



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS- CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

Letícia Morsch

Impactos do Cu, Zn e Mn sobre a vegetação preservada na entrelinha de vinhedos do bioma
Pampa e o potencial de fitorremediação das espécies nativas

Florianópolis

2023

Letícia Morsch

Impactos do Cu, Zn e Mn sobre a vegetação preservada na entrelinha de vinhedos do bioma Pampa e o potencial de fitorremediação das espécies nativas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Agroecossistemas.

Orientador: Prof. Gustavo Brunetto, Dr.
Coorientador: Prof. Clédimar Rogério Lourenzi, Dr.

Florianópolis

2023

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

Morsch, Leticia

Impactos do Cu, Zn e Mn sobre a vegetação preservada na
entrelinha de vinhedos do bioma Pampa e o potencial de
fitorremediação das espécies nativas / Leticia Morsch ;
orientador, Gustavo Brunetto, coorientador, Cledimar
Rogério Lourenzi, 2023.

111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Preservação da biodiversidade.
3. Metais pesados. 4. Estratégias de adaptação. I.
Brunetto, Gustavo. II. Lourenzi, Cledimar Rogério . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.

Letícia Morsch

Impactos do Cu, Zn e Mn sobre a vegetação preservada na entrelinha de vinhedos do bioma
Pampa e o potencial de fitorremediação das espécies nativas

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 3 de maio de 2023, pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Anderson Cesar Ramos Marques, Dr.
Universidade Federal de Santa Maria- UFSM

Prof. Jucinei José Comin, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado
para obtenção do título de Mestra em Agroecossistemas.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Oscar José Rover, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Gustavo Brunetto, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Flávio Morsch e Liane Morsch, maiores exemplos de honestidade, companherismo, incentivadores, fontes de apoio e amor incondicional e, ao meu noivo Matheus por toda paciência, compreensão e ajuda durante a realização do curso.

Dedico a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste curso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meu caminho, dar força e sabedoria para concluir essa jornada.

Às minhas irmãs Fernanda Morsch e Patrícia Morsch, pela amizade e companheirismo.

Ao meu sobrinho Inácio Morsch Puntel, pela alegria e amor que trouxe a nossa família.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, pela oportunidade de realização deste curso.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela estrutura e por permitir a utilização dos espaços físicos para a realização dos estudos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Brunetto, pela orientação, pelo apoio, sábios conselhos e palavras de motivação.

Ao Prof. Dr. Cledimar Rogério Lourenzi coorientador, pelas contribuições neste trabalho.

Aos professores Luciane Tabaldi e Anderson César Ramos Marques pelos conselhos, colaboração e por permitir a utilização da estrutura do laboratório de Fisiologia Vegetal para a realização de análises.

Aos membros da Banca, pela revisão e pelos conhecimentos compartilhados no intuito de melhorar este trabalho.

Aos demais professores da UFSC e UFSM, minha gratidão a todos que estão contribuindo na minha formação profissional.

Ao Grupo Miolo, Vinícola Almadén pela estrutura e por permitir realização do levantamento botânico e coleta de solo e tecido para a realização dos estudos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado.

Ao CNPq (processo número 408318/2018-0; 302023/2019-4) e FAPERGS (processo número 17/2551-0000925-8) pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

Aos bolsistas de Iniciação Científica e amigos Filipe Nunes de Oliveira e Talita Andreolli pelo auxílio na condução do experimento, coleta de materiais, análises laboratoriais, organização dos dados, parceria e convívio.

Aos demais colegas do grupo de pesquisa GEPACES, por toda a ajuda, aprendizado, amizade e troca de experiências.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste curso.

Muito obrigada!

RESUMO

O bioma Pampa possui uma grande diversidade de vegetação campestre. No entanto, por causa da conversão dos campos nativos para monocultivos, essa biodiversidade está sendo ameaçada. Dessa forma, estratégias de uso com menor impacto ambiental são necessárias. Dentre as alternativas está a vitivinicultura, pois é possível conservar a vegetação nativa no interior de vinhedos. Porém, metais pesados como Cu, Zn e Mn podem acumular no solo de vinhedos devido aos tratamentos fitossanitários. Altas concentrações desses metais podem causar toxidez às plantas. Mas, espécies nativas podem possuir mecanismos de tolerância, não suficientemente conhecidos. Assim, o estudo objetivou verificar os impactos do aumento dos teores de Cu, Zn e Mn em solos de vinhedos sobre a vegetação nativa do bioma Pampa preservada na entrelinha, os mecanismos de tolerância utilizados por espécies nativas do bioma Pampa em resposta ao excesso dos metais e indicar quais potencialmente podem ser usadas para fitorremediação. Para isso, dois Estudos foram realizados. O Estudo I foi realizado em condições de campo e o Estudo II foi realizado em condições controladas. No Estudo I em duas estações, verão e inverno, foi realizado um levantamento da composição botânica, os teores de Cu, Zn, Mn disponíveis no solo e dos parâmetros nutricionais nas espécies que cresceram na entrelinha de vinhedos com mais de 40 anos de cultivo e no campo nativo. No estudo II foram determinados parâmetros de crescimento, nutricionais, estresse oxidativo, concentração de pigmentos fotossintéticos, atividade de enzimas antioxidantes e distribuição subcelular do Cu, Zn e Mn em três espécies nativas do bioma Pampa, sendo elas *Axonopus compressus*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum* cultivadas em solo de vinhedo e em solo de campo nativo. Os maiores teores de Cu, Zn e Mn no solo de vinhedos aumentaram a contribuição de biomassa de espécies exóticas, diminuíram a riqueza e diversidade das espécies nos vinhedos. Além disso, o aumento nos teores e interação entre o Cu, Zn e Mn diminuíram a concentração de clorofila, causaram estresse oxidativo e desbalanços nutricionais que refletiram em menor produção de biomassa. As plantas cultivadas com altos teores de Cu, Zn e Mn expressaram mecanismos de tolerância, que consistiram em acumular os metais no caule e/ou raízes, compartimentalizar o excesso dos metais na parede celular e vacúolo e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e POD sobre estresse oxidativo. *P. plicatulum* e *P. notatum* foram as mais indicadas para a fitoestabilização de Cu, Zn e Mn em áreas de vinhedos com altos teores desses metais no bioma Pampa.

Palavras-chave: Fungicidas; metais pesados; toxicidade; biodiversidade; mecanismos de adaptação.

ABSTRACT

The Pampa biome has a great diversity of grassland vegetation. However, because of the conversion of native grasslands to monocultures, this biodiversity is being threatened. Thus, use strategies with less environmental impact are needed. Among the alternatives is viticulture, as it is possible to conserve native vegetation within vineyards. However, heavy metals such as Cu, Zn and Mn can accumulate in the soil of vineyards due to phytosanitary treatments. High concentrations of these metals can cause plant toxicity. However, native species may have tolerance mechanisms, which are not sufficiently known. Thus, the study aimed to verify the impacts of the increase in Cu, Zn and Mn levels in vineyard soils on the native vegetation of the Pampa biome preserved between the rows, the tolerance mechanisms used by native species of the Pampa biome in response to the excess of metals and indicate which ones can potentially be used for phytoremediation. For this, two studies were carried out. Study I was conducted under field conditions and Study II was conducted under controlled conditions. In Study I in two seasons, summer and winter, a survey of the botanical composition, the levels of Cu, Zn, Mn available in the soil and the nutritional parameters in the species growing in the inter-row of vineyards with more than 40 years of cultivation and in the native field was carried out. In study II, growth, nutritional parameters, oxidative stress, photosynthetic pigment concentration, antioxidant enzyme activity and subcellular distribution of Cu, Zn and Mn were determined in three native species of the Pampa biome, namely *Axonopus compressus*, *Paspalum notatum* and *Paspalum plicatulum* grown in vineyard soil and in native field soil. Higher Cu, Zn and Mn contents in vineyard soil increased the biomass contribution of alien species, decreased species richness and diversity in vineyards. In addition, the increase in Cu, Zn and Mn contents and interaction decreased chlorophyll concentration, caused oxidative stress and nutritional imbalances that reflected in lower biomass production. Plants grown with high levels of Cu, Zn and Mn expressed tolerance mechanisms, which consisted of accumulating the metals in the stem and/or roots, compartmentalizing the excess metals in the cell wall and vacuole and increasing the activity of the antioxidant enzymes SOD and POD upon oxidative stress. *P. plicatulum* and *P. notatum* were the most suitable for phytostabilization of Cu, Zn and Mn in vineyard areas with high levels of these metals in the Pampa biome.

