% da capacidade de campo.

Após o preparo, o solo foi dividido em duas porções: uma porção para a condução do experimento e outra para as análises de caracterização química e granulométrica, apresentadas no anexo 1.

2.2 Obtenção do material vegetal e condução experimental

As videiras jovens utilizadas no experimento foram da cultivar ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*), obtidas através de micropropagação e aclimatadas por um período de 60 dias de aclimatização.

O experimento foi conduzido em ambiente controlado (fitotron) com temperatura de 25°C±2 e fotoperíodo de 16 horas de luz dia⁻¹, com radiação fotossinteticamente ativa de 200 µmol de fótons m⁻² s⁻¹.

As unidades experimentais foram compostas por recipientes do tipo rhizobox de dimensões 20 cm x 32 cm x 4 cm (largura x altura x profundidade), construídos em madeira e com as faces internas revestidas com placas de acrílico para evitar o contato do solo e das raízes das plantas com a madeira. A face superior foi coberta com papel alumínio, e as duas faces do recipiente foram envoltas com um plástico de cor preta para evitar a incidência de luz no interior do solo. Os rhizobox foram dispostos sobre bancada com inclinação aproximada de 30° para possibilitar o crescimento das raízes em direção à face de acrílico, permitindo a sua visualização mediante a retirada do plástico que revestia o recipiente. Em cada unidade experimental foram adicionados 1,2 kg de solo, onde foi acondicionada uma planta de ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*) aclimatizada.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com seis repetições em arranjo fatorial 2 x 3, sendo duas doses de Cu (0 e 50 mg kg⁻¹) e três doses de calcário (0, 1,5 e 3,0 Mg ha⁻¹), totalizando seis tratamentos: sem adição de Cu e sem calcário; sem adição de Cu e com 1,5 Mg ha⁻¹ de calcário; sem adição de Cu e com 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário; com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e sem calcário; com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e com 1,5 Mg ha⁻¹ de calcário; com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e com 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário.

As plantas foram cultivadas por um período de 60 dias. Ao longo do cultivo, foi aplicada a solução de HOAGLAND; ARNON (1950), modificada (sem Cu, Ca e Mg), adicionada parceladamente em doze vezes, nos dias 2, 6, 11, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55. Ao longo dos dias 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.

2.3 Coleta do material vegetal

Ao 60º dia de cultivo foi determinada a altura das plantas, usando régua graduada; determinado o diâmetro do colmo, usando um paquímetro; a contagem do número de folhas e de nós. Posteriormente, a parte aérea das plantas foi cortada rente à superfície do solo, e separada entre caule e folhas. Na sequência, a massa fresca (MF) de cada parte foi determinada em balança de precisão.

A MF de caule e folhas foi seca em estufa com ar forçado a 65°C até atingir massa constante para a determinação da produção de matéria seca (MS) em balança de precisão. O material moído foi reservado para posterior determinação dos teores totais de N, P, K, Ca, Mg, Cu e Fe nos tecidos vegetais. A outra porção da MF foi reservada para as análises de clorofilas *a*, *b* e total, carotenoides, carboidratos solúveis totais, amido total e proteínas totais.

2.4 Modelo matemático para estimativa de área foliar

Para desenvolver o modelo matemático foram obtidas folhas de plantas jovens ‘Niágara Branca’ que não fizeram parte do experimento, mas cultivadas no mesmo ambiente com as mesmas condições de cultivo, sendo 70 folhas completas e sadias de diferentes tamanhos obtidas aleatoriamente conforme BORGHEZAN *et al.*, (2010).

O comprimento da nervura central foi mensurado com o uso de um paquímetro e a área foliar foi determinada através de um analisador portátil (ADC – AM 300). A relação entre a área foliar avaliada e o comprimento da nervura central resultou em um modelo matemático (Figura 1), cuja equação foi utilizada para estimar a área foliar das plantas componentes do experimento através da mensuração das nervuras centrais de todas as folhas das plantas. A determinação da área foliar foi realizada no 60º dia de cultivo.

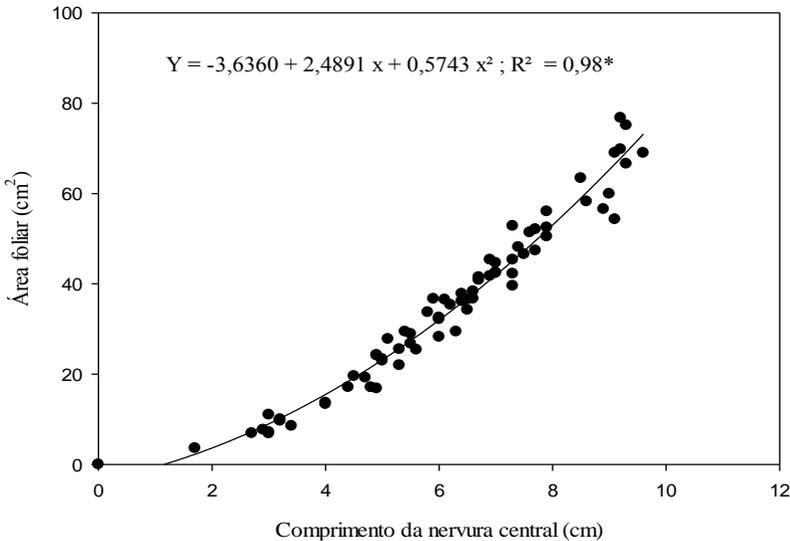


Figura 1. Modelo matemático para estimar a área foliar em plantas jovens de 'Niágara Branca' através do comprimento da nervura central.

2.5 Análises de nutrientes nas folhas

Para a determinação dos teores totais de N, P e K foi realizada a digestão sulfúrica do material, utilizando as metodologias descritas por TEDESCO et al., (1995). Para a determinação dos teores totais de Ca, Mg, Cu e Fe foi realizada a digestão em forno mufla a 500-550°C por três horas, com posterior diluição em HNO₃ 1 mol L⁻¹ (EMBRAPA, 1997). O acúmulo dos nutrientes na planta foi calculado pela multiplicação do teor de nutriente pela MS da parte aérea.

2.6 Açúcares solúveis totais e amido total

Amostras de 0,5g de material vegetal foram usadas para a quantificação dos carboidratos solúveis totais. O material foi triturado em nitrogênio líquido até obter um pó homogêneo e a extração foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, com glucose como padrão (DUBOIS *et al.*, 1956). Para a determinação do teor de amido total nas folhas, o precipitado resultante da extração dos carboidratos solúveis totais foi submetido à solubilização do amido com ácido perclórico (MCCREADY *et al.*, 1950) e quantificado pelo método fenol-sulfúrico, com glucose como padrão (DUBOIS *et al.*, 1956).

2.7 Extração e determinação do conteúdo de proteínas totais

Amostras de 500 mg de folhas foram maceradas à temperatura de 4°C com tampão de extração, composto de 50 mM L⁻¹ de fosfato de sódio dibásico (pH 7,0), 1,5% de β-mercapetanol (v/v), 0,5% de SDS (dodecil sulfato de sódio) (p/v) e 1 mM de PMSF. Estas amostras foram maceradas e centrifugadas a 10.000 G por 30 minutos a 0°C. O sobrenadante e o precipitado foram separados, sendo o sobrenadante armazenado a -20°C para posterior utilização. As proteínas totais, presentes no sobrenadante, foram precipitadas com a adição de dois volumes de álcool etílico absoluto para cada volume de sobrenadante e, em seguida, as amostras foram armazenadas a 0°C por 15 min. Após este período as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 20 minutos a 0°C. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de BRADFORD (1976), com as modificações de READ; NORTHCOTE, (1981), e com a utilização de albumina de soro bovino como padrão.

2.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Cochran para verificar a homocedasticidade. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e, quando houve significância, aplicou-se o teste de separação de médias de Tukey ($p < 0,05$). Além disso, foi realizada a análise de correlação linear entre as variáveis obtidas, apresentadas em alguns momentos no texto da discussão quando foram significativas.

3 RESULTADOS

3.1 Produção de matéria seca das videiras jovens

No solo sem calagem, a adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu reduziu a MS das raízes, do caule e das folhas em 41,3; 44,8 e 30,8%, respectivamente em relação ao solo sem calagem e sem adição de Cu (Tabela 2). Nos tratamentos com adição de 1,5 Mg ha⁻¹ de calcário, as reduções foram de 0; 32,6 e 27,8%, respectivamente. Plantas cultivadas no solo com Cu e calagem de 3,0 Mg ha⁻¹ não apresentaram redução de MS. A produção de MS nas plantas cultivadas em solo sem Cu não diferiu estatisticamente entre as doses de calcário (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de F e coeficientes de variação calculados na análise de variância para as variáveis analisadas em videiras jovens ‘Niágara Branca’ *Vitis labrusca*, cultivadas em solo com e sem adição de Cu, e com doses crescentes de calcário.

Variável	Valores de F			CV (%)
	Cu (A)	Calagem (B)	A x B	
Massa seca de raízes (g)	17,79**	1,08 ^{ns}	7,52**	17,05
Massa seca de caule (g)	20,10**	3,41*	6,80**	19,49
Massa seca de folhas (g)	57,78**	12,81**	5,08*	9,95
Número de folhas	6,99*	8,45**	9,17**	11,94
Diâmetro do colmo (mm)	2,03 ^{ns}	0,24 ^{ns}	1,90 ^{ns}	8,35
Número de nós	7,07*	6,10**	2,14 ^{ns}	13,43
Altura de planta (cm)	31,20**	0,89 ^{ns}	12,63**	18,02
Área foliar final (cm ²)	25,77**	6,26**	4,64*	11,56
Carboidratos solúveis totais (mg g ⁻¹ MF)	0,42 ^{ns}	4,79*	6,35**	12,82
Amido total (mg g ⁻¹ MF)	9,19**	5,90**	4,64*	18,48
Proteínas totais (mg g ⁻¹ MF)	15,72**	1,26 ^{ns}	0,78 ^{ns}	16,23
Teor de Cu (mg k ⁻¹ MS)	1,01 ^{ns}	8,06**	2,26 ^{ns}	20,13
Teor de N (g k ⁻¹ MS)	30,85**	0,08 ^{ns}	0,19 ^{ns}	9,02
Teor de P (g k ⁻¹ MS)	41,70**	19,61**	3,22 ^{ns}	8,42
Teor de K (g k ⁻¹ MS)	19,12**	1,90 ^{ns}	4,16*	9,35
Teor de Ca (g k ⁻¹ MS)	1,51 ^{ns}	10,80**	2,48 ^{ns}	12,33
Teor de Mg (g k ⁻¹ MS)	2,98 ^{ns}	9,56**	1,02 ^{ns}	11,66
Teor de Fe (mg k ⁻¹ MS)	1,07 ^{ns}	1,37 ^{ns}	3,29 ^{ns}	16,99

* = Significativo pelo teste F ($p < 0,05$); ** = Significativo pelo teste F ($p < 0,01$); ns = não significativo.

Tabela 2. Matéria seca das folhas, caules e raízes, número de folhas, diâmetro do colmo (cm), número de nós, carboidratos solúveis totais, amido total e proteínas totais (mg g⁻¹ MF) em videiras jovens ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*) cultivadas em solo com e sem adição de Cu e com doses crescentes de calcário.