Keywords: Fungicides; heavy metals; toxicity; biodiversity; adaptation mechanisms.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 APRESENTAÇÃO.....	10
1.2 INTRODUÇÃO.....	11
1.3 OBJETIVOS.....	14
1.3.1 Objetivo geral.....	14
1.3.2 Objetivos específicos.....	14
2. DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1.1 Bioma Pampa e a vitivinicultura.....	15
2.1.2 Acúmulo e disponibilidade de Cu, Zn e Mn no solo.....	16
2.1.3 O Cu, Zn e Mn em plantas.....	17
2.1.4 Possíveis alterações na composição botânica em vinhedos e implicações.....	19
2.1.5 Mecanismos de tolerância utilizados pelas plantas em condições de estresse por...20	
2.1.6 Fitorremediação de metais pesados	21
2.2 ARTIGO 1	23
2.2.1 Introduction	23
2.2.2 Material and methods	26
2.2.3 Results.....	29
2.2.4 Discussion	34
2.2.5 Conclusions	39
Acknowledgments.....	40
References.....	40
Figures.....	47
Tables.....	52
Supplementary material	54
2.3 ARTIGO 2	57
2.3.1 Introdução	58
2.3.2 Material e Métodos.....	61
2.3.3 Resultados	66
2.3.4 Discussão	71
2.3.5 Conclusões	76
Referências	77

Figuras...	83
Tabelas...	88
Material suplementar	90
2.4 DISCUSSÃO GERAL.....	95
3. CONCLUSÕES.....	99
3.1 CONCLUSÕES.....	99
3.2 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS	99
REFERÊNCIAS	99
ANEXO A- PROTOCOLO DO FRACIONAMENTO SUBCELULAR DE METAIS PESADOS EM TECIDO VEGETAL.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

Estudos relacionados ao acúmulo de metais no solo já foram realizados por alunos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo - PPGCS, da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM e Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (PGA), da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. O primeiro estudo relacionado ao tema de integrantes do grupo de pesquisa atualmente denominado de GEPACES (Grupo de estudos de predição de adubação e potencial de contaminação de elementos em solos) foi a Tese de Doutorado de Girotto (2010), quando foi avaliado a biodisponibilidade de Cu em solos de vinhedos coletados na Serra e Campanha Gaúcha. Nesse estudo também foi avaliado o potencial de toxidez de Cu e Zn em plantas cultivadas em solos com histórico de aplicação de dejetos líquidos de suínos e de fungicidas a base de Cu. Posteriormente, Miotto (2012) em sua Tese de Doutorado, avaliou a disponibilidade de Cu nos solos arenosos da Campanha Gaúcha, bem como, o efeito do metal na fisiologia de plantas de videiras adultas. Ainda nesse estudo foi observado que além do aumento nos teores de Cu, os teores de Zn em vinhedos mais antigos também estavam aumentando.

Em sua Dissertação de Mestrado, Tiecher (2014) avaliou a toxidez em plantas de milho, causada pelo aumento nas concentrações de Zn em solos que já possuíam altos teores de Cu. Tiecher (2017), seguindo na mesma linha de pesquisa, em sua Tese de Doutorado, avaliou os efeitos da combinação de altas doses de Cu e Zn sobre plantas de videiras jovens e em aveia preta. De Conti (2018), em sua Tese de Doutorado, estudou as alterações sobre parâmetros de crescimento, estado nutricional e morfologia radicular em videiras jovens e em plantas de cobertura cultivadas com excesso de Cu; os mecanismos de tolerância utilizados por essas plantas e o potencial de fitorremediação de plantas de cobertura.

Com o objetivo de encontrar estratégias para minimizar a toxidez de Cu em plantas de videiras, Trentin (2020) em sua Tese de Doutorado avaliou a utilização de amenizantes e a seleção de genótipos de porta-enxertos de videiras tolerantes ao excesso de Cu. No desenvolvimento da Tese de Trentin (2020) foi observado que para diminuir a disponibilidade de metais, as plantas alteram a rizosfera, o que pode solubilizar compostos insolúveis de Mn e potencializar a toxidez de Cu e Zn. Morais (2020), em sua Tese de Doutorado, avaliou em diferentes teores de argila e matéria orgânica, os valores críticos de Cu e Zn na solução do solo e o acúmulo das frações desses elementos em solos arenosos e argilosos de vinhedos. Da Silva (2021), em sua Tese de Doutorado, avaliou a dinâmica da vegetação que coabita os vinhedos da Campanha Gaúcha, mecanismos de tolerância desenvolvidos pelas plantas sobre

elevados teores de Cu e o potencial de fitorremediação dessas espécies em áreas contaminadas com Cu. Dando sequência nessa linha de pesquisa, o presente estudo foi elaborado com o objetivo de continuar aprofundando conhecimentos sobre o tema, para isso, verificou-se em condições e teores reais o impacto de maiores teores e interação entre Cu, Zn e Mn em solos de vinhedos sobre a vegetação nativa do bioma Pampa preservada no interior dos vinhedos na Campanha Gaúcha, mas também, buscaram-se estratégias mais sustentáveis para minimizar a toxidez dos metais em áreas já contaminadas.

1.2 INTRODUÇÃO

O bioma Pampa abrange três países, Brasil, Uruguai e Argentina, na América do Sul (MMA, 2021; CHOMENKO; BENCKE, 2016). No Brasil o bioma corresponde a cerca de 2% do território nacional e está restrito ao sul do Rio Grande do Sul (RS) (MMA, 2021; CHOMENKO; BENCKE, 2016). O bioma Pampa possui uma grande biodiversidade de vegetação campestre (ANDRADE et al., 2023). Além disso, o bioma Pampa também fornece serviços ecossistêmicos essenciais como armazenamento de carbono (OVERBECK et al., 2015). Porém, a conservação de ecossistemas não florestais, como o bioma Pampa é negligenciada no mundo (OVERBECK et al., 2007, 2015; DA SILVA MENEZES et al., 2018). De modo que, nos últimos anos a vegetação campestre, nativa do bioma Pampa, vem sendo substituída por culturas agrícolas anuais, o que pode gerar importantes perdas na biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2017; MENGUE et al., 2020). Dessa forma, surge a necessidade de desenvolver estratégias para manejos mais sustentáveis dos campos, mas que também aumentem a eficiência econômica da região (CHOMENKO; BENCKE, 2016).

A vitivinicultura ganhou espaço na Campanha Gaúcha e é apontada como uma atividade de menor impacto ao bioma Pampa, isso porque, as espécies nativas do bioma são conservadas no interior de vinhedos (CHOMENKO; BENCKE, 2016). Além disso, alguns fatores estão contribuindo para a expansão do cultivo de viníferas na Campanha Gaúcha como as condições edafoclimáticas da região, associado a baixa declividade que favorece a mecanização e o menor custo das terras (MOTA, 1992; FLORES, 2018; TROIAN et al., 2021). Dessa forma, apesar do cultivo de videiras em áreas do bioma Pampa, conciliar a geração de renda e a conservação da vegetação nativa, existem alguns impactos negativos relacionados à vitivinicultura. Isso porque são necessárias aplicações de fungicidas, para obter uma boa produtividade e qualidade dos frutos (CESCO et al., 2021). Alguns dos fungicidas mais utilizados são, a calda bordalesa $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{OH})_2]$, o oxiclreto de cobre $[\text{Cu}_2 \text{Cl}(\text{OH})_3]$ e o mancozebe $(\text{C}_8 \text{H}_{12} \text{MnN}_4 \text{S}_8 \text{Zn})$ (TIECHER et al., 2017, 2018;

SCHWALBERT et al., 2021). Produtos que contém Cu, Zn e Mn na sua composição, por exemplo, aplicações anuais de Cu podem chegar a 30 kg ha⁻¹ (CASALI et al., 2008). Assim, com o tempo e sucessivas aplicações, os metais pesados podem ser acumulados em solos de vinhedos (BRUNETTO et al., 2016, 2018; MIOTTO et al., 2017).

O Cu, Zn e Mn são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (KABATA-PENDIAS, 2011; MARSCHNER, 2012). No entanto, elevados teores dos metais podem causar toxidez às plantas (KABATA-PENDIAS, 2011; MARSCHNER, 2012). No estado do Rio Grande do Sul (RS), teores maiores que 0,4 mg dm³ de Cu, 0,5 mg dm³ de Zn extraídos por Mehlich-1 e 0,5 mg dm³ de Mn extraído com KCl 1 mol l⁻¹ são considerados altos para a maioria das culturas (CQFS-RS/SC, 2016). Porém, em solos de vinhedos da Campanha Gaúcha cultivados a 36 anos e com histórico de aplicação de fungicidas foram observados 34,9 mg kg⁻¹ de Cu, 12,2 mg kg⁻¹ de Zn e 40,5 mg kg⁻¹ de Mn extraído por Mehlich-1 (SILVA et al., 2020). Além disso, a toxidez dos metais pode ser potencializada em vinhedos implantados na Campanha Gaúcha do RS. Isso porque, alguns solos dessas regiões são caracterizados por textura arenosa (ROESCH et al., 2009; SILVA et al., 2020), baixo teor de matéria orgânica e baixa capacidade de troca de cátions (SILVA et al., 2020). Assim, a capacidade de retenção de metais no solo é menor, aumentando a disponibilidade e mobilidade a medida que se acumulam no solo (BRUNETTO et al., 2016; TIECHER et al., 2018; GUPTA et al., 2019; LAURENT et al., 2020; KUMAR et al., 2021).

O aumento nos teores de Cu, Zn e Mn no solo, podem favorecer algumas espécies nativas e/ou exóticas, de forma que as espécies mais sensíveis são suprimidas, o que pode alterar a composição botânica do local (WOCH et al., 2016; SILVA et al., 2020) e diminuir a diversidade de espécies presentes em vinhedos (HUANG et al., 2020). Além disso, outras práticas de manejo em vinhedos como o revolvimento do solo e a adubação, podem favorecer a perda de biodiversidade e alterar a composição botânica (LAMBERS et al., 2013; SILVA et al., 2020). Isso porque, os vinhedos antigos quando diminuem a produção, são erradicados e o solo é revolvido para a implantação de novo vinhedo. O revolvimento do solo pode potencializar a mineralização da matéria orgânica, aumentando a disponibilidade de metais pesados, como o Cu. Isso acontece porque, por exemplo, a maior parte do Cu está complexado na matéria orgânica do solo (BRUNETTO et al., 2016, 2018). Nos vinhedos, por causa da adubação, a disponibilidade de nutrientes é maior, o que pode beneficiar espécies com maior capacidade de resposta à fertilidade do solo (LAMBERS et al., 2013; SILVA et al., 2020). Dessa forma, quando espécies exóticas invasoras são favorecidas e há um maior grau de invasibilidade, também pode ocorrer diminuição da riqueza de espécies nativas

(DRESSENO et al., 2018). Além disso, as plantas modificam o ambiente do solo através da exsudação de ácidos orgânicos e liberação de metabólitos secundários e com um aumento de plantas invasoras, podem ocorrer alterações na química do solo, nas relações entre planta-planta e planta-microorganismos e assim na função do ecossistema (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). No entanto, pouco se sabe como o aumento dos teores do Cu, Zn e Mn no solo podem influenciar a diversidade das plantas nativas do bioma Pampa presentes em vinhedos. Dessa forma, conhecer a alteração botânica da flora nativa do bioma Pampa nas áreas de vinhedos é importante para realizar o manejo ou intervenções nessas áreas, visando conservar a biodiversidade do bioma Pampa.