Cu (mg kg ⁻¹)	Dose de calcário (Mg ha ⁻¹)			Média
	0,0	1,5	3,0	
----- Matéria seca das folhas (g) -----				
0	4,54 aA	5,02 aA	4,94 aA	4,83 A
50	3,14 bB	3,62 bB	4,50 aA	3,75 B
Média	3,84 b	4,32 a	4,72 a	
----- Matéria seca do caule (g) -----				
0	1,45 aA	1,41 aA	1,34 aA	1,40 A
50	0,80 bB	0,95 bB	1,39 aA	1,04 B
Média	1,12 b	1,18 ab	1,36 a	
----- Matéria seca das raízes (g) -----				
0	2,66 aA	2,17 aA	2,18 aA	2,34 A
50	1,56 bB	2,18 aA	1,76 aAB	1,84 B
Média	2,11 a	2,18 a	1,97 a	
----- Número de folhas (N) -----				
0	9,83 aA	8,83 aA	9,66 aA	9,44 A
50	6,83 bB	8,33 aB	10,33 aA	8,5 B
Média	8,33 b	8,58 b	10,00 a	
----- Diâmetro do colmo (mm) -----				
0	0,22	0,23	0,22	0,22 ^{ns}
50	0,21	0,20	0,22	0,21 ^{ns}
Média	0,21 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,22 ^{ns}	
----- Número de nós (N) -----				
0	13,83	15,66	15,00	14,83 A
50	11,16	13,16	15,16	13,17 B
Média	12,5 b	14,41 a	15,08 a	
----- Carboidratos solúveis totais (mg g ⁻¹ MF) -----				
0	8,14 aA	7,10 bA	7,83 aA	7,69 ^{ns}
50	8,67 aA	8,59 aA	6,46bB	7,90 ^{ns}
Média	8,41 a	7,85 ab	7,15 b	
----- Amido total (mg g ⁻¹ MF) -----				
0	4,65 bB	6,17 aA	4,66 aAB	5,16 B
50	7,22 aA	6,39 aAB	5,06 aB	6,22 A
Média	5,94 a	6,28 a	4,86 b	
----- Proteínas totais (mg g ⁻¹ MF) -----				

0	2,11	2,14	1,81	2,02 B
50	2,64	2,42	2,46	2,51 A
Média	2,37 ^{ns}	2,28 ^{ns}	2,14 ^{ns}	

(1) Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ns = não significativo.

3.2 Número de folhas, diâmetro do colmo e número de nós

A adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu no solo sem calagem reduziu o número de folhas em 30,5% em relação ao solo sem adição de Cu e sem calagem (Tabela 2). Para o solo com adição de Cu e calagem de 1,5 Mg ha⁻¹ a redução foi de apenas 5,6%, em relação ao solo sem adição de Cu com a mesma calagem. A aplicação de 50 mg kg⁻¹ de Cu no solo com calagem de 3,0 Mg ha⁻¹ não reduziu o número de folhas.

O diâmetro do colmo das videiras jovens não foi alterado pela adição de Cu e de doses de calcário no solo.

O número de nós das videiras jovens teve efeito significativo para aplicação de Cu e calagem, no entanto, não se observou interação (Tabela 1). A adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu provocou redução na média de número de nós por planta em relação as plantas cultivadas sem adição de Cu no solo de 11,2%. As videiras cultivadas no solo com calagem de 1,5 e 3,0 Mg ha⁻¹ aumentaram o número de nós em 15,3 e 20,6 %, respectivamente, em relação às plantas cultivadas no solo sem calagem (Tabela 2).

3.3 Altura e área foliar das videiras jovens

A altura das plantas teve efeito de interação entre Cu e calagem e também efeito significativo para a adição de Cu no solo, mas, não houve efeito para o fator calagem (Tabela 1). No solo com Cu e sem calagem, as videiras jovens apresentaram a menor altura, sendo 49,1% menor em relação as plantas cultivadas no solo sem Cu e sem calagem. As videiras cultivadas no solo com Cu e com calagem de 1,5 Mg ha⁻¹ diminuiu a altura em 39,4% em relação ao solo com a mesma calagem sem adição de Cu. As videiras cultivadas em solo com calagem de 3,0 Mg ha⁻¹ apresentaram a maior altura de planta e não sofreram redução com a adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu no solo.

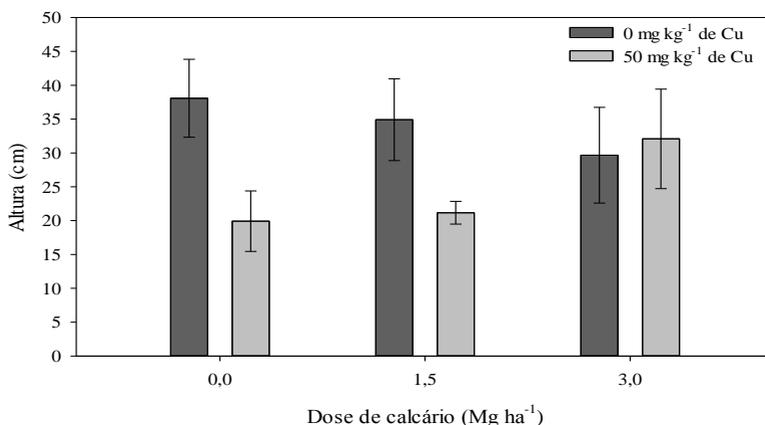


Figura 2. Altura (cm) de videiras jovens, ‘Niagara Branca’, cultivadas em solo com diferentes níveis de calagem e teores de cobre.

Para a área foliar das plantas houve efeito de interação entre a aplicação de Cu e de calcário, e também efeito significativo para ambos (Tabela 1). Os maiores valores de área foliar, nas videiras cultivadas no solo com a adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu foi observado quando a calagem foi de 3,0 Mg ha⁻¹. Para as plantas cultivadas no solo sem calagem, e calagem de 1,5 Mg ha⁻¹ a adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu reduziu a área foliar das plantas em 31,6 e 15,6% respectivamente (Figura 3). Quando observado apenas as médias do fator calagem, percebe-se que a aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário apresentou resultado superior aos obtidos sem calagem ou com a aplicação de 1,5 Mg ha⁻¹, em 16,4 e 13,2%, respectivamente.

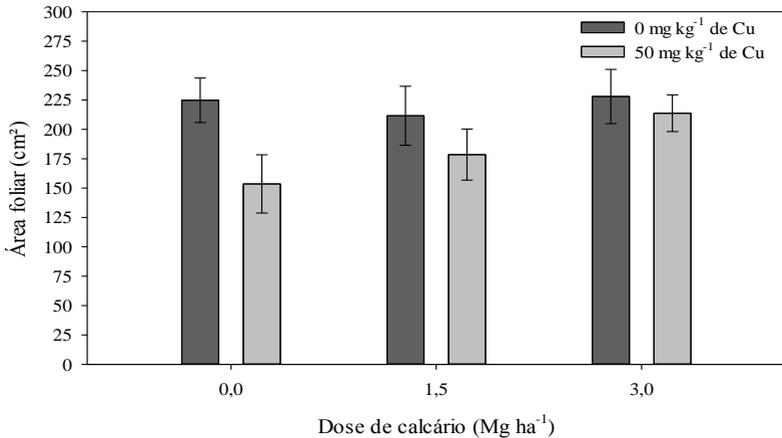


Figura 3- Área foliar de videiras jovens de ‘Niágara Branca’ cultivadas em solo com diferentes níveis de calagem e teores de cobre.

3.4 Carboidratos solúveis totais, amido total e proteínas totais

Para o teor de carboidratos solúveis totais nas folhas, houve efeito significativo para o fator calagem e para a interação entre os fatores (Tabela 1). Observando as médias obtidas para o fator calagem foi constatado que nas aplicações de 1,5 e 3,0 Mg ha⁻¹ as folhas apresentaram menor teor de carboidratos solúveis totais nas folhas das videiras jovens, sendo esta redução de 6,6 e 15,0%, respectivamente em relação à média do solo sem calagem. Nas videiras cultivadas em solo com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e calagem de 3,0 Mg ha⁻¹ observou-se o menor teor de carboidratos solúveis totais nas folhas. Esta redução foi de 17,5% em relação as plantas cultivadas em solo com calagem de 3 Mg kg⁻¹ sem adição de Cu (Tabela 2).

O maior teor de amido total nas folhas foi verificado nas videiras cultivadas em solo sem calagem e com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu. A aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário reduziu a médias do teor de amido nas folhas quando comparado as plantas que não receberam calagem ou esta foi de 1,5 Mg ha⁻¹, em 18,1 e 22,6 % respectivamente. Para as plantas cultivadas em solo com a adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e sem calagem, o teor de amido total aumentou em 55,3% em relação as plantas cultivadas em solo sem adição de Cu e sem calagem (Tabela 2). Observando os resultados verificou-se que, assim como o que ocorreu para os

carboidratos solúveis totais, o acúmulo de amido na planta foi inversamente proporcional ao seu incremento em biomassa.

O teor de proteínas totais nas folhas das videiras jovens teve efeito significativo apenas para o fator Cu (Tabela 1). As videiras cultivadas em solo com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu obtiveram média 24,3 % superior em relação à média das plantas cultivadas sem adição de Cu (Tabela 2).

3.5 Teor de nutrientes nas folhas

O teor de Cu nas folhas das videiras jovens foi afetado apenas pelo fator calagem (Tabela 1). As videiras cultivadas em solo com calagem de 1,5 Mg ha⁻¹, reduziram em 30,9% o teor do metal nas folhas, em relação as plantas cultivadas sem calagem (Tabela 2). Mas, as plantas cultivadas com a aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário, não alteraram o teor de Cu nas folhas em relação as plantas cultivadas em solo sem calagem.

O teor de N nas folhas das plantas teve efeito significativo somente para o fator Cu. A média do teor de N nas folhas das videiras cultivadas em solo com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu foi menor que nas plantas cultivadas em solo sem adição de Cu. Essa redução correspondeu à 21,1 % (Tabela 3).

Tabela 3. Teor total de Cu, N, P, K, Ca, Mg e Fe em folhas de videiras jovens ‘Niágara Branca’, cultivadas em solo com e sem adição de Cu, e com doses crescentes de calcário.

Cu (mg kg ⁻¹)	Dose de calcário (Mg ha ⁻¹)			Média
	0,0	1,5	3,0	
-----Cu (mg kg ⁻¹ MS)-----				
0	14,10	11,59	14,49	13,39
50	16,02	9,21	18,98	14,74
Média	15,06 a	10,40 b	16,74 a	
-----N (mg kg ⁻¹ MS)-----				
0	44,68	43,86	44,56	44,37 A
50	33,83	35,46	35,70	35,00 B
Média	39,25	39,66	40,13	
-----P (mg kg ⁻¹ MS)-----				
0	2,68	3,10	3,33	3,04 A
50	2,01	2,07	2,96	2,35 B
Média	2,34 b	2,59 b	3,14 a	
-----K (mg kg ⁻¹ MS)-----				
0	9,16 aA	9,16 aA	8,51 aA	8,95 A
50	7,86 aAB	6,20 bB	8,05 aA	7,37 B
Média	8,51	7,68	8,28	
-----Ca (mg kg ⁻¹ MS)-----				
0	13,52	13,84	15,84	14,40
50	10,26	12,97	16,98	13,40
Média	11,89 b	13,40 b	16,41 a	
-----Mg (mg kg ⁻¹ MS)-----				
0	4,37	4,68	5,54	4,86
50	4,31	5,57	6,15	5,35
Média	4,34 b	5,13 ab	5,85 a	
-----Fe (mg kg ⁻¹ MS)-----				
0	76,89	120,12	95,98	97,67
50	110,44	100,30	107,57	106,10
Média	93,67	110,21	101,77	

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); ns = não significativo.