Efeitos da toxidez causados pelo Cu, Zn e Mn podem ser observados através de alterações bioquímicas e fisiológicas nas plantas (TIECHER et al., 2016; TRENTIN et al., 2019; XIAO et al., 2020; HAMMERSCHMITT et al., 2020; YADAV et al., 2021; SCHWALBERT et al., 2021; MORSCH et al., 2022). O excesso de metais no tecido pode aumentar a concentração de espécies reativas de Oxigênio (ERO) e assim causar estresse oxidativo (MALEKI et al., 2017; BALAFREJ et al., 2020; KAUR; GARG, 2021; MARQUES et al., 2023). Além disso, a redução de pigmentos fotossintéticos e, conseqüentemente, a menor taxa fotossintética são relatadas para espécies cultivadas com altos teores de Cu, Zn e/ou Mn (DE CONTI et al., 2017; ALEJANDRO et al., 2020; BALAFREJ et al., 2020; KAUR; GARG, 2021). O aumento nos teores dos metais também pode causar desbalanços nutricionais (BALAFREJ et al., 2020; KAUR;GARG, 2021; SILVA et al., 2022). Isso porque, os metais Cu, Zn e Mn podem ter relações sinérgicas ou antagônicas entre eles, mas também com outros nutrientes, o que pode causar toxidez de algum elemento ou até mesmo deficiência (KABATA-PENDIAS, 2011). Dessa forma, essas alterações refletem em menor produção de biomassa e em casos mais extremos até a morte das plantas (SILVA et al., 2022). Além disso, o aumento simultâneo de mais de um metal também pode potencializar à toxidez as plantas (TIECHER et al., 2016, 2017; HAMMERSCHMITT et al., 2020).

As plantas para se adaptarem aos ambientes com elevados teores de metais desenvolvem mecanismos de tolerância para diminuir a toxicidade, absorção e mobilidade dos metais. As plantas mais tolerantes cultivadas sobre excesso de Cu, Zn e/ou Mn podem diminuir a translocação dos metais para a parte aérea, onde os efeitos dos metais pode ser mais nocivos (TIECHER et al., 2017; YOTOVA et al., 2018; HAMMERSCHMITT et al., 2020). Além disso, as plantas podem armazenar os metais em áreas celulares metabolicamente menos ativas como, parede celular e vacúolo (XIAO et al., 2020). Mas também, para combater as ERO, às plantas podem aumentar a atividade de enzimas

antioxidantes (TIECHER et al., 2016; BALAFREJ et al., 2020; XIAO et al., 2020; KUMAR et al., 2021). Porém, não é suficientemente conhecido os mecanismos em plantas nativas, quando cultivadas em solos com excesso de Cu, Zn e Mn.

Convém destacar que a manutenção de plantas nativas nas entrelinhas dos vinhedos auxilia na proteção física do solo e ciclagem de nutrientes (DE CONTI et al., 2019). Mas também, podem diminuir a disponibilidade desses metais para as videiras, através da técnica de fitorremediação. Os processos normalmente utilizados para a fitorremediação em solos com elevados teores de metais são a fitoextração e a fitoestabilização (GARBUSU; ALKORTA, 2003; PINTO et al., 2016). Na fitoextração as plantas são utilizadas para absorver e acumular os metais na parte aérea e com a remoção da planta, há a remoção dos metais do solo (YAN et al., 2020). Enquanto que na fitoestabilização, as plantas são utilizadas para diminuir a biodisponibilidade dos metais no solo (YAN et al., 2020). Além disso, as espécies que permanecem nas áreas contaminadas são resultado de uma pressão ambiental para seleção de mecanismos de tolerância e podem ser mais adequadas para serem utilizadas na fitoestabilização (MATANZAS et al., 2021). Dessa forma, é importante conhecer espécies nativas que podem tolerar altos teores de metais e, portanto, possíveis candidatas a fitorremediação dessas áreas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Verificar os impactos do aumento dos teores de Cu, Zn e Mn em solos de vinhedos sobre a vegetação nativa do bioma Pampa preservada na entrelinha, os mecanismos de tolerância utilizados por espécies nativas do bioma Pampa em resposta ao excesso dos metais e indicar quais potencialmente podem ser usadas na fitorremediação.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar os impactos dos maiores teores de Cu, Zn e Mn em solo de vinhedos sobre a produção de biomassa, composição botânica, riqueza e diversidade de espécies presentes nas entrelinhas dos vinhedos no inverno e verão;
- b) Identificar através de abordagens bioquímicas e fisiológicas estratégias e mecanismos de tolerância utilizados pelas plantas nativas do bioma Pampa para diminuir a toxicidade, absorção e mobilidade dos metais e crescerem em áreas com altos teores de Cu, Zn e Mn;

c) Identificar as espécies nativas do bioma Pampa com maior contribuição de biomassa nos vinhedos, e assim possíveis candidatas a fitorremediação dessas áreas;

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Bioma Pampa e a vitivinicultura

O bioma Pampa está localizado na América do Sul e abrange uma área de 750 mil km², que se estende entre três países, o Brasil, Uruguai e a Argentina (MMA, 2021; CHOMENKO; BENCKE, 2016). No Brasil, o bioma Pampa está restrito ao extremo sul do Rio Grande do Sul- RS e ocupa uma área de 178 mil km² (CHOMENKO; BENCKE, 2016). Isso corresponde a cerca de 2% do território nacional e 63% do estadual (MMA, 2021; CHOMENKO; BENCKE, 2016; ANDRADE et al., 2023). O Pampa possui uma grande biodiversidade de fauna e flora, com a presença de espécies endêmicas, em extinção, e que ainda nem foram catalogadas (MMA, 2021). Ao menos 12503 espécies de plantas, animais, fungos e bactérias já foram registradas (ANDRADE et al., 2023). Dessa forma, estima-se que o bioma Pampa detem 9% da biodiversidade nacional (ANDRADE et al., 2023). Atualmente ao menos 3642 espécies de plantas vasculares de 191 famílias foram catalogadas (ANDRADE et al., 2023). As duas famílias mais abundantes são Asteraceae, com 476 espécies e Poaceae, com 423 espécies (ANDRADE et al., 2023). Além disso, o gênero mais abundante da família Asteraceae é o *Baccharis* e da família Poaceae o gênero *Paspalum* (ANDRADE et al., 2023). Da Silva Menezes et al. (2018) já registraram 56 espécies de plantas vasculares em uma única parcela de 1 m² em um levantamento botânico no bioma Pampa.

Em ecossistemas não florestais, como o bioma Pampa normalmente a conservação e restauração é negligenciada, o que coloca em risco toda a sua biodiversidade (OVERBECK et al., 2007, 2015; DA SILVA MENEZES et al., 2018). Estima-se que em 15 anos, em uma área do bioma Pampa houve uma redução de 25% da vegetação campestre nativa, enquanto que a área com cultivo de soja aumentou em 145,56% e a silvicultura em 167% (MENGUE et al., 2020). Essa conversão da vegetação campestre para culturas agrícolas pode gerar importantes perdas de biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2017). Dessa forma, são necessários sistemas produtivos que utilizam manejos e culturas mais sustentáveis dos campos (CHOMENKO; BENCKE, 2016).

Em 2020, o Brasil teve 74.826 ha⁻¹ plantados com videiras (DE MELLO; MACHADO, 2021). O estado do RS é responsável por 62,51% da área vitícola nacional, com

uma produção de 735.356 toneladas de uva em 2020 (DE MELLO; MACHADO, 2021). Na região da Campanha Gaúcha, a vitivinicultura foi introduzida por volta da década de 80 devido, principalmente, as suas condições edafoclimáticas favoráveis, associada a declividade, de no máximo 15%, que favorece a mecanização de operações, além disso, as terras possuem baixo custo (FLORES, 2018; TROIAN et al., 2021). Nessa região, a vitivinicultura vem sendo apontada como uma atividade de menor impacto ao bioma Pampa, pois não traz alterações drásticas na paisagem (CHOMENKO; BENCKE, 2016). Isso é possível porque, o sistema de condução utilizado é em espaldeira (SARMENTO, 2016; FLORES, 2018), que permite a entrada de luz e manutenção das espécies nativas do bioma Pampa nas entrelinhas de cultivo.