O teor de P nas folhas de videiras jovens não teve efeito de interação significativo. A média do teor de P nas folhas das videiras jovens cultivadas em solo com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu sofreu redução de 22,7% em relação à média das plantas cultivadas em solo sem adição de Cu. Observando as médias do fator calagem é possível constatar que a

aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário resultou no maior teor de P nas folhas, sendo que este foi 34,2 e 21,2% maior que os verificados nas videiras cultivadas em solo sem calagem ou com calagem 1,5 Mg ha⁻¹, respectivamente (Tabela 3).

A média do teor de K nas folhas das videiras cultivadas em solo com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu foi 17,6 % menor que nas plantas cultivadas em solo sem adição de Cu (Tabela 3). As videiras jovens cultivadas em solo sem adição de Cu não sofreram interferência das doses de calagem para o teor de K nas folhas, todavia, as videiras cultivadas com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e calagem de 3,0 Mg ha⁻¹ resultaram em média 2,4 e 29,8 % maior que as plantas cultivadas em solo com calagem de 0,0 e 1,5 Mg ha⁻¹, respectivamente, e com adição de Cu (Tabela 3). Nesta interação é possível observar que a aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ foi capaz de neutralizar o efeito do Cu para o teor de K nas folhas.

Os teores de Ca e Mg nas folhas das videiras jovens não apresentaram efeito de interação e também não foram significativos para o fator Cu (Tabela 1). No entanto, ocorreu aumento dos teores de Ca e Mg nas folhas com o aumento da dose de calcário aplicada (Tabela 3). Para o teor de Ca nas folhas, a aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário resultou em média 38,0 e 22,5%, respectivamente, superior as doses de 0 e 1,5 Mg ha⁻¹ e para o Mg, 34,8 e 14,0%, respectivamente.

O teor de Fe nas folhas das videiras jovens cultivadas não foi afetado pela adição de Cu e pelas doses de calagem (Tabela 1), mantendo-se, em média, em 101,88 mg kg⁻¹ MS.

4 DISCUSSÃO

4.1 Produção de matéria seca, altura e área foliar das videiras jovens

A redução da MS nas raízes foi consequência da sensibilidade das videiras jovens ao alto teor de Cu no solo. Altos teores de Cu no solo podem causar a diminuição do alongamento das raízes, provocar má formação e alterações na organização das células do córtex e da epiderme (CHEN *et al.*, 2013). Danos ao sistema radicular afetam negativamente a absorção de água e nutrientes, o que justifica a redução na altura da planta e, consequentemente, a menor MS de caule e folhas (Tabela 1) das videiras jovens cultivadas em solo com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu (KOPITKE, *et al.*, 2011; LEQUEUX *et al.*, 2010). O efeito tóxico do Cu causado em videiras jovens também foi comprovado por

CAMBROLLÉ *et al.*, (2015), que verificou a toxidez para o porta-enxerto de videira “41B” e também para videiras selvagens no sul da Espanha, onde ambas apresentaram redução na MS, com 23 mM de Cu.

A redução da altura das videiras (Figura 2) provocada pelo excesso de Cu no solo também justifica a diminuição do número de folhas, número de nós (Tabela 2) e da área foliar (Figura 3). Isso pode ser explicado porque o excesso de Cu pode causar distúrbios no crescimento e desenvolvimento das plantas por iniciar danos oxidativos e interferir na permeabilidade da membrana plasmática, além de participar da biossíntese de componentes da parede celular, lignificação, percepção hormonal e produção de metabólitos secundários, o que afeta negativamente os processos fisiológicos importantes inibindo raízes e parte aérea (YRUELA, 2009).

A calagem de 3 Mg ha⁻¹ foi capaz de amenizar o efeito tóxico causado pelo excesso de Cu na produção de MS das videiras jovens, o que pode ser explicado pelo aumento do pH do solo (Anexo 1), uma vez que aumenta a capacidade de troca de cátions (CTC) no solo (JORIS *et al.*, 2012). Com o aumento da CTC, ocorre a desprontonação de grupos funcionais, aumentando as cargas negativas do solo. Além disso, há mais cátions presentes no solo, entre eles o Ca e o Mg, que podem competir com o Cu pela absorção pelas raízes. Com isso, pode haver a redução da absorção do Cu (ou da entrada dele no simplasto) em detrimento de outros cátions (KOPITTKÉ, *et al.*, 2011). Além disso, o aumento do pH eleva a concentração de OH⁻ e, com isso, o Cu precipita tornando-se menos disponível as plantas (AGBENIN; OLOJO, 2004).

4.2 Carboidratos solúveis totais, amido e proteínas totais

O aumento no teor de carboidratos solúveis totais e amido totais nas folhas das videiras cultivadas em solo com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e sem calagem, pode ser justificada pelo menor incremento MS. Isso aconteceu, provavelmente porque houve redução da demanda de energia nas plantas submetidas ao estresse (ALAOUI-SOSSÉ *et al.*, 2004) e também pela maior taxa de assimilação de CO₂ encontrada em videiras estressadas pelo Cu (ROSA *et al.*, 2014), em decorrência da compensação fotossintética (PONI *et al.*, 2006). O aumento da taxa de assimilação de CO₂ resulta em maior produção de fotoassimilados, e isso consequentemente aumenta o teor de carboidratos solúveis totais nas folhas, todavia, como parte não é utilizado a planta armazena na forma de amido provocando acúmulo nas folhas (ALAOUI-SOSSÉ *et al.*, 2004).

Isso pode ser constatado pela correlação negativa entre o número de folhas das videiras e o teor de carboidratos solúveis totais ($R = -0,84$).

O teor de proteínas totais nas folhas foi maior nas videiras cultivadas em solo com adição de 50 mg kg^{-1} de Cu. Isso provavelmente ocorreu pois o Cu participa da síntese de proteínas, e também pode iniciar danos oxidativos nas células, e por isso, induzir a produção de enzimas catalizadoras de oxigênio para minimizar esses danos. Muitas dessas enzimas, que atuam no sistema antioxidante, entre elas, a catalase, a superóxido dismutase e a peroxidase, que são enzimas detectadas na análise de proteínas totais (YRUELA, 2009). Ainda o ácido abscísico (ABA) pode ser estimulado e induzir a síntese de proteínas envolvidas na defesa do estresse e, assim, desempenhar um papel importante na tolerância das plantas ao Cu (YANG *et al.*, 2011).

A correlação negativa entre o teor de proteínas totais e a MS de folhas ($R = -0,88^*$) pode estar relacionado com um efeito de diluição das proteínas para as plantas que não receberam adição de Cu.

4.3 Teor de nutrientes nas folhas

A aplicação de 50 mg kg^{-1} de Cu reduziu os teores de N, P e K nas folhas das plantas de videira (Tabela 3), o que sugere que o Cu prejudicou a absorção dos nutrientes do solo. Isso se justifica pela toxidez causada nas raízes, que resultou na redução da MS das mesmas. A exposição das raízes a altos teores de Cu, além da inibição do alongamento, também reduz o número de pelos radiculares e provoca danos na cutícula, rachaduras, ramificação anormal e espessamento das raízes. Esse conjunto de fatores resulta em menor absorção de água e de nutrientes pelas plantas (CHEN *et al.*, 2013; JUANG *et al.*, 2014; KOPITTKKE, PETER M. *et al.*, 2011; SHELDON; MENZIES, 2005), o que pode ser comprovado pela análise de correlação entre o teor de N nas folhas e a MS das folhas ($R = 0,87^*$) e ainda pela correlação entre o teor de P nas folhas e MS das folhas ($R = 0,88^*$).

Em relação ao teor de P nas folhas, CAMBROLLÉ *et al.* (2014), em estudo com porta-enxerto de videira 41B e variedades selvagens, verificou que o incremento de Cu na solução reduziu o teor de P nas folhas, sendo mais acentuado nas variedades menos tolerantes. Isso pode ser explicado por uma alteração das membranas que provoca a perda de PO_4^{3-} pelas raízes (KABATA-PENDIAS, 2011) e, por isso, esse nutriente fica em menor concentração na parte aérea. O mesmo efeito pode ser observado para o K, que também tem seus íons perdidos pelas raízes em função dos danos causados pelo Cu (KABATA-PENDIAS, 2011). A

entrada excessiva de Cu no citosol provoca danos oxidativos e, com isso, induz a produção de EROs e radicais de hidroxila (OH⁻) que provocam a ativação dos canais de efluxo de K⁺, ocorrendo perda massiva do nutriente pela célula e, conseqüentemente, a diminuição do teor nas folhas (RODRIGO-MORENO *et al.*, 2013).

Para os teores de Ca e Mg nas folhas não houve influência do Cu. Contudo, o aumento das doses de calcário resultou no incremento dos teores nas folhas para ambos. Esse efeito pode ser explicado pelo aumento do teor de Ca e Mg trocáveis no solo (Anexo 1) e, conseqüentemente, da disponibilidade desses nutrientes às plantas através da adição de 1,5 e 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário. Este resultado corrobora com os trabalhos de CHEN *et al.*, (2013) e JUANG *et al.*, (2014) que mostram o aumento das doses de Ca e de Mg, respectivamente, adicionados a solução incrementaram os teores desses nutrientes nos órgãos das plantas.

A concentração de Cu nas folhas não aumentou em relação à adição de Cu no solo, sendo que os teores variaram entre 9 e 19 mg kg⁻¹ MS, o que é considerado suficiente e não tóxico para videiras (JONES; WOLF; MILLS, 1991) e para a maioria das espécies cultivadas (KABATA-PENDIAS, 2011). Nossos dados corroboram com o estudo de TOSELLI *et al.*, (2009) que testou concentrações crescentes de Cu em videiras e obteve valores que variaram entre 10 e 20 mg kg⁻¹ MS de Cu nas folhas e também não encontrou diferença para o teor de Cu na folha com o aumento das doses de Cu no solo.

O teor de Fe nas folhas não diferiu estatisticamente quando o Cu foi adicionado. Possivelmente, o Fe ficou mais concentrado nas raízes e não resultou em diferença nos teores das folhas em função de competir com o Cu nas vias de absorção e transporte na planta (YRUELA, 2009), o que justifica o comportamento similar entre os teores de Cu e Fe nas folhas.

5 CONCLUSÃO

O cultivo de videiras jovens ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*) em solo com alto teor de Cu provoca efeitos danosos ao crescimento e ao metabolismo, resultando em menor crescimento e redução dos teores de nutrientes na folha, que conseqüentemente poderão retardar o estabelecimento da muda no vinhedo. A prática da calagem para elevar o pH do solo é eficaz para amenizar os efeitos de toxidez causados pelo alto teor de Cu às videiras jovens.