2.1.2 Acúmulo e disponibilidade de Cu, Zn e Mn no solo

Na vitivinicultura, para se obter alta produtividade e uva com qualidade são necessárias aplicações de fungicidas para o controle de doenças fúngicas, como o míldio (*Plasmopara viticola*) (BRUNETTO et al., 2016; CESCO et al., 2021). Alguns dos produtos mais utilizados para os tratamentos fitossanitários são a calda bordalesa [$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{OH})_2$], o oxiclureto de cobre [$\text{Cu}_2 \text{Cl}(\text{OH})_3$] e o mancozebe ($\text{C}_8 \text{H}_{12} \text{MnN}_4 \text{S}_8 \text{Zn}$) (KOMÁREK et al., 2010; TIECHER et al., 2017, 2018; SCHWALBERT et al., 2021). Produtos que contém metais pesados como Cu, Zn e Mn na composição. Aplicações anuais de Cu na produção de uvas podem chegar a 30 kg ha^{-1} (CASALI et al., 2008). Além disso, em um estudo realizado na França foi constatado que cada aplicação da calda bordalesa introduziu $3\text{-}5 \text{ kg Cu ha}^{-1}$ (KOMÁREK et al., 2010). Dessa forma, ao longo dos anos, as frequentes aplicações podem promover o acúmulo de metais em solos de vinhedos, o que é observado no Brasil (BRUNETTO et al., 2016, 2018). Mas também, em vários outros países pelo mundo (KOMÁREK et al., 2010; CAMPILLO-CORA et al., 2019; SONODA et al., 2019; ROVIELLO et al., 2021).

Os teores dos metais no solo em vinhedos são influenciados por vários fatores como, idade dos vinhedos, histórico e frequência de aplicação de fungicidas, bem como, tipo e manejo do solo (BRUNETTO et al., 2016; BORTOLUZZI et al., 2019). Em vinhedos mais jovens os teores de Cu são mais baixos, por exemplo, em um vinhedo de 5 anos o teor de Cu extraído por Mehlich-1 foi de $12,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (HUMMES et al., 2019). Enquanto que, em um vinhedo com 40 anos de cultivo o teor de Cu extraído por EDTA chegou a 583 mg kg^{-1} (CASALI et al., 2008). Os maiores teores dos metais são observados nas camadas mais superficiais dos solos (BRUNETTO et al., 2018). Isso pode ser atribuído a fatores como:

aplicações unidirecionais de fungicidas; os metais que ficam na superfície das folhas podem ser lavados; os materiais das podas e folhas senescentes são mantidas na superfície do solo; ciclagem dos metais pelas plantas na entrelinha dos vinhedos; entre outros (BRUNETTO et al., 2018). Além disso, o Cu, Zn e Mn são retidos no solo em partículas orgânicas e inorgânicas, através de ligações físico-químicas de diferentes graus de energia (COUTO et al., 2016; BRUNETTO et al., 2018; FLOGEAC et al., 2005). No primeiro momento, o Cu, Zn e o Mn podem se ligar a grupos funcionais, formando complexos de esfera interna, o que confere baixa mobilidade dos metais no solo (BRUNETTO et al., 2016, 2018; CESCO et al., 2021). Mas, caso ocorra à saturação dos grupos funcionais a energia de ligação pode diminuir, o que aumenta a disponibilidade e mobilidade dos metais no solo (COUTO et al., 2016; BRUNETTO et al., 2018; FERREIRA et al., 2023).

A toxidez pelos metais é causada principalmente pelo teor disponível no solo (GHAZARYAN et al., 2019). Assim, alguns fatores como pH, teor de argila, matéria orgânica (MO) e capacidade de troca de cátions (CTC) são importantes para aumentar ou diminuir a disponibilidade dos metais (BRUNETTO et al., 2016; GUPTA et al., 2019; LAURENT et al., 2020; KUMAR et al., 2021). Em solos com menor pH e baixos teores de argila e matéria orgânica, o Cu, Zn e Mn estarão mais disponíveis (KUMPIENE et al., 2008; GHAZARYAN et al., 2019). Tornando-se um problema em áreas de vinhedos no bioma Pampa. Isso porque, esses solos são caracterizados por serem arenosos, com baixo teor de matéria orgânica e baixos valores de CTC_{pH7} (SILVA et al., 2020). Os maiores teores de Cu, normalmente estão complexados na matéria orgânica (BRUNETTO et al., 2018). Enquanto que grande parte do Zn está adsorvido nos argilominerais (BRUNETTO et al., 2018). Mas também, por exemplo, o Cu e o Zn podem interagir com espécies químicas de P e Ca, precipitando com fosfatos e carbonatos (KUMPIENE et al., 2008; KUMAR et al., 2021). A maior disponibilidade do Mn e portanto maiores problemas, em relação a toxidez desse metal, serão em solos ácidos (NOOR et al., 2022). Além disso, estudos que avaliaram a combinação de altos teores de Cu e Zn associado a solos arenosos e baixos teores de matéria orgânica, verificaram uma maior toxidez às plantas (TIECHER et al., 2016; HAMMERSCHMITT et al., 2020).

2.1.3 O Cu, Zn e Mn em plantas

O Cu, Zn e Mn desempenham funções essenciais no desenvolvimento das plantas (MARSCHNER, 2012). O Cu participa de funções na fotossíntese, respiração, metabolismo do Carbono (C) e Nitrogênio (N); além disso, auxilia em danos causados pelo estresse oxidativo (MARSCHNER, 2012; YRUELA, 2009). Já, o Zn participa de várias funções

estruturais e /ou catalíticas, está presente em enzimas e também auxilia na regulação de atividade de enzimas (MARSCHNER, 2012; GUPTA et al., 2016), regulação de auxina, reparo do complexo fotossistema II, manutenção da concentração de CO₂ no mesófilo e outros processos fisiológicos (GUPTA et al., 2016). Enquanto que o Mn está envolvido em diferentes funções nas plantas como fotossíntese, respiração, auxilia contra patógenos e na sinalização hormonal (ALEJANDRO et al., 2020). Dessa forma, a deficiência de um desses metais pode gerar alterações em funções do metabolismo da planta. Porém, o excesso pode causar fitotoxidez (YRUELA, 2009; MARSCHNER, 2012; GUPTA et al., 2016; ALEJANDRO et al., 2020).

O acúmulo excessivo de Cu, Zn e Mn em tecidos podem causar alterações negativas a nível bioquímico e fisiológico (TIECHER et al., 2016; TRENTIN et al., 2019; HAMMERSCHMITT et al., 2020; YADAV et al., 2021; SCHWALBERT et al., 2021; MORSCH et al., 2022; BALAFREJ et al., 2020). Concentrações em tecidos, entre 20-100 mg kg⁻¹ de Cu na parte aérea, 150-200 mg kg⁻¹ de Zn e concentrações acima de 400 mg kg⁻¹ de Mn podem diminuir o crescimento e biomassa das plantas mais sensíveis (KABATA-PENDIAS, 2011).

O excesso de metais como, Cu, Zn e Mn no tecido podem aumentar a concentração de ERO (MARQUES et al., 2023; BALAFREJ et al., 2020; KAUR; GARG, 2021). O excesso de ERO pode causar estresses oxidativos como peroxidação lipídica da membrana, danos ao DNA, inibição de enzimas, degradação de proteínas e oxidação de aminoácidos (MALEKI et al., 2017). As ERO incluem, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singlete (^{1/2}O₂), ânion superóxido (O₂⁻), radicais hidroxila (HO), alcóxila (RO•), peróxila (RO₂•) e hidroperóxido orgânico (ROOH) (MALEKI et al., 2017). O O₂⁻, normalmente é a primeira ERO a ser gerada e é produzida pela redução do O₂, enquanto que a redução do O₂⁻ pode gerar H₂O₂ (GILL; TUTEJA, 2010). Mas também, outras espécies de ERO mais reativas, como OH, a qual não existe mecanismos enzimáticos para sua eliminação (GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, o ciclo redox entre Cu²⁺ e Cu⁺, através da reação de Fenton, catalisa a produção de OH proveniente do O₂⁻ e H₂O₂ (GILL; TUTEJA, 2010).

Os aumentos nos teores dos metais na parte aérea também podem alterar parâmetros fotossintéticos (DE CONTI et al., 2017; BALAFREJ et al., 2020; KAUR; GARG, 2021). Concentrações excessivas de Mn diminuem a taxa de assimilação de CO₂ e a condutância estomática (SANTOS et al., 2017). Além disso, altas concentrações de Cu, Zn e Mn podem diminuir a concentração de pigmentos fotossintéticos (SCHWALBERT et al., 2022; SILVA et al., 2022; THIESEN et al., 2023). Metais como Cu, Zn e Mn podem diminuir a síntese de

clorofila, mas também substituir o átomo de Mg na estrutura central da clorofila, o que pode degradá-la (HE et al., 2022; SCHWALBERT et al., 2022; KÜPPER; ANDRESEN, 2016).

O Cu, Zn e o Mn também podem ter interações sinérgicas, quando a presença de um metal aumenta a absorção do outro, ou antagônicas, quando o aumento de um metal diminui a absorção do outro (KABATA-PENDIAS, 2011). O Cu e o Zn podem competir, ou seja, um pode inibir a absorção do outro (KABATA-PENDIAS, 2011). Assim como, a alta disponibilidade Zn ou Mn pode causar deficiência do outro (MARSCHNER et al., 2012). De Conti et al. (2018) observaram que em maiores concentrações de Cu pode ocorrer um aumento do teor de Mn na parte aérea, indicando o potencial de toxicidade combinada de Cu/Mn. O Cu e Zn apresentaram relação sinérgica em milho quando cultivado com altos teores dos dois metais, o que aumentou a toxidez as plantas, de forma que o crescimento das plantas, a concentração de pigmentos fotossintéticos e assim a eficiência fotoquímica foram menores (TIECHER et al., 2016). Além disso, Marastoni et al. (2019) observou uma relação antagônica entre Zn e Mn em videiras, quando cultivadas com doses crescentes de Cu. Dessa forma, todas essas alterações causadas pelo excesso de Cu, Zn e Mn citadas acima causam desbalanços nutricionais, bem como, diminuição no crescimento e produção de biomassa nas plantas (BALAFREJ et al., 2020; KAUR; GARG, 2021; MARQUES et al., 2023; THIESEN et al., 2023).

2.1.4 Possíveis alterações na composição botânica em vinhedos e implicações agronômicas

O aumento na disponibilidade de metais pesados no solo como o Cu, Zn e o Mn, podem alterar a composição botânica do local (WOCH et al., 2016; SILVA et al., 2020). Silva et al. (2020) observaram uma diminuição de espécies da família Poaceae em áreas de vinhedos com altos teores de Cu. Isso pode acontecer porque, espécies mais sensíveis aos metais podem desaparecer, enquanto que espécies que utilizam mecanismos de tolerância e estratégias para se adaptar a essas condições podem se tornar mais abundantes (WOCH et al., 2016; SILVA et al., 2020). De forma que com o desaparecimento ou menor crescimento das espécies mais sensíveis, mais recursos como espaço, água e nutrientes estarão disponíveis, beneficiando as espécies mais tolerantes que muitas vezes podem ser invasoras (SILVA et al., 2020). Dessa forma, o aumento de espécies exóticas também pode favorecer a diminuição na riqueza de espécies nativas (DRESSENO et al., 2018). Por exemplo, a espécie exótica *Eragrostis plana* é indicada como responsável por alterar a riqueza de espécies nativas no bioma Pampa e as espécies de gramíneas foram as mais afetadas (DRESSENO et al., 2018).

A maior contribuição de espécies exóticas podem causar impactos na função do ecossistema (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). Isso porque, as plantas exóticas através de exsudatos radiculares podem modificar a química do solo rizosférico e nas relações entre as plantas, de forma que espécies exóticas podem obter vantagem competitiva, uma vez que seus compostos são novos para espécies nativas (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). A diversidade de espécies também pode ser menor em condições de altos teores de metais pesados (HUANG et al., 2020). Mas também, além dos metais o aumento de fertilidade do solo pode diminuir a diversidade de espécies (SILVA et al., 2020).

Por outro lado, manter uma maior biodiversidade e riqueza de espécies pode aumentar a resistência contra plantas invasoras (KENNEDY et al., 2002) e até mesmo pode melhorar as propriedades da uva e do vinho (MUSCAS et al., 2017). Além disso, manter as plantas na entrelinha de cultivo é de grande importância para a conservação do solo e ciclagem de nutrientes (BRUNETTO et al., 2016). Manter o solo coberto diminui o processo erosivo, bem como, diminui a perda dos metais pesados para recursos hídricos e lençol freático (BRUNETTO et al., 2016; DRESCHER et al., 2021). Além disso, essas plantas na entrelinha dos vinhedos podem reduzir a fração disponível de metais para as videiras, através da técnica de fitorremediação (BRUNETTO et al., 2016).

2.1.5 Mecanismos de tolerância utilizados pelas plantas em condições de estresse por metais pesados

As plantas podem utilizar diferentes estratégias para crescerem em condições de altos teores de metais pesados, como Cu, Zn e Mn. As plantas, podem modificar as condições na rizosfera para diminuir a disponibilidade e a absorção de metais, como alterar o pH e/ou através da liberação de compostos orgânicos específicos de baixo peso molecular pela raiz (DE CONTI et al., 2018; TRENTIN et al., 2022). Porém, após a absorção um mecanismo de tolerância utilizado plantas é acumular os metais em órgãos onde os metais serão menos nocivos, como as raízes (TIECHER et al., 2017; HAMMERSCHMITT et al., 2020). Os metais como Cu, Zn e Mn podem ser adsorvidos em grupos funcionais na parede celular e/ou contidos nos vacúolos das células em raízes, diminuindo a toxidez e o transporte dos metais (FU et al., 2011; YANG et al., 2018; XIAO et al., 2020). A parede celular funciona como uma primeira barreira aos metais, ela contém polissacarídeos e proteínas na sua composição, e seus grupos funcionais como carboxila, hidroxila, amino e aldeído, podem participar da adsorção, troca iônica, complexação, cristalização e precipitação dos metais, o que limita a entrada dos íons na membrana celular (FU et al., 2011; YANG et al., 2018; XIAO et al., 2020). Os

vacúolos são metabolicamente inativos, mas desempenham um papel importante regulando a distribuição de metais pesados (BASHIR et al., 2021). Os metais no vacúolo podem se ligar principalmente a ácidos orgânicos, reduzindo a atividade dos íons livres (FU et al., 2011; XIAO et al., 2020). Além disso, acumular os metais no caule também pode ser uma estratégia, pois evita o transporte dos metais até as folhas (MARQUES et al., 2023). Isso porque, a folha é o órgão fotossinteticamente ativo das plantas, sendo muito sensível e onde os metais podem ser mais nocivos, mesmo em pequenas concentrações os metais podem causar alterações graves em sua anatomia (YADAV et al., 2021).

Mas também, para diminuir o estresse oxidativo causado pelos metais pesados as plantas podem utilizar o sistema de defesa antioxidativo (GILL; TUTEJA, 2010; KUMAR et al., 2021; SCHWALBERT et al., 2022). O sistema de defesa antioxidativo pode ser enzimático ou não enzimático (GILL; TUTEJA, 2010). As plantas mais tolerantes aos metais podem aumentar a atividade das enzimas antioxidantes como, SOD, POD, catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (TIECHER et al., 2016; BALAFREJ et al., 2020; XIAO et al., 2020; KUMAR et al., 2021). O sistema antioxidativo não enzimático é formado por glutatona, flavonoides, carotenóides, ascorbato e tocoferóis (YAN et al., 2020). Por outro lado, espécies mais sensíveis aos metais pesados podem diminuir a atividade das enzimas antioxidantes, o que pode causar danos celulares, uma vez as plantas não estarão protegidas das ERO (TIECHER et al., 2017; HAMMERSCHMITT et al., 2020). A SOD é importante na tolerância do estresse da planta, sendo a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, isso porque, a SOD é responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (HASANUZZAMAN et al., 2020). O que pode reduzir a possibilidade de geração de OH (HASANUZZAMAN et al., 2020). A enzima POD tem um papel importante contra o estresse oxidativo, através do consumo do H_2O_2 , assim como outras enzimas, por exemplo, as catalases que podem dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2 (GILL; TUTEJA, 2010).

2.1.6 Fitorremediação de metais pesados

A fitorremediação é uma técnica natural, de baixo custo e que pode ser utilizada para remediar o solo contaminado por metais pesados (YADAV et al., 2018; YAN et al., 2020). Além disso, a fitorremediação desses solos pode contribuir para a maior estabilidade do ecossistema, prevenir a erosão, melhorar as propriedades físico-químicas do solo, bem como na biodiversidade (GHAZARYAN et al., 2019). Existem seis processos de fitorremediação para solos poluídos por diferentes poluentes como: fitoextração, fitodegradação, fitovolatilização, fitofiltração, rizofiltração e fitoestabilização (YADAV et al., 2018). Porém,

para remediação de solos poluídos por metais são utilizados principalmente os processos de fitoestabilização e fitoextração (GARBUSU; ALKORTA, 2003; PINTO et al., 2016).

No processo de fitoextração as plantas são utilizadas para extrair os metais do solo e posteriormente com a remoção da planta há a remoção dos metais (YAN et al., 2020). As plantas para serem utilizadas na fitoextração devem apresentar propriedades como: rápido crescimento; potencial de acúmulo de metal; grande sistema radicular; tolerância a contaminantes metálicos; de fácil cultivo, colheita e resistência a patógenos e pragas; ampla distribuição geográfica; adaptadas as condições edafoclimáticas e que não sejam atrativas aos herbívoros (YADAV et al., 2018). Além disso, para uma planta ser considerada hiperacumuladora de algum dos metais e ser eficiente no processo de fitoextração, ela precisa conseguir acumular concentrações de 10000 mg kg^{-1} de Zn ou Mn e/ou maiores que 1000 mg kg^{-1} de Cu na massa seca da parte aérea (BAKER; BROOKS, 1989).

No processo de fitoestabilização as plantas são utilizadas para reduzir a biodisponibilidade de metais pesados no solo (YAN et al., 2020). Para essa técnica é importante que as plantas sejam capazes de tolerar níveis elevados de metais pesados, tenham grande quantidade de biomassa de raízes, capacidade de imobilizar contaminantes, além de aumentar a retenção de toxinas nas raízes (YADAV et al., 2018; YAN et al., 2020). Algumas espécies nativas do bioma Pampa foram relatadas como potenciais fitoestabilizadoras de Cu (MARQUES et al., 2023; SILVA et al., 2022), Zn (SCHWALBERT et al., 2021) e Mn (THIESEN et al., 2023). Além disso, em um estudo para avaliar o consórcio de videiras com gramíneas nativas do bioma Pampa os autores observaram que a manutenção da vegetação nativa em vinhedos reduziu a toxicidade de Cu para videiras transplantadas (DE CONTI et al., 2017).