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**, v. 119, n. 1-2, p. 85–95, 2004.
- ALAOUI-SOSSÉ, B.; GENET, P.; VINIT-DUNAND, F.; et al. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. **Plant Science**, v. 166, n. 5, p. 1213–1218, 2004.
- BORGHEZAN, M.; GAVIOLI, O.; PIT, F. A.; SILVA, A. L. DA. Modelos matemáticos para a estimativa da área foliar de variedades de videira à campo (*Vitis vinifera* L.). **Ciencia e técnica vitivinícola**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2010.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRUNETTO, G.; MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; et al. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 5, p. 609–624, 2014.
- CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v. 120C, p. 171–178, 2014.
- CASALI, C. A.; MORTELE, D. F.; RHEINHEIMER, D. S.; et al. Formas e dessorção de cobre em solos cultivados com videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, n. 1, p. 1479–1487, 2008.
- CHEN, P.; LEE, Y.; CHEN, B.; JUANG, K. Effects of calcium on rhizotoxicity and the accumulation and translocation of copper by grapevines. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2013.

COUTO, R. R. C.; BENEDET, L.; COMIN, J. J.; et al. Accumulation of copper and zinc fractions in vineyard soil in the mid-western region of Santa Catarina, Brazil. **Environ Earth Sci**, 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, p. 212, 1997.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3a Edição ed. Brasília, 2013.

GIROTTI, E.; CERETTA, C. A.; ROSSATO, L. V.; et al. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 145–155, 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, p. 1–32, 1950.

JONES, J. B. J.; WOLF, B.; MILLS, H. A. Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. 1991.

JORIS, H.; FONSECA, A. DA; ASAMI, V. Y. .; et al. Adsorção de metais pesados após calagem superficial em um Latossolo Vermelho sob sistema de plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**, p. 1–10, 2012.

JUANG, K. W.; LEE, Y. I.; LAI, H. Y.; CHEN, B. C. Influence of magnesium on copper phytotoxicity to and accumulation and translocation in grapevines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 36–42, 2014. Elsevier.

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. 2011.

KOPITTKE, P. M.; ASHER, C. J.; BLAMEY, F. P. C.; MENZIES, N. W. Toxic effects of Cu²⁺ on growth, nutrition, root morphology, and

distribution of Cu in roots of Sabi grass. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4616–4621, 2009.

KOPITTKE, P. M.; KINRAIDE, T. B.; WANG, P.; et al. Alleviation of Cu and Pb rhizotoxicities in cowpea (*Vigna unguiculata*) as related to ion activities at root-cell plasma membrane surface. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 11, p. 4966–4973, 2011.

LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. 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. Elsevier Masson SAS.

MCCREADY, R.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. . Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. V. 22, p. 1156–1158, 1950.

MEURER, E. Fundamentos de química do solo. Porto Alegre: v. 4, 2012.
PONI, S.; CASALINI, L.; BERNIZZONI, F.; CIVARDI, S.; INTRIERI, C. Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 397–407, 2006.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 53–64, 1981.

RODRIGO-MORENO, A.; ANDRÉS-COLÁS, N.; POSCHENRIEDER, C.; et al. Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in *Arabidopsis* root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. **Plant, cell & environment**, v. 36, n. 4, p. 844–55, 2013.

ROSA, D. J.; AMBROSINI, V. G.; BASSO, A.; et al. Photosynthesis and growth of young “Niágara Branca” vines (*Vitis labrusca* L.) cultivated in soil with high levels of copper and liming. (J.-M. Aurand, Ed.) **BIO Web of Conferences**, v. 3, p. 01005, 2014.

SHELDON, A. R.; MENZIES, N. W. The Effect of Copper Toxicity on the Growth and Root Morphology of Rhodes Grass (*Chloris gayana* Knuth.) in Resin Buffered Solution Culture. **Plant and Soil**, v. 278, n. 1-2, p. 341–349, 2005.

SPANN, T. M.; SCHUMANN, A. W. Mineral Nutrition Contributes to Plant Disease and Pest Resistance. **University of Florida**, n. July, p. 1–5, 2010.

TEDESCO, M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. Análises de solo, plantas e outros materiais. **UFRGS**, p. 174, 1995.

TOSELLI, M.; BALDI, E.; MARCOLINI, G.; et al. Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, n. 1, p. 85–92, 2009.

YANG, Y.; SUN, C.; YAO, Y.; ZHANG, Y.; ACHAL, V. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Comber”) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1483–1491, 2011.

YRUELA, I. Copper in plants : acquisition, transport and interactions, n. i, p. 409–430, 2009.

ANEXOS

Anexo 1. Atributos físicos e químicos do Argissolo Vermelho usado para o cultivo de videiras jovens ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*) com e sem adição de Cu, e com doses crescentes de calcário.

Atributos	Cu0 Cal0,0	Cu0 Cal1,5	Cu0 Cal3,0	Cu50 Cal0,0	Cu50 Cal1,5	Cu50 Cal3,0
----- Antes do cultivo -----						
Argila (g kg ⁻¹)	61	61	61	61	61	61
Areia (g kg ⁻¹)	909	909	909	909	909	909
Silte (g kg ⁻¹)	30	30	30	30	30	30
COT (g kg ⁻¹)	5,1	4,5	4,9	5,6	5,6	5,4
MOS (g kg ⁻¹)	8,8	7,7	8,5	9,6	9,6	9,4
pH em água	4,5	5,6	6,4	4,4	5,4	6,1
P disponível (mg kg ⁻¹)	4,8	4,3	5,7	5,1	4,6	6,4
K trocável (mg kg ⁻¹)	30,7	26,9	29,2	34,5	32,1	33,3
Al trocável (cmol _c kg ⁻¹)	3,1	0,0	0,0	4,1	1,1	0,0
Ca trocável (cmol _c kg ⁻¹)	2,0	2,5	4,4	2,3	2,6	4,2
Mg trocável (cmol _c kg ⁻¹)	1,8	1,8	2,3	1,8	2,6	2,7
Cu-EDTA (mg kg ⁻¹) ⁽⁵⁾	2,4	2,4	2,2	23,0	23,2	21,5
Cu-CaCl ₂ (mg kg ⁻¹) ⁽⁶⁾	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
----- Depois do cultivo -----						
Cu-EDTA (mg kg ⁻¹) ⁽⁵⁾	2,61	2,47	2,76	39,51	39,22	39,65
Cu-CaCl ₂ (mg kg ⁻¹) ⁽⁶⁾	0,1	0,1	0,1	6,6	2,7	0,3

Cu0 Cal0,0 – sem adição de Cu e sem calcário; Cu0 Cal1,5 – sem adição de Cu e com 1,5 Mg ha⁻¹ de calcário; Cu0 Cal3,0 – sem adição de Cu e com 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário; Cu50 Cal0,0 – com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e sem calcário; Cu50 Cal1,5 – com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e com 1,5 Mg ha⁻¹ de calcário; Cu50 Cal3,0 – com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu e com 3,0 Mg ha⁻¹ de calcário, ⁽¹⁾Método da pipeta (**Embrapa, 1997**); ⁽²⁾Determinado conforme **Tedesco et al, (1995)**; ⁽³⁾Extraídos pelo extrator de Mehlich 1 (**Tedesco et al, 1995**); ⁽⁴⁾Extraídos pelo extrator KCl 1 mol L⁻¹ (**Tedesco et al, 1995**); ⁽⁵⁾Extraído por Na₂-EDTA 0,05 mol L⁻¹/acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹, pH 6,0 (**Chaignon & Hinsinger, 2003**); ⁽⁶⁾Extraído por CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ (**Novozamsky et al, 1993**).

CAPÍTULO 3

**ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
NO CULTIVO DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA PAULSEN
1103 (*Vitis berlandieri x rupestris*) CULTIVADAS EM SOLO COM
ALTO TEOR DE COBRE**

RESUMO

A adição de fungicidas foliares em vinhedos incrementam o teor de cobre (Cu) no solo, que pode ser tóxico as videiras jovens transplantadas nos vinhedos erradicados. A inoculação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pode reduzir a disponibilidade de Cu às plantas e com isso reduzir o efeito tóxico do Cu nas células de plantas jovens. O trabalho objetivou avaliar alterações fisiológicas do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 cultivadas em solo com alto teor de Cu e associação com diferentes espécies de FMA. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se solo de um vinhedo comercial com alto teor de Cu. As videiras foram acondicionadas em vasos. No momento do transplante, as raízes foram inoculadas com os FMA: *D. heterogama*, *A. morrowiae* e *R. clarus*, além de um tratamento testemunha. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com sete repetições. O cultivo foi mantido durante 76 dias, no qual avaliou-se a altura de planta, área foliar, as taxas de trocas gasosas, colonização micorrízica, MS de raízes, caule e folha, número de folhas, diâmetro de colmo, teores de carboidratos solúveis totais, amido total, Clorofila *a*, *b* e total, carotenoides, teores de Cu e P nas plantas. As videiras inoculadas com *R. clarus* apresentaram maior incremento em altura, produção de MS de folhas e caule, colonização micorrízica e menor teor de Cu nas folhas. Conclui-se que os FMAs estudados amenizam a toxidez do cobre às plantas e contribuem para o estabelecimento das mudas em vinhedos erradicados com alto teor de Cu no solo.

Palavras-chave: micorriza; assimilação de CO₂; metal pesado; *Vitis* sp.

1 INTRODUÇÃO

A umidade elevada nas regiões vitivinícolas do Sul do Brasil torna as videiras suscetíveis à patógenos causadores de doenças fúngicas foliares, como o míldio (*Plasmopara viticola*), que podem causar grandes perdas de produção (SÔNEGO *et al.*, 2005). Com o intuito de controlar essas doenças, as videiras são submetidas a aplicações sucessivas de fungicidas cúpricos que podem adicionar até 30 kg de Cu ha⁻¹ ano⁻¹ ao sistema de produção de uvas (GIROTTI *et al.*, 2013; NACHTIGALL *et al.*, 2007).

O Cu é um nutriente essencial para o desenvolvimento da videira, pois está associado a algumas enzimas envolvidas nas reações redoxes

como o citocromo oxidase na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e na platocianina que participa do transporte de elétrons fotossintéticos, além de fazer parte dos cloroplastos das folhas (YRUELA, 2009; MARCHSNER, 2012). Porém, quando em excesso, esse metal pode causar danos na membrana plasmática, alterações funcionais e outras perturbações metabólicas que podem afetar negativamente o conteúdo de fotoassimilados, como os açúcares e amido nas folhas (ALAOUI-SOSSÉ *et al.*, 2004).

Tem sido verificado que os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem desempenhar função importante na proteção da toxicidade de metais pesados às plantas (SOARES; SIQUEIRA, 2008). Como estratégia de sobrevivência, os FMA possuem mecanismos para evitar a toxidez por metais, como a produção de glomalina, uma proteína que é secretada e liberada no solo proporcionando a complexação dos metais (FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012). Além disso, os FMA podem compartimentalizar o Cu nos esporos sem que existam danos no seu metabolismo e, por consequência, também promove a redução da disponibilidade de Cu às raízes (CORNEJO *et al.*, 2013).