Tanto no processo de fitoextração, quando na fitoestabilização há algumas vantagens e desvantagens. O processo de fitoextração é uma técnica permanente para a remoção dos metais pesados no solo (YAN et al., 2020). Porém, a biomassa contaminada deve ser descartada adequadamente (YADAV et al., 2018). Já na fitoestabilização o metal continuará no ecossistema, mas imobilizado e em menor disponibilidade (YAN et al., 2020). Além disso, manter a planta no solo ajuda na proteção do solo, diminui a lixiviação dos metais para águas subterrâneas, bem como evita a dispersão de partículas de solo contendo metais pesados pelo vento, mas também a chance dos metais pesados entrarem na cadeia alimentar é menor (YAN et al., 2020). Com essa técnica também é possível alcançar a restauração do ecossistema (YADAV et al., 2018). Outra vantagem da fitoestabilização é que não é necessária a eliminação da biomassa contaminada por metais pesados (YAN et al., 2020). Dessa forma,

alguns autores defendem a técnica da fitoestabilização (TEODORO et al., 2020). Mas também as técnicas podem ser aplicadas juntas para alcançarem melhores taxas de descontaminação (YADAV et al., 2018). Ainda, o sucesso da técnica de fitorremediação depende da identificação de espécies/cultivares de plantas adequadas para um determinado metal ou combinação de metais (YADAV et al., 2018).

2.2 ARTIGO 1

Diversity and botanical composition of native species in the Pampa biome in vineyards cultivated on soils with high levels of copper, zinc and manganese and phytoremediation potential

Abstract

Viticulture allows the preservation of native species inside vineyards in the Pampa biome. However, phytosanitary treatments in these areas can increase the levels of Cu, Zn and Mn. The study aimed to (i) verify the influence of Cu, Zn and Mn contents in Pampa biome soils; (ii) identify variables related to Cu, Zn and Mn contents and nutrients that most contribute to the variation in richness, diversity, and dry matter production of native vegetation, (iii) investigate the phytoremediation potential of species present in vineyards. Botanical composition, Cu, Zn, Mn available in the soil, and nutritional composition in plant-shoot biomass of plants in two vineyards (V1 and V2) and native field (NF) were evaluated. Vineyards showed higher Cu, Zn and Mn contents in the soil, resulting in the lowest biomass, richness, and diversity of native species. Mn in tissue was the most important variable in explaining the variation in dry matter. Zn in the soil helped to explain the difference in species richness and diversity. P concentration in tissue was important in elucidating the variation in species diversity. *Paspalum plicatulum* and *Paspalum notatum* have potential for phytostabilization of metals in vineyards.

Keywords: Heavy metals; viticulture; biodiversity; phytostabilization; adaptation strategies.

2.2.1 Introduction

The Pampa biome extends across three South American countries, Brazil, Uruguay, and Argentina (CHOMENKO; BENCKE, 2016). The Pampa has a large biodiversity of grassland vegetation and is responsible for providing essential ecosystem services, such as carbon storage (OVERBECK et al., 2007, 2015). In a recent study in the Brazilian Pampa,

3642 vascular plants were catalogued. Furthermore, this biome has approximately 9% of Brazil's biodiversity (ANDRADE et al., 2023). However, the Pampa is neglected in terms of conservation, and agriculture is expanding in these regions, converting the fields into monocultures, which is threatening its biodiversity (OLIVEIRA et al., 2017; MENGUE et al., 2020; ANDRADE et al., 2023). Thus, sustainable land use strategies are needed to preserve biodiversity and ecosystem functions in the Pampa biome.

Viticulture is expanding in the Pampa biome (FLORES, 2018). This is because the soil and climate conditions are favorable for grapevine cultivation (FLORES, 2018; SILVA et al., 2020). Also, because land areas in the region are cheaper, compared to other regions in Brazil (TROIAN et al., 2021). In addition, the low slope of the relief favors the mechanization of management practices, such as pruning, fertilizing, and grape harvesting (MOTA, 1992; FLORES, 2018; TROIAN et al., 2021). Also, in the Campanha Gaúcha region, grapevines are conducted in espalier (SARMENTO, 2016; FLORES, 2018), which allows the entry of light and maintenance of native plant species of the Pampa biome in between the vineyards. Thus, viticulture can be a more sustainable strategy for the region (CHOMENKO; BENCKE, 2016), as it allows to reconcile land use and income generation with the conservation of the native vegetation of the Pampa biome.

In several countries around the World, viticulture is associated with the accumulation of heavy metals in vineyard soils (HUMMES et al., 2019; ROVIELLO et al., 2021; CAMPILLO-CORA et al., 2019; BEYGI; JALALI, 2019). This happens mainly because of fungicide applications for the control of leaf and fruit diseases, which have heavy metals in their composition (BRUNETTO et al., 2016; SONODA et al., 2019). The most commonly used fungicides are Bordeaux grout [$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{OH})_2$], copper oxychloride [$\text{Cu}_2 \text{Cl}(\text{OH})_3$] and mancozeb ($\text{C}_8 \text{H}_{12} \text{MnN}_4 \text{S}_8 \text{Zn}$) (SCHWALBERT et al., 2021). Thus, heavy metals such as copper (Cu), zinc (Zn) and manganese (Mn), can accumulate in vineyard soils over the years (BRUNETTO et al., 2016; SONODA et al., 2019). Cu, Zn, and Mn are essential micronutrients for plant development, but at high levels, they cause phytotoxicity to plants (KABATA-PENDIAS, 2011; MARSCHNER, 2012). Furthermore, part of the soils in some regions of the Pampa biome are sandy and have low organic matter contents and cation exchange capacity values (SILVA et al., 2020). This can increase the availability, mobility, and toxicity potential of heavy metals to plants (BRUNETTO et al., 2016; TIECHER et al., 2018; GUPTA et al., 2019; LAURENT et al., 2020; KUMAR et al., 2021).

Increased levels of available metals in soil can decrease biodiversity (HUANG et al., 2020). This is because more tolerant native and/or exotic species remain in the areas, while less tolerant species may end up disappearing, which can also alter the botanical composition of the site (WOCH et al., 2016; SILVA et al., 2020). When invasive exotic species are favored, a decrease in native species richness can also occur (DRESSENO et al., 2018). However, little is known about how the associated increase of Cu, Zn and Mn contents in the soil can influence the diversity of native plants of the Pampa biome present in vineyards. Thus, knowing the changes in the native flora of the Pampa biome in vineyards is important to perform management or interventions in these areas, aiming to conserve the biodiversity of the Pampa biome.

The maintenance of native plants between the rows of vineyards, besides protecting the soil (DE CONTI et al., 2019), can decrease the availability of these metals to the grapevines, through the phytoremediation technique. Phytoremediation is considered one of the most economical and environmentally friendly ways to remediate soils contaminated by heavy metals (XIAO et al., 2018). The most used processes for phytoremediation of soils with high heavy metal contents are phytoextraction and phytostabilization (GARBUSU; ALKORTA, 2003; PINTO et al., 2016). In phytoextraction, the plants are used to absorb and accumulate the metals in the shoot and with the removal of the plant, there is the removal of metals from the soil (YAN et al., 2020). In phytostabilization, plants are used to decrease the bioavailability of metals in the soil (YAN et al., 2020). However, to remediate specific ecosystems, it is necessary to select suitable species (WEI et al., 2021), so it is important to know the native species that are tolerant to high metal contents and therefore possible candidates for phytoremediation of these areas.

Few studies have been conducted in the field to verify the associated effect of excess Cu, Zn and Mn on native species of the Pampa biome that cohabit between the rows of vineyards. The studies carried out to date have usually addressed the isolated effect of metals, such as Cu or Zn, on the native species of the Pampa biome (SILVA et al., 2020, 2022; SCHWALBERT et al., 2022). Given the above, this study aimed to (i) verify the influence of high Cu, Zn and Mn contents, in vineyard soil, under native vegetation of the Pampa biome that is preserved in the between-row of cultivation; (ii) to identify which variables related to Cu, Zn and Mn contents and nutrients (P, K, Ca and Mg) most contribute to the variation in richness, diversity and dry matter production of native vegetation, and (iii) to investigate the phytoremediation potential of species present between the rows of vineyards.

2.2.2 Material and methods

2.2.2.1 Characterization of the areas

The study was conducted in commercial vineyards and in a native field area of the Pampa biome, in Santana do Livramento, state of Rio Grande do Sul, southern region of Brazil. The relief of the site varies from gently undulating to wavy (STRECK et al., 2018) and the predominant soil in the region is classified as *Typic Hapludalf* (SOIL SURVEY STAFF, 2006). The climate of the region, according to the Köppen classification, is of type cfa, subtropical, without dry season with hot summer (ALVARES et al., 2013). The average annual temperature is 17.8°C. January is the hottest month with an average temperature of 23.8°C and June is the coldest month with 12.4°C (INMET, 2021). The average annual accumulated precipitation is 1518.3 mm. January is the month with the lowest average precipitation, 94.2 mm and February has the highest, being 170.9 mm (INMET, 2021). The average values of precipitation and temperature in the year 2022 can be seen in the supplementary material (Figure S1).

Two vineyards with a history of fungicide applications were selected: vineyard 1 (V1) and vineyard 2 (V2). These vineyards had high levels of Cu, Zn and Mn. In the southern region of Brazil, contents above 0.4 mg dm³ for Cu (extracted by Mehlich-1), 0.5 mg dm³ for Zn (extracted by Mehlich-1) and 0.5 mg dm³ of Mn (extracted with KCl 1 mol L⁻¹) are considered high (CQFS-RS/SC, 2016). In addition, an area of native field near the vineyards was used as a control (NF). V1 has 43 years of cultivation with the same cultivar in production. In V2, after 29 years of cultivation, the vines were eradicated and in 2006 the soil was turned over and a new vineyard was implanted. The soil characteristics and other information from the NF, V1, and V2 areas are presented in the supplementary material (Table S1). The grapevines in V1 are Sauvignon Blanc and in V2 is Gewurztraminer, both grafted on SO4 rootstock. The grapevine training system is espaliered and the plants in between the rows are mowed at a height of 10 cm approximately five times a year.