Os FMA também podem amenizar os efeitos da toxidez de metais por meio de outros mecanismos, como a retenção dos metais no micélio fúngico ou pela melhoria do estado nutricional de fósforo (P) das plantas simbióticas (SOARES; SIQUEIRA, 2008; AMBROSINI *et al.* 2015). A melhoria da nutrição de P às plantas pode proporcionar a formação de compostos de ligação metal-fosfato, complexando os metais nas raízes e evitando o seu transporte para a parte aérea (SOARES; SIQUEIRA, 2008). É importante evitar o transporte em excesso de Cu para as folhas, pois em nível celular, pode inativar ou danificar as estruturas das proteínas como resultado de ligações com grupos sulfidrilas de proteínas e, assim, inibir a atividade de enzimas, ou induzir deficiência de outros íons essenciais, o que causa deficiência nos processos de transporte da célula e dano oxidativo (YRUELA, 2009).

O efeito protetor dos FMA é dependente da espécie fúngica e da sua compatibilidade com a espécie vegetal (MEIER *et al.*, 2012). No cultivo de videiras jovens em solo arenoso com alto teor de Cu não é conhecido a espécie de FMA que melhor ameniza a toxidez de Cu às plantas.

O trabalho objetivou avaliar alterações fisiológicas no porta-enxerto de videira 'P1103' (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e em associação com diferentes espécies de FMA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo do solo

O solo utilizado no experimento foi coletado na camada de 0-20 cm em um vinhedo com aproximadamente 40 anos de cultivo, que recebeu aplicações de fungicidas cúpricos ao longo dos anos, no município de Santana do Livramento, região da Campanha Gaúcha (RS), região Sul do Brasil. O solo foi classificado como Argissolo Vermelho (EMBRAPA, 2013), e apresentou as seguintes características: teores de areia, silte e argila 901,0; 53,4; 45,6 g kg⁻¹ respectivamente; C orgânico total 7,9 g kg⁻¹; MOS 13,6 g kg⁻¹ (EMBRAPA, 1997); pH em água 6,5; P disponível 34,8 mg kg⁻¹ e K trocável 88,7 mg kg⁻¹ (TEDESCO et al., 1995); Al, Ca e Mg trocáveis (extraídos por KCL 1 mol L⁻¹), 0,0; 4,4; 1,5 cmol kg⁻¹. O teor de Cu extraído por EDTA foi 32,9 mg kg⁻¹.

Após a coleta, o solo foi seco ao ar, passado em peneira com malha de 2 mm, homogeneizado e, por duas vezes, esterilizado em autoclave a 121°C durante duas horas para evitar contaminantes.

2.2 Obtenção do material vegetal e condução experimental

As videiras utilizadas no experimento foram do porta-enxertos 'P1103' (*Vitis berlandieri x rupestris*) obtidas através da micropropagação, utilizando o meio de cultura DSD1 com 20 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar (SILVA; DOAZAN, 1995) e, posteriormente, as plantas foram aclimatizadas com substrato estéril em casa de vegetação por aproximadamente 60 dias.

Cada planta recebeu a inoculação de 100 esporos de FMA diretamente sob as raízes no momento do transplante aos vasos que continham 2 kg de solo cada. O experimento foi conduzido por 76 dias em casa de vegetação com delineamento experimental em blocos casualizados com sete repetições e quatro tratamentos, sendo uma testemunha (sem inoculação) e três espécies de FMA inoculadas: *Dentiscutata heterogama*, *Acaulospora morrowiae*, e *Rhizophagus clarus*.

Durante o período de cultivo das videiras, a temperatura ambiente mínima variou entre 17,4 e 21,8°C e a temperatura máxima, entre 30,3 e 37,7°C.

2.3 Coleta do material vegetal

Ao final do período de cultivo foi determinada a altura das plantas usando régua graduada, o diâmetro do colmo usando um paquímetro, realizada a contagem do número de folhas e de nós. Posteriormente, as plantas foram separadas em raízes, caules e folhas. Na sequência, a massa fresca (MF) de cada parte foi determinada em balança de precisão.

Uma porção da MF de cada órgão foi seca em estufa com ar forçado a 65°C até atingir massa constante para a determinação da produção de matéria seca (MS) em balança de precisão. O material foi moído e reservado para posterior determinação dos teores totais de P e Cu nos tecidos vegetais. A outra porção da MF foi reservada para as análises de clorofilas *a*, *b* e total, carotenoides, carboidratos solúveis, amido e proteínas totais.

2.4 Colonização micorrízica

Aproximadamente 2,0 g de raízes foram submetidas à clarificação e coloração com azul de tripan (KOSKE; GEMMA, 1989) para a avaliação da colonização micorrízica pelo método das intersecções em placas reticuladas (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980).

2.5 Modelo matemático para estimativa de área foliar

Para desenvolver o modelo matemático da estimativa de área foliar, foram obtidas aleatoriamente 90 folhas completas e sadias de diferentes tamanhos de plantas não utilizados no experimento, conforme BORGHEZAN *et al.*, (2010).

Nas folhas selecionadas, o comprimento da nervura central foi mensurado com o uso de um paquímetro e a área foliar foi determinada através de um analisador portátil (ADC – AM 300).

A relação entre a área foliar avaliada e o comprimento da nervura central resultou no modelo matemático (Figura 1), cuja equação foi utilizada para estimar a área foliar das plantas componentes do experimento através da mensuração do comprimento das nervuras centrais de todas as folhas das plantas.

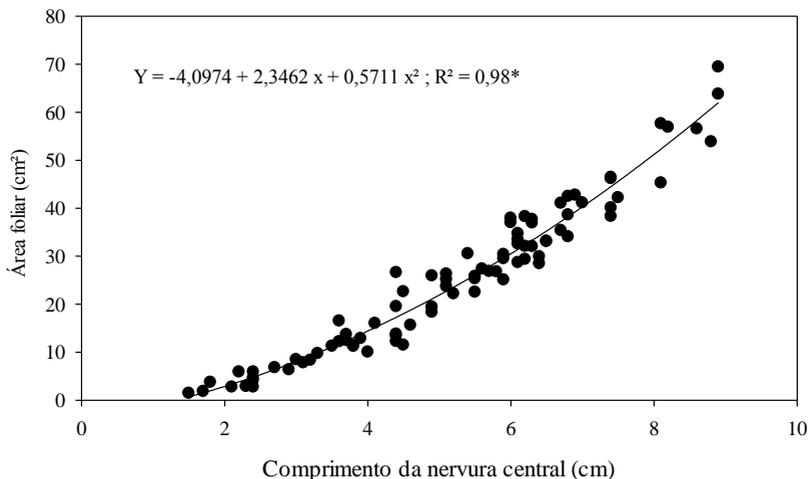


Figura 1 – Modelo matemático para estimativa de área foliar de videiras jovens do porta-enxerto ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*).

2.6 Análises dos teores totais de P e Cu nas folhas, caule e raízes

Para a determinação dos teores totais de P foi realizada a digestão sulfúrica do material (TEDESCO et al., 1995), e para a determinação dos teores totais de Cu foi realizada a digestão a 500-550°C por três horas, com posterior diluição em HNO_3 (1 mol L^{-1}) (EMBRAPA, 1997). O acúmulo dos nutrientes na planta foi calculado pela multiplicação do teor de cada nutriente pela MS da parte aérea. Posteriormente, calculou-se a porcentagem relativa do Cu acumulado em cada órgão da planta, adotando como referência (valor igual a 100%) o total do nutriente acumulado na planta inteira.

2.7 Trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas no 75º dia de cultivo com um analisador portátil de CO_2 por infravermelho (IRGA), LI-6200 (LICOR, USA), sendo a área da câmara de 6 cm^2 , volume de 250 mL e concentração de CO_2 do ar de 380 ppm. Foram avaliadas as taxas de assimilação de CO_2 , condutância estomática e de transpiração. As avaliações foram realizadas na décima semana de cultivo, entre 9 e 11 horas da manhã, com luminosidade controlada de 1000 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

¹. Para essa avaliação, foi utilizada como folha padrão a quinta de cada planta, contada da base ao ápice.

2.8 Análises de pigmentos fotossintéticos e açúcares

A determinação do conteúdo de clorofilas e carotenoides nas folhas foi realizada pela extração com dimetilsulfóxido (DMSO) em banho-maria a 65°C por duas horas, sem maceração e com determinação por meio de espectrofotometria (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). Os cálculos para a determinação da concentração das clorofilas *a*, *b* e total e de carotenoides foram realizados utilizando as fórmulas de WELLBURN (1994).

A quantificação dos carboidratos solúveis totais foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, utilizando 0,5g de MF triturada em nitrogênio líquido até obtenção de um pó homogêneo e tendo como padrão a glucose (DUBOIS *et al.*, 1956). Para a determinação do teor de amido total nas folhas, o precipitado resultante da extração dos carboidratos solúveis totais foi submetido à solubilização do amido com ácido perclórico (MCCREADY *et al.*, 1950) e quantificado pelo método fenol-sulfúrico, utilizando glucose como padrão (DUBOIS *et al.*, 1956).

2.9 Análises estatísticas

Os dados de colonização micorrízica e de porcentagem relativa do Cu acumulado foram transformados em arco seno da raiz quadrada da porcentagem para a homogeneização da variância. Em seguida, todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de Cochran para verificar a homocedasticidade. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e, quando houve significância, aplicou-se o teste de separação de médias de Tukey ($p < 0,05$). Além disso, foi realizada análise de correlação linear entre as variáveis obtidas, apresentadas em alguns momentos no texto da discussão quando foram significativas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior colonização nas raízes das videiras inoculadas foi observada para a espécie *R. clarus* (40% das raízes colonizadas), seguido pelas plantas inoculadas com *D. heterogama* e *A. morrowiae* (ambas com 25% das raízes colonizadas). A testemunha não apresentou

contaminação, sendo que as raízes das plantas não foram colonizadas por FMA (Figura 2).

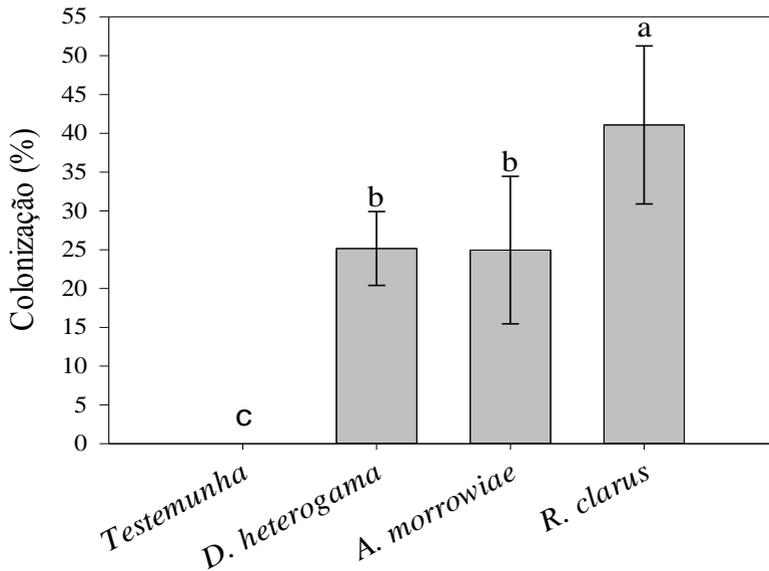


Figura 2 – Porcentagem de colonização micorrízica de videiras jovens do porta-enxerto ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*), com e sem inoculação com FMA, em solo com alto teor de Cu.