2.2.2.2 Botanical Composition Survey

In the experimental areas, V1 and V2, and in the NF area, the botanical composition was surveyed in two periods: the first in January 2022, summer, and the second in July 2022, winter. In the NF, V1 and V2, 4 plots (repetitions) were delimited, along the area according to the slope of the terrain. The plots in V1 and V2 were composed of five crop rows and the surveys were done between the rows. The design used was randomized blocks.

The botanical composition survey was carried out according to the BOTANAL method (TOTHILL et al., 1992). In each plot, three 0.6 x 0.6 m (0.36 m²) frames were randomly allocated. The botanical composition was described according to the list of species present in each frame and the percentage contribution of shoot biomass of each species was determined by visual estimation.

From the survey, richness, diversity, and equitability were evaluated. Richness was evaluated by the total number of species in each plot. The diversity of species was evaluated using the Shannon index (H'), calculated by Equation 1:

$$H' = -\sum_{i=1}^S \frac{ni}{N} \ln \frac{ni}{N} \quad \text{Equation 1}$$

Where: S is the number of the species sampled; ni is dry matter of plants of the same species; N is the total dry matter of the species; and ln is the natural logarithm.

Equitability was determined using Pielou's index (J), calculated by Equation 2:

$$J = \frac{H'}{SR} \quad \text{Equation 2}$$

Where: H' is Shannon's diversity index; SR is species richness.

2.2.2.3 Soil Sampling and Chemical Analysis

In January 2022, within each plot where the botanical survey was conducted, stratified soil samples were collected every 0.05 m to 0.5 m (0-0.05; 0.05-0.10; 0.10-0.15; 0.15-0.20; 0.20-0.25; 0.25-0.30; 0.30-0.35; 0.35-0.40; 0.40-0.45; 0.45-0.50 m). In January (summer) and July (winter), soil samples were also collected and analyzed in the 0-0.20 m layer. The collected soil was air dried, homogenized, and passed through a 2 mm mesh sieve. The available Cu, Zn and Mn contents were extracted by Mehlich 1 (TEDESCO et al., 1995). The determinations of Cu, Zn and Mn concentrations in all extracts were performed using atomic absorption spectrophotometer (AAAnalyst 200, Perkin-Elmer, USA).

2.2.2.4 Dry matter, shoot and root Cu, Zn and Mn concentrations, translocation factor (TF) and bioconcentration factor (BCF)

After species identification and percentage biomass contribution, the shoot of the plants present in each frame was collected for determination of dry matter and concentrations of P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn and Mn in the plant tissue. Within each plot, species that presented biomass contribution greater than 1% were collected outside the frame (shoot and roots) for determination of Cu, Zn, and Mn contents in plant tissue. The samples were dried in a forced air ventilation oven at 65°C until reaching a constant weight. Afterwards, the dry matter was determined using a precision scale. The plant tissue samples, when dry, were

ground in a Wiley mill, prepared, and submitted to nitroperchloric digestion (EMBRAPA, 2009). The concentrations of Ca, Mg, Fe, Cu, Zn and Mn in the extract were determined in an atomic absorption spectrophotometer (AAAnalyst 200, Perkin-Elmer, USA). P concentration was determined according to Murphy and Riley (1962) using a UV-visible spectrophotometer at 882 nm (SF325NM, Bel Engineering, Italy). The concentration of K was quantified in a flame spectrophotometer (Digimed, DM-62, Brazil). The total amounts of Cu, Zn and Mn accumulated in the shoot of the plants were calculated by multiplying the concentration of the metals in the shoot and the dry matter produced.

To evaluate the phytoremediation potential of the species, the translocation factor (TF) and bioconcentration factor (BCF) were calculated. Both factors were calculated for the species with the highest biomass contribution from V1 and V2. With the TF it is possible to verify the ability of the plants to translocate the metals Cu, Zn and Mn from the roots to the shoot (YOON et al., 2006; HOSSEINNIAEE et al., 2022), while the BCF indicates the concentration of the metal that the species has in its roots, in relation to the metal content in the soil (YOON et al., 2006; HOSSEINNIAEE et al., 2022). TF and BCF were calculated using the equations:

$$TF = [Metal_{shoot}] / [Metal_{root}] \quad \text{Equation 3}$$

$$BCF = [Metal_{root}] / [Metal_{soil}] \quad \text{Equation 4}$$

Where: $Metal_{shoot}$ ($mg\ kg^{-1}$) represents the concentration of metals Cu, Zn and Mn, in the shoot, $Metal_{root}$ ($mg\ kg^{-1}$) represents the concentration of metals in the root, and $Metal_{soil}$ ($mg\ kg^{-1}$) represents the available levels of metals in the soil.

2.2.2.5 Statistical Analysis

The data were submitted to the normality of errors test by Shapiro-Wilk and when they were not normal (Cu, Zn and Mn in the stratified soil every 0.05 m) they were transformed using the Box-Cox transformation (BOX; COX, 1964). The available Cu, Zn and Mn contents in the soil were analyzed considering the different soil layers stratified every 0.05 m and the different areas, being bifactorial. For the other variables, the areas were the only factor, being unifactorial. The variables referring to soil characteristics, richness, Shannon Index (H') and Pielou Index (J), dry matter production, concentration of P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn and Mn in plant tissue and accumulated amount of Cu, Zn and Mn were subjected to analysis of variance and, when significant effects were observed, they were compared using the Scott-Knott test (SCOTT; KNOTT, 1974) at 5% probability of error using the ExpDes.en of the R software (R CORE TEAM, 2021).

A multiple linear regression model was fitted to quantify the importance of the variables (concentration of Cu, Zn, Mn, Fe, P, Ca, Mg and K in the shoot of the species, average temperature, accumulated precipitation, concentration of Cu, Zn and Mn accumulated in the shoot, content of Cu, Zn and Mn available in the soil (Cu-soil, Zn-soil and Mn-soil)) that contributed the most to explain the variation in shoot dry matter production, species richness and Shannon diversity index (H'). The model was implemented in R (R CORE TEAM, 2021) using the caret package (KUHNS, 2016). From this model, the "variable importance - VARIMP" metric was calculated, which shows the importance of the variables in explaining the variation in the data. VARIMP was implemented using the "caret" package in R software (KUHNS et al., 2016).

Finally, the concentration of Cu, Zn, Mn, Fe, P, Ca, Mg and K in the shoot of the species present in the vineyards (V1 and V2) and in the native field (NF), mean temperature, accumulated precipitation, concentration of Cu, Zn and Mn accumulated in the shoot (CuAc, ZnAc and MnAc), available Cu, Zn and Mn contents in the soil in the 0-0.2 m (Cu-soil, Zn-soil and Mn-soil), shoot dry matter production, species richness, Shannon diversity index (H') and Pielou index (J) were subjected to principal component analysis (PCA) to explore the variance of the data. This allowed the identification of more complex interactions among the variables, and to verify the similarity among study areas (V1, V2 and NF), species and seasons (winter and summer). The PCA was performed using the 'FactoMineR' and 'factoextra' packages of R (CORE TEAM, 2021).

2.2.3 Results

2.2.3.1 Available Cu, Zn, and Mn contents in the soil and totals in the plants shoot

For Cu levels in the soil, the interaction was significant for the factors, soil layers stratified every 0.05 m and the areas evaluated. The lowest Cu contents up to the 0.50 m layer were observed in the NF soil, compared to the V1 and V2 vineyards. Also, Cu contents in the soil of the NC did not differ statistically between layers (Figure 1a). In V1, the highest soil Cu contents were observed in the 0-0.20 m layer and decreased with increasing depth (Figure 1a). In V2, the highest Cu contents were observed in the 0-0.30 m layer and decreased in depth (Figure 1a). Furthermore, when comparing the vineyards, it was observed that in V1, in the 0-0.15 m layer, Cu contents were higher than in V2. However, in the 0.20-0.30 m layer, Cu contents in V2 were higher than in V1 (Figure 1a).

For Zn levels in the soil, the interaction was significant for the factors, soil layers stratified every 0.05 m and the areas evaluated. The Zn contents in the soil of the three areas

were higher in the 0-0.05 m layer and decreased in depth. However, in this layer, Zn contents were higher in the vineyards than in NF (Figure 1b). V1 showed the highest Zn contents in the 0-0.15 m layer, while in the 0.20-0.45 m layer, V2 showed the highest contents (Figure 1b).

For Mn contents in the soil, the interaction was not significant for the factors, soil layers stratified every 0.05 m and the areas evaluated. But the highest Mn contents were observed in V1 for the soil factor (Figure 1c). Regarding the factor layers, the highest Mn contents were observed in the 0-0.05 m layer in the three areas and decreased in depth (Figure 1d).

The Cu concentrations in the shoot of the plants that cohabited between rows of V1 and V2, were higher, about 8- and 12-fold in summer, and 2- and 3-fold in winter, respectively, relative to the Cu concentrations of the NF (Figures 2a and 2b). Also, in summer, V2 showed 40% more Cu in the shoot of the inter row plants compared to V1 (Figure 2a). The accumulated Cu content in the shoot of the inter row plants in V2 in summer and winter was higher compared to V1 (Supplementary material, Table S2).