A associação micorrízica pode ser estimulada pela carência de P disponível à planta (HIPPLER; MOREIRA, 2013). No entanto, o teor de P disponível no solo do presente experimento foi de 34,8 mg kg⁻¹, o que é considerado elevado para solos com menos de 20% de argila (CQFS-RS/SC, 2004). Em estudo de colonização micorrízica em raízes de plantas jovens de videira P1103 em substrato sem contaminação por metais e baixo teor de P, ZEMKE *et al.* (2003) obtiveram colonização de 25% nas raízes, assim como os resultados de colonização por *D. heterogama* e *A. morrowiae* e inferior à colonização por *R. clarus* no presente experimento.

SCHREINER (2007), em um estudo com videira, observou 67,4 e 42,8% de colonização micorrízica em raízes de videiras cultivadas em solo com baixo e alto teor de P, respectivamente. Mas, em outro estudo, o mesmo autor verificou que o elevado teor de P não prejudicou a

colonização das raízes por FMA. Portanto, é possível que os resultados de colonização micorrízica nas raízes de videiras jovens no presente experimento fossem mais elevados, caso o teor de P fosse baixo. No entanto, assim como nos resultados de SCHREINER, (2007), as porcentagens da colonização micorrízica das videiras jovens deste experimento podem ser consideradas satisfatórias.

As videiras jovens inoculadas com *R. clarus* aumentaram a produção de MS das folhas e do caule, sendo que as plantas inoculadas com *D. heterogama* e *A. morrowiae* não diferiram do tratamento sem inoculação (Figura 3a e 3b). Para a MS de raízes (Figura 3c), não observou-se influência dos tratamentos.

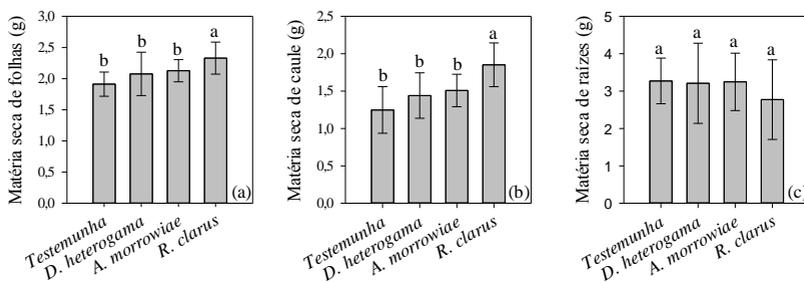


Figura 3 – Matéria seca de folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

A inoculação das videiras jovens contribuiu para aumentar o crescimento das plantas. A altura das videiras jovens ao final do experimento foi superior quando inoculadas com *R. clarus* e *D. heterogama*, seguidos de *A. morrowiae*, e a menor altura foi registrada para as plantas sem inoculação (Figura 4). Esses resultados são reforçados pela alta correlação linear entre a altura das plantas e a porcentagem de colonização micorrízica ($r = 0,98^{**}$).

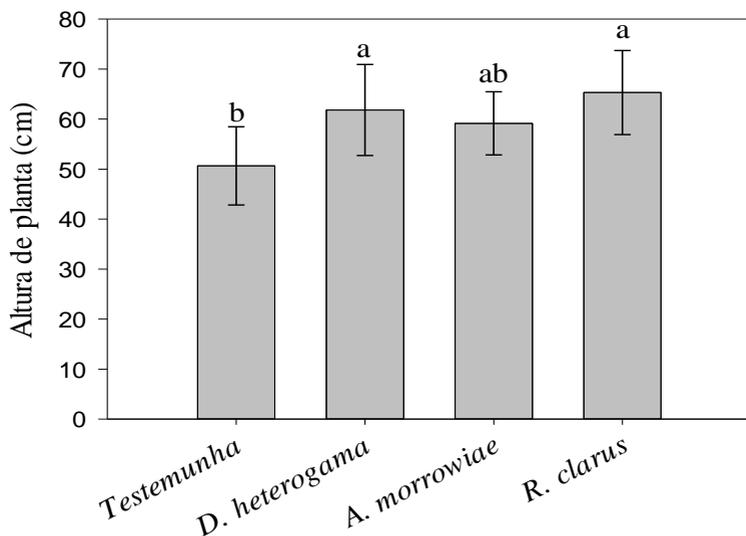


Figura 4 – Altura de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

A maior produção de MS nas folhas e caule para as videiras inoculadas pelo *R. clarus*, assim como a maior altura de planta quando inoculadas com *R. clarus* e *D. heterogama*, pode ser consequência da capacidade simbiótica da espécie de FMA em amenizar o estresse causado pelo elevado teor de Cu, reduzindo significativamente os danos exercidos pelo metal no metabolismo da planta (SABA *et al.*, 2013). Além disso, esses fungos provavelmente aumentaram a absorção de água e outros nutrientes, especialmente o ‘P’, contribuindo para uma melhor nutrição da planta (GUPTA *et al.*, 2014). A produção de MS observada neste estudo corrobora com os resultados obtidos por AMBROSINI *et al.* (2015) em estudo com a inoculação de videiras jovens inoculadas com seis espécies de FMA.

Importante enfatizar que os resultados obtidos por PIGNA *et al.* (2012), cujos autores verificaram o benefício da inoculação micorrízica para plantas de escarola (*Cichorium endivia* cv. Natacha) cultivadas em solo contaminado com arsênio (As). Eles também observaram que o tratamento com FMA simultaneamente com a adubação fosfatada foi ainda mais eficiente em relação aos tratamentos somente com FMA e somente com aplicação de P, isoladamente. Portanto, é possível que o alto

teor de P no solo do presente experimento não tenha inibido a colonização micorrízica nas raízes das videiras jovens. Mas, caso isso tenha acontecido, ainda é possível que o alto teor de P no solo, somado à colonização micorrízica, tenha beneficiado as plantas cultivadas em solo com alto teor de Cu.

A inoculação das videiras jovens com as três espécies de FMA não resultaram em diferença no número de folhas, diâmetro do colmo e área foliar (Tabela 1). Possivelmente, o Cu transportado para o caule e folhas das videiras não foi elevado a ponto de causar danos graves no metabolismo e inibir o desenvolvimento do caule e a formação de folhas (KABATA-PENDIAS, 2011).

Tabela 1 – Número de folhas, diâmetro do colmo, área foliar, amido total, clorofila *a*, *b* e total, carotenoides nas plantas de porta-enxerto de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cobre e inoculação com FMA.

Variável	FMA			
	Sem inóculo	D. <i>heterogama</i>	A. <i>morrowiae</i>	R. <i>Clarus</i>
Número de folhas	14 ^{ns}	15	14	14
Diâmetro do colmo (mm)	0,32 ^{ns}	0,34	0,32	0,36
Área foliar (cm ²)	379,77 ^{ns}	403,84	383,79	380,72
Amido total (mg g ⁻¹ MF)	1,12 ^{ns}	1,06	1,05	1,11

^{ns} = não significativo pelo teste de Tukey (p<0,05).

O maior teor de P total nas raízes, caule e folhas foi observado nas videiras inoculadas por *R. clarus* (Figura 5), que aumentou o teor de P em 56, 84 e 43%, respectivamente, nesses órgãos, em relação às plantas sem inoculação. O acúmulo de P nas raízes, caule e folhas foi 90, 115 e 50% maiores, respectivamente, nas plantas inoculadas com *R. clarus* (Figura 6). As plantas inoculadas com *D. heterogama* e *A. morrowiae* não diferenciaram daquelas sem inoculação para o teor de P total e para o acúmulo de P nas raízes, caule e folhas (Figuras 5 e 6). É importante observar o maior incremento de P e de colonização micorrízica nas plantas inoculadas com *R. clarus* corrobora com os resultados obtidos por Ambrosini et al. (2015) em estudo com videiras jovens ‘P1103’.

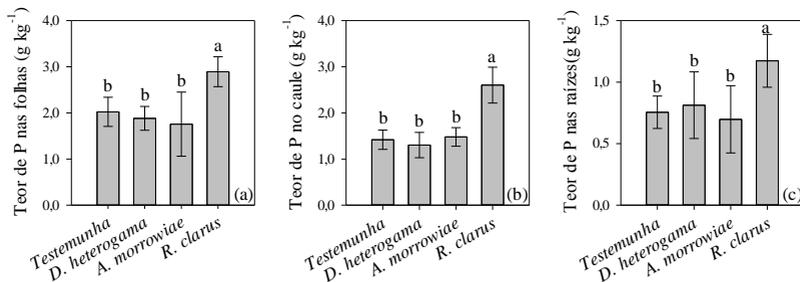


Figura 5 – Teor de P nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

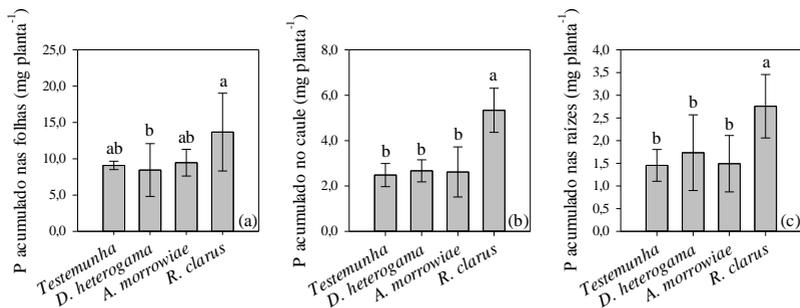


Figura 6 – Acúmulo de P nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videira ‘P1103’ cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

É possível observar que o P, quando absorvido em maior quantidade pelas raízes, também foi encontrado em maior concentração no caule e nas folhas, o que é confirmado na análise de correlação linear positiva entre o teor de P nas raízes e nas folhas ($R=0,98^{**}$), evidenciando o transporte deste nutriente para a parte aérea das plantas. Isso é importante porque o P, na forma de fosfato, é componente de compostos como os açúcares fosfatados, incluindo glicose e frutose, fosfolipídios de membranas, adenosina trifosfato (ATP) e ácidos nucleicos (MARSCHNER, 2012).

O aumento do teor de P total e de P acumulado em todos os órgãos das videiras jovens inoculadas com *R. clarus* pode estar associado à maior colonização micorrízica nas raízes das plantas por essa espécie. A associação micorrízica promove a melhoria do estado nutricional de P das

plantas, o que é importante e favoreceu o crescimento em solos contaminados por metais (SOARES; SIQUEIRA 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; PIGNA *et al.*, 2012).

O teor de Cu nas folhas (Figura 7a) e nas raízes (Figura 7c) apresentou efeito da inoculação das videiras com os FMA, enquanto no caule, não houve efeito dos tratamentos (Figura 7b). As plantas inoculadas com o *R. clarus* apresentaram o menor teor de Cu nas folhas e raízes, que correspondeu a diminuição de 36,7% e 60,6%, respectivamente, em comparação as plantas sem inoculação. As videiras inoculadas com *D. heterogama* e *A. morrowiae* também reduziram os teores de Cu nas folhas (18,4 e 15,0%, respectivamente) e nas raízes (5,8 e 36,0%, respectivamente) em comparação as plantas sem inoculação. No entanto, essa redução não foi suficiente para separá-las estatisticamente das plantas sem inoculação e daquelas inoculadas como *R. clarus*.

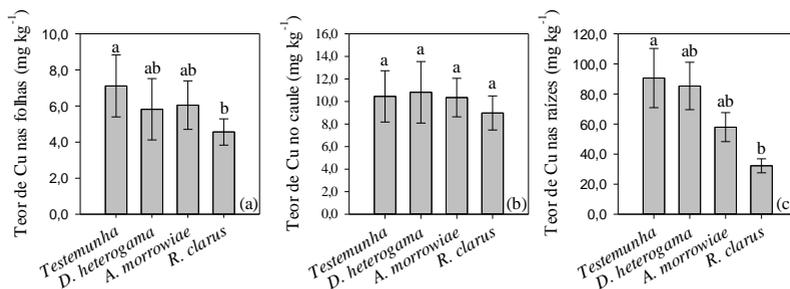


Figura 7 – Teor de Cu nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

O Cu acumulado nas folhas (Figura 8a) e no caule (Figura 8b) não sofreu efeito dos FMA, mas o Cu acumulado nas raízes foi reduzido em 57% pela inoculação de *R. clarus*, se comparado as plantas sem inoculação (Figura 8c).

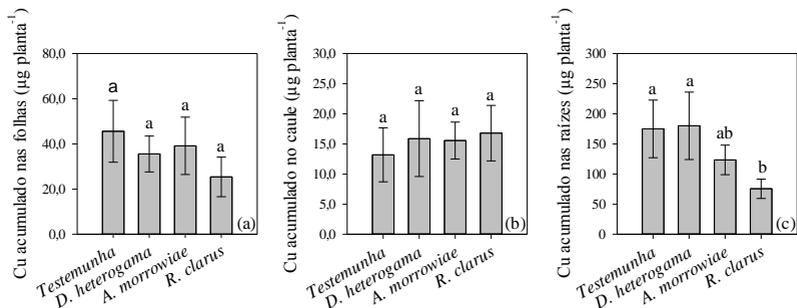


Figura 8 – Acúmulo de Cu nas folhas (a), caule (b) e raízes (c) de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

A redução do teor de Cu nas raízes, no caule e nas folhas e do acúmulo de Cu nas raízes das videiras inoculadas com *R. clarus* indica a redução na absorção do metal pelas plantas associadas à essa espécie de FMA. Isso pode ser o resultado de estratégias utilizadas pelos FMA para sobreviver solo com alto teor de Cu e que, conseqüentemente, proporcionam a redução na absorção do metal pelas plantas, como: a produção e liberação de glomalina no solo, que pode diminuir a disponibilidade de Cu no solo por causa da sua alta reatividade (FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012); e a retenção do metal no micélio fúngico ou em alguns esporos, que pode reduzir a sua absorção (CORNEJO *et al.*, 2013).

A distribuição de Cu no interior da planta não foi influenciada pelos FMA (Figura 9). No entanto, era esperado que a inoculação com FMA proporcionasse a porcentagem relativa do Cu nas folhas, aumentando nas raízes. Isso porque o incremento de P no interior da planta reduz o transporte de metais das raízes para a parte aérea, amenizando a toxidez de metais, como relatado por SOARES & SIQUEIRA (2008) em plantas de braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.) submetidas a elevados teores de Cu, zinco (Zn) e cádmio (Cd), essas observações também foram descritas por PIGNA *et al.* (2012) em plantas de escarola submetidas a altos teores de As.

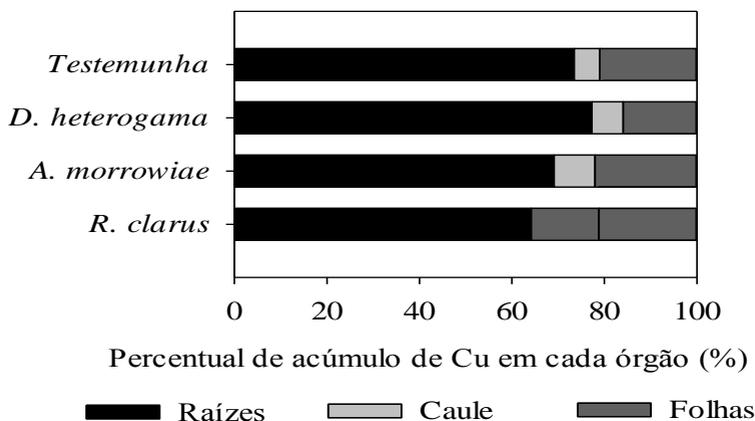


Figura 9 – Percentual de acúmulo de Cu nas raízes, caule e folhas de videira ‘P1103’ cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

Como não houve diferença na distribuição de Cu nos órgãos das videiras jovens, calculou-se, usando a média de todos os tratamentos, a relação entre o teor e o acúmulo de Cu nas raízes e nas folhas. Para o teor, essa relação foi de 11,3, e para o acúmulo, essa relação foi de 3,7. Isso indica que as videiras jovens reduziram a passagem do Cu das raízes para as folhas, o que ocorre porque a planta possui estratégias como a compartimentalização do metal nos vacúolos, a quelatação na interface da membrana plasmática e a complexação intracelular por substâncias orgânicas, que são eficientes para diminuir o transporte para as folhas, onde causariam danos mais graves no metabolismo (SABA *et al.*, 2013; YRUELA, 2009). Com isso, o teor do metal nas folhas esteve dentro da faixa considerada normal para a maioria das plantas, que é entre 5 e 30 mg kg⁻¹ segundo KABATA-PENDIAS, (2011), mesmo naquelas sem inoculação micorrízica (Figura 7).

A taxa de assimilação de CO₂ (Figura 10a) foi maior nas videiras jovens inoculadas por *D. heterogama* que também obteve o maior resultado para a condutância estomática (Figura 10b) e a transpiração (Figura 10c). Para a taxa de assimilação de CO₂ observa-se que as plantas inoculadas por *A. morrowiae* e *R. clarus* não diferiram das plantas sem inoculação. Já para a condutância estomática e a transpiração o menor resultado foi encontrado nas plantas sem inoculação.

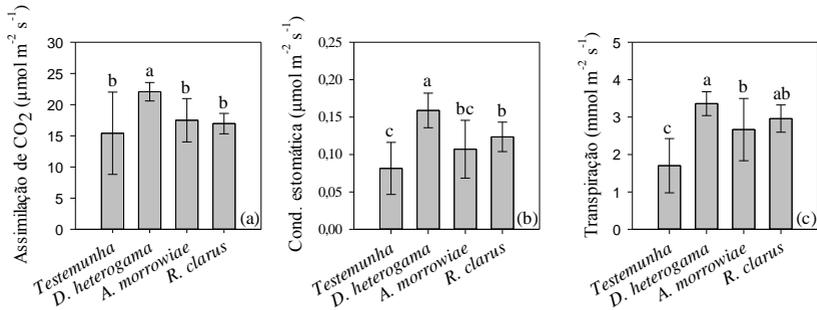


Figura 10 – Taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática e transpiração de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri* x *rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

A maior taxa de assimilação de CO₂ (Figura 10a), condutância estomática (Figura 10b) e a maior transpiração (Figura 10c) encontrada nas videiras jovens inoculadas com *D. heterogama* pode ser resultado da maior nutrição por água e minerais proporcionada por essa espécie fungica. Isso se fundamenta na simbiose obrigatória que, exige da planta a transferência de glicose e frutose às hifas, sendo que o custo total em hidratos de carbono pode chegar a 20% da produção da fotossíntese (ADOLFSSON *et al.*, 2015; BOLDT *et al.*, 2011). Isso faz com que a planta aumente a assimilação de CO₂ para compensar a demanda de hidratos de carbono como estratégia de garantir a continuidade da simbiose e se beneficiar da melhor nutrição proporcionada pelo FMA (ADOLFSSON *et al.*, 2015).

A inoculação das plantas com FMA também pode melhorar a eficiência do aparelho fotossintético. Em estudo com tomates, BOLDT *et al.*, (2011), verificaram que a fluorescência da clorofila e o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) das plantas foi significativamente aumentado com a inoculação por algumas espécies de FMA. Isso aumentou a capacidade das plantas em usar a energia de forma mais eficiente com maior taxa de transporte de elétrons (BOLDT *et al.*, 2011).

O teor de carboidratos solúveis totais nas folhas das videiras jovens apresentou a maior concentração nas plantas inoculadas com *D. heterogama* (Figura 11). Isso provavelmente está relacionado à maior assimilação de CO₂ nessas plantas (Figura 10) que resulta em mais energia das reações fotoquímicas e aumento a atividade do ciclo de Calvin resultando em maiores quantidades de hidratos de carbono na folha,

principalmente sacarose e amido (BOLDT *et al.*, 2011). As videiras inoculadas com *A. morrowiae* e *R. clarus* apresentaram concentrações menores mas não diferenciaram de *D. heterogama*. As videiras sem inoculação apresentaram a menor concentração de carboidratos solúveis totais.

O teor de amido total nas folhas das plantas jovens de videira P1103 não foi influenciado pela inoculação dos isolados de FMA (Tabela 2). Isso pode ter acontecido em função do tempo de cultivo ser insuficiente para a planta acumular amido, já que as videiras jovens estavam em pleno crescimento e provavelmente estavam utilizando a energia para a formação de folhas e incremento em biomassa para o estabelecimento da planta.

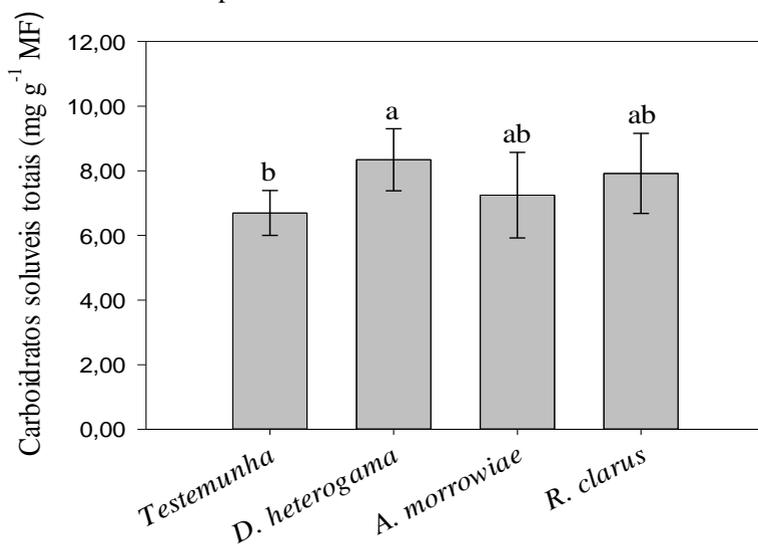


Figura 11 – Carboidratos solúveis totais de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri* x *rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação de FMA.

Tabela 2 – Amido total, clorofila *a*, *b* e total, carotenoides nas plantas de porta-enxerto de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cu e inoculação com FMA.

Variável	FMA			
	Sem inóculo	<i>D. heterogama</i>	<i>A. morrowiae</i>	<i>R. Clarus</i>
Amido total (mg g ⁻¹ MF)	1,12 ^{ns}	1,06	1,05	1,11
Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ MF)	2,23 ^{ns}	2,18	2,20	2,16
Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹ MF)	0,81 ^{ns}	0,85	0,87	0,83
Clorofila total (mg g ⁻¹ MF)	3,04 ^{ns}	3,04	3,08	3,00
Carotenoides (mg g ⁻¹ MF)	0,43 ^{ns}	0,39	0,40	0,39

^{ns} = não significativo pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os teores de clorofila *a*, *b* e total e de carotenoides não foram influenciados pelos tratamentos (Tabela 2). Quando em altos teores para a planta, o Cu, pode diminuir os teores dos pigmentos fotossintetizantes nas folhas das plantas por causar deficiência de ferro (Fe). Além disso, o excesso de Cu absorvido e transportado para a parte aérea pode causar a substituição do Mg pelo metal na molécula de clorofila, inibindo a fotossíntese (YRUELA, 2009). Pela ausência de resposta dos tratamentos, supõem-se que, mesmo nas plantas sem inoculação micorrízica, o Cu absorvido e transportado até as folhas não tenha sido tóxico a ponto de modificar a síntese de moléculas de clorofila.

A clorofila *a* foi mais abundante que a clorofila *b* em todas as plantas, mantendo uma relação clorofilas *a/b* média de 2,6, estando de acordo com os valores e proporções encontradas por (AMARANTE *et al.*, 2009) que trabalharam com plantas jovens de ‘Cabernet Sauvignon’ cultivadas sem contaminação de solo e sem inoculação por FMA.

É importante observar que os FMA não alteraram a distribuição do Cu na planta e também não reduziram o acúmulo do metal nas folhas. Porém, a espécie *R. clarus* proporcionou vários outros benefícios às videiras jovens, como o incremento de P no interior da planta, que se refletiu em promoção do crescimento e da biomassa das plantas. O maior crescimento das plantas, por sua vez, se refletiu na redução do teor de Cu nas folhas, como um efeito de diluição dentro do órgão, o que pode ser comprovado pelos altos índices de correlação entre o teor de Cu na folha e colonização micorrízica ($r = -0,96^{**}$), altura da planta ($r = -0,95^{**}$) e MS de folha ($r = -0,97^{**}$) e de caule ($r = -0,99^{**}$).

4 CONCLUSÃO

A inoculação das videiras jovens com FMA contribui para o estabelecimento da planta em solo com alto teor de Cu. Os benefícios proporcionados às plantas pela associação simbiótica variaram entre as espécies de FMA e as variáveis analisadas, no entanto nenhuma das espécies testadas prejudicou as plantas. Dentre os FMAs testados, o *R. clarus* demonstrou melhores resultados na simbiose com o porta-enxerto de videira 'P1103' cultivado em solo com elevado teor de Cu.

REFERÊNCIAS

ADOLFSSON, L.; SOLYMOSI, K.; ANDERSSON, M. X.; KERESZTES, Á. Mycorrhiza Symbiosis Increases the Surface for Sunlight Capture in *Medicago truncatula* for Better Photosynthetic Production. **PLOS ONE**, p. 1–18, 2015.

ALAOUI-SOSSÉ, B.; GENET, P.; VINIT-DUNAND, F.; et al. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. **Plant Science**, v. 166, n. 5, p. 1213–1218, 2004.

AMARANTE, C.; ZANARDI, O.; MIQUELOTO, A.; et al. Quantificação da área e do teor de clorofilas em folhas de plantas jovens de videira 'Cabernet Sauvignon' mediante métodos não destrutivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 680–686, 2009.

AMBROSINI, V. G.; GERENT, V. J.; LUDIANA, C.; et al. Arbuscular mycorrhizal fungi on young vines in copper contaminated soil, 2015.

ANDRADE, S. A L.; SILVEIRA, A. P. D.; MAZZAFERA, P. Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 22, p. 5381–5391, 2010. Elsevier B.V.

BEDINI, S.; TURRINI, A.; RIGO, C.; ARGESE, E.; GIOVANNETTI, M. Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island,

downtown Venice. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 758–765, 2010. Elsevier Ltd.

BOLDT, K.; PÖRS, Y.; HAUPT, B.; et al. Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1256–1263, 2011. Elsevier GmbH.

BORGHEZAN, M.; GAVIOLI, O.; PIT, F. A.; SILVA, A. L. DA. Modelos matemáticos para a estimativa da área foliar de variedades de videira à campo (*Vitis vinifera* L.). **Ciência e técnica vitivinícola**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2010.

CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; et al. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 925–928, 2013. Elsevier Ltd.

CQFS-RS/SC. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10th ed. Porto Alegre, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, p. 212, 1997.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3a Edição ed. Brasília, 2013.

FERROL, N.; PÉREZ-TIENDA, J. Coordinated nutrient exchange in arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhizas-Functional Processes and ecological impact**, p. 73–87, 2009.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New phytologist**, 1980.

GIROTTO, E.; CERETTA, C. A.; ROSSATO, L. V; et al. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 145–155, 2013.

GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; DATTA, S.; VEER, V.; WALTHER, C. Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. **Chemosphere**, 2014.

HIPPLER, F. W. R.; MOREIRA, M. Dependência micorrízica do amendoinzeiro sob doses de fósforo. **Bragantia**, v. 72, p. 184–191, 2013.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, v. 57, n. 12, p. 1332–1334, 1979.

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. 2011.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Jun. 1989.

MARSCHNER, P. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2012.

MCCREADY, R.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. . Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. V. 22, p. 1156–1158, 1950.

MEIER, S.; BORIE, F.; CURAQUEO, G.; BOLAN, N.; CORNEJO, P. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 280–287, 2012.

NACHTIGALL, G. R.; CORRÊA, R.; REYNALDO, L.; ALLEONI, F. Formas de cobre em solos de vinhedos em função do pH e da adição de cama-de-frango. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, p. 427–434, 2007.

SABA, H.; JYOTI, P.; NEHA, S. Mycorrhizae and Phytochelators as Remedy in Heavy Metal Contaminated Land Remediation. **International Research Journal of Environment Sciences**, v. 2, n. 1, p. 74–78, 2013.

SCHREINER, R. P. Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of “Pinot noir” (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. **Applied Soil Ecology**, v. 36, p. 205–215, 2007.

SILVA, A.; DOAZAN, J. Une méthode d’irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne in vitro. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 29, p. 1–9, 1995.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 6, p. 833–841, 2008.

SÔNEGO, O.; GARRIDO, L.; JÚNIOR, A. G. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil, 2005.

TEDESCO, M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. Análises de solo, plantas e outros materiais. **UFRGS**, p. 174, 1995.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

YRUELA, I. Copper in plants : acquisition, transport and interactions, p. 409–430, 2009.

ZEMKE, J. M.; PEREIRA, F.; LOVATO, P. E.; DA SILVA, A. L. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de videira micropropagados. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 1309–1315, 2003.

ANEXOS

Anexo 1: Valores de F e coeficientes de variação das variáveis analisadas em plantas de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivadas em solo com alto teor de Cobre e inoculação com FMA.

Variável	F	CV(%)
Colonização micorrízica (%)	42,95**	29,62
MS Folhas (g)	7,04**	13,96
MS Caule (g)	12,46**	18,93
MS Raízes (g)	1,23 ^{ns}	26,27
Altura de planta (cm)	6,21**	11,20
Número de folhas	0,14 ^{ns}	12,96
Diâmetro do colmo (mm)	1,18 ^{ns}	13,67
Área foliar (cm ²)	0,29 ^{ns}	14,40
Teor de P nas raízes (g kg ⁻¹ MS)	7,05**	24,82
Teor de P no caule (g kg ⁻¹ MS)	9,24**	20,95
Teor de P nas folhas (g kg ⁻¹ MS)	8,40**	32,49
Acúmulo de P nas raízes (mg planta ⁻¹)	7,39**	31,97
Acúmulo de P no caule (mg planta ⁻¹)	24,06**	22,63
Acúmulo de P nas folhas (mg planta ⁻¹)	3,94*	31,11
Teor de Cu nas raízes (mg kg ⁻¹ MS)	23,72**	22,02
Teor de Cu no caule (mg kg ⁻¹ MS)	0,93 ^{ns}	21,72
Teor de Cu nas folhas (mg kg ⁻¹ MS)	3,34*	25,76
Acúmulo de Cu nas raízes (µg planta ⁻¹)	9,50**	30,44
Acúmulo de Cu no caule (µg planta ⁻¹)	0,64 ^{ns}	33,10
Acúmulo de Cu nas folhas (µg planta ⁻¹)	2,81 ^{ns}	30,86
Percentual de acúmulo de Cu na raiz (%)	1,30 ^{ns}	13,50
Percentual de acúmulo de Cu no caule (%)	2,40 ^{ns}	15,46
Percentual de acúmulo de Cu na folha (%)	2,62 ^{ns}	8,67
Assimilação de Co ₂ (µmol m ² s ⁻¹)	7,34**	20,91
Condutância estomática (µmol m ² s ⁻¹)	14,45**	22,39
Transpiração (mmol m ² s ⁻¹)	22,29**	18,88
Carboidratos solúveis totais (mg g ⁻¹ MF)	4,30*	14,54
Amido total (mg g ⁻¹ MF)	0,46 ^{ns}	15,90
Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ MF)	0,14 ^{ns}	10,05
Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹ MF)	0,67 ^{ns}	12,63
Clorofila total (mg g ⁻¹ MF)	0,12 ^{ns}	9,75
Carotenoides (mg g ⁻¹ MF)	1,39 ^{ns}	12,03

* = Significativo pelo teste F (p<0,05); ** = Significativo pelo teste F (p<0,01); ns = não significativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O cultivo de videiras jovens ‘Niágara Branca’ (*Vitis labrusca*) no Argissolo Vermelho com adição de 50 mg kg⁻¹ de Cu provocou efeitos danosos à fisiologia das plantas, resultando em menor crescimento e redução dos teores de nutrientes nas folhas, que conseqüentemente pode retardar o estabelecimento das plantas no vinhedo.

A calagem é eficaz para amenizar os efeitos de toxidez causados pelo elevado teor de Cu às videiras jovens, chegando a neutralizar o efeito tóxico com a aplicação de 3,0 Mg ha⁻¹.

A inoculação de FMA no porta-enxerto de videira ‘P1103’ (*Vitis berlandieri x rupestris*) cultivado em Argissolo Vermelho com alto teor de Cu amenizou os efeitos da toxidez causada pelo metal e contribuiu para o melhor estabelecimento das plantas.

O benefício proporcionado às plantas pelas associações simbióticas variou entre as espécies de FMA e as variáveis analisadas, no entanto nenhuma das espécies testadas prejudicou as plantas.

Dentre os FMAs testados, o *R. clarus* mostrou maior eficácia na colonização e simbiose com o porta-enxerto de videira ‘P1103’. A inoculação com *D. heterogama* proporcionou melhor eficiência fotossintética e disponibilidade de água as videiras jovens.

Diante do exposto, é importante ainda que seja estudado o efeito da calagem em solo com alto teor de Cu com plantas cultivadas a campo.

Para melhor responder questões ligadas ao estresse causado pelo alto teor de Cu nas videiras são necessários estudos envolvendo a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes.

A inoculação do porta-enxerto de videira ‘P1103’ com FMA precisa ser melhor estudada nos vinhedos em campo onde haverá interação do fungo com o restante da microbiota do solo. Ainda, e não menos importante, que a videira ‘P1103’ seja avaliada quanto ao desempenho da simbiose utilizando a planta como porta-enxerto de variedades copas.