Zn concentrations in the shoot of plants in the between rows of V1 and V2 were higher, 2-fold and 3-fold in summer, and 2-fold and 1-fold in winter, respectively, compared to NF (Figures 2c and 2d). In addition, Zn concentrations in the shoot of the plants were 43% higher in summer and 90% higher in winter in V1 compared to V2 (Figures 2c and 2d). The highest Zn accumulation in the shoot of the plants in summer and winter was observed in V1 compared to V2 (Supplementary material, Table S2).

In summer, the highest Mn concentrations were observed in the shoot of V2 plants (Figure 2e). In winter, Mn concentrations were 49 and 58% lower in V1 compared to NF and V2, respectively (Figure 2f). The lowest Mn accumulation, in summer and winter, was observed in the species growing in the interrow of V1 (Supplementary material, Table S2).

P concentrations were lower in the shoot of plants in NF in summer and winter (Supplementary material, Table S3). In summer, P concentrations in the shoot of plants cohabiting the V2 interrow were higher, whereas, in winter, P concentrations were higher in V1 (Supplementary material, Table S3). In summer, K concentrations did not differ among plants in the three areas evaluated. In winter, the highest K concentrations in the shoot of the plants were observed in V2 (Supplementary material, Table S3). The lowest Ca concentrations, in summer and winter, were observed in the shoot of the plants in the NF (Supplementary material, Table S3). The highest concentrations of Mg, in the shoot of the plants, were observed in the interrow of V1 in summer, while in winter there were no differences between the concentrations of Mg in the shoot of the plants in the three areas

(Supplementary material, Table S3). In summer, the highest Fe concentrations were observed in the shoot of the plants in the V1 interrow, but in winter, Fe concentrations were higher in the shoot of the plants in the NF (Supplementary material, Table S3).

2.2.3.2 Botanical composition and species diversity

In summer, in the NF, six species showed the highest contribution of shoot biomass (> 1%) (Table 1): 80.51% from the Poaceae family (*Axonopus argentinus*, *Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum* and *Eragrostis plana*) and 13.16% from the Asteraceae family (*Ageratum conyzoides* and *Vernonia nudiflora*). In winter, the NF showed four species with the highest biomass contribution: 91.56% from the Poaceae family (*A. argentinus*, *P. notatum* and *Andropogon lateralis*) and 3.58% from the Asteraceae family (*V. nudiflora*). Two native species, *A. argentinus* and *P. notatum*, added 67.19 and 84.83% of the biomass in summer and winter, respectively (Table 1). Only one exotic species (*E. plana*) was observed in January (summer) in the NF, with little contribution (Table 1, Supplementary material Table S4).

In V1, seven species in summer showed the highest contribution of shoot biomass (Table 1); 83.28% from Poaceae family (*P. notatum*, *Cynodon* sp., *Eustachys uliginosa*, *P. plicatulum* and *Paspalum urvillei*), 9.59% from Cyperaceae family (*Cyperus brevifolius*) and 2.38% from Asteraceae family (*A. conyzoides*), and three in winter, all three from Poaceae family. Among them, *P. notatum* was the native species that showed the highest biomass contribution in winter and summer (Table 1). One exotic species was observed in each botanical composition survey. In summer, *Cynodon* sp. accounted for 13.20%, and in winter, *Lolium multiflorum* accounted for 84.13% (Table 1, Supplementary material Table S4).

In V2, four species in summer and two in winter showed the highest contribution of shoot biomass (Table 1), being of the Poaceae family. *P. plicatulum* was the species that presented the highest biomass contribution in summer and winter (Table 1). In summer, two exotic species were observed in V2, *Cynodon* sp. and *E. Plana*. They accounted for 25.24% of the shoot biomass. In winter, only *Cynodon* sp. was observed in this area and in a smaller quantity (Table 1, Supplementary material Table S4).

No difference was observed in shoot dry matter of the species in the three areas in summer (Figure 3a). However, in winter, there was less dry matter production of species in the V1 interrow (Figure 3b). In summer, the NF had the highest species richness and V2 the lowest (Figure 3c). However, in winter, there was no difference in species richness in the three areas (Figure 3d). In summer, species diversity was 102 and 130% lower in V2

compared to V1 and NF, respectively (Figure 3e). In winter, species diversity was 33 and 61% higher in NF when compared to V1 and V2, respectively (Figure 3f). Equitability was equal among the areas (NF, V1 and V2) in summer (Figure 3g) and in winter it was lower in the vineyards compared to the NF (Figure 3h).

Accumulated Mn in the shoot of the plants was the most important variable to explain the variation in dry matter in winter (Figure 4a). The available Zn contents, followed by Mn and Cu in the soil, were the most important variables to explain the variation of species richness in summer (Figure 4b). The concentration of P in the shoot of the plants, followed by the available Mn, Cu and Zn contents in the soil, were the most important variables to explain the variation in diversity in winter (Figure 4c). Soil-available Zn and Mn contents were the most important variables to explain the diversity difference in summer (Figure 4d).

2.2.3.3 Total Cu, Zn and Mn, TF and BCF in species cohabiting vineyards

The species showed different concentrations of Cu, Zn, and Mn between NF, V1 and V2 and in the two seasons (Tables 2 and 3). In the plants collected during the summer, in the NF, the species *A. conyzoides* showed the highest concentration of Cu in the shoot and *P. notatum* in the roots (Table 2). In V1, the plants showed similar concentrations of Cu in the shoot, except for *P. urvillei* that showed the lowest concentration, in the roots, *P. notatum* showed the highest concentration of the metal (Table 2). At V2, there was no statistical difference in the concentrations of Cu in the shoot among the species, but *Cynodon* sp. and *P. notatum* showed the highest concentrations of Cu in the roots (Table 2). In plants collected during winter, the highest Cu concentrations in the NF were observed in the shoot of *V. nudiflora*. In the roots, the concentrations were similar among the species (Table 3). In V1, *P. plicatum* showed the highest Cu concentrations in the shoot. In the roots, at V1, Cu concentrations were similar among species, except for *E. uliginosa* that showed the lowest concentrations (Table 3). At V2, *Cynodon* sp. showed the highest Cu concentration in the shoot part. The Cu concentrations in the roots did not differ among species (Table 3).

In the summer, in the NF, Zn concentrations in the shoot were similar among species. In the roots, the highest Zn concentrations were observed in *P. plicatum* (Table 2). At V1, the plants with higher Zn concentrations in the shoot were *A. conyzoides*, *E. uliginosa*, *P. notatum* and *P. plicatum*. In the roots, the highest Zn concentration was observed in *P. plicatum* (Table 2). At V2, *P. plicatum* showed the highest Zn concentrations in the shoot and roots (Table 2). In plants collected in winter, the highest Zn concentrations in NF were observed in the shoot of *P. notatum*. In the roots, Zn concentrations did not differ between

species in the NF (Table 3). In V1, *P. plicatulum* presented the highest Zn concentrations in the shoot and roots (Table 3). At V2, *P. plicatulum* showed the highest Zn concentrations in the roots (Table 3).

In plants collected during the summer in the NF, the highest concentrations of Mn in the shoot of the plants were observed in *P. plicatulum* and, in the roots, in *A. conyzoides* (Table 2). At V1 and V2, *P. plicatulum* presented the highest concentrations of Mn in the shoot. In the roots, the species presented similar Mn concentrations (Table 2). In the plants collected in winter, in the NF the Mn concentrations were similar among the species in the shoot and roots, except *V. nudiflora* that presented the lowest Mn concentration in the roots (Table 3). In V1 and V2, *P. plicatulum* showed the highest concentrations of Mn in the shoot and roots (Table 3).

The native species that accumulated the highest amounts of Cu, Zn and Mn in the shoot during summer and winter were *A. argentinus* and *P. plicatulum* in NF and V2, respectively (Supplementary material, Table S5). In V1, *P. notatum* during summer and *L. multiflorum* in winter accumulated the highest amounts of Cu, Zn, and Mn in the shoot (Supplementary material, Table S5).

The species with the highest biomass contribution in the vineyards, in summer and winter, presented on average $TF < 1$ for Cu. Only *A. conyzoides* in V1 showed the factor greater than one (Table 4). In summer, the species *A. conyzoides*, *E. uliginosa*, *P. notatum* in V1, presented $TF > 1$ for Zn (Table 4). In winter, the species *P. notatum* in V1 and *Cynodon* sp. in V2, presented $TF > 1$ for Zn (Table 4). In summer, the species *A. conyzoides*, *P. notatum* and *P. plicatulum* in V1 and the *Cynodon* sp., *E. plana* and *P. plicatulum* in V2 presented $TF > 1$ for Mn (Table 4). In winter, only *P. notatum* in V1 showed the factor less than one for Mn ($TF < 1$) (Table 4). In addition, all species showed $BCF > 1$ for Cu, Zn, and Mn (Table 4).

2.2.3.4 Principal Component Analysis

The analysis shows the division between the three areas evaluated, with emphasis on the NF in relation to the vineyards (Figure 5a). The variables species richness, concentration of Mn in the shoot and Shannon diversity index (H') are related to the NF. The variables related to the concentrations of metals in tissue and soil show relationship with vineyards, V1 and V2, being Ca, Zn, P in the shoot of species, Cu-soil, Zn-soil and Mn-soil the most related to V1. The variables related to metal concentration in tissue and soil show inverse relationship with species richness and Shannon index (H'). The PCA also shows the division between the

three areas evaluated, with the NF standing out in relation to the vineyards, when considering only accumulated precipitation, average temperature, soil available Cu, Zn and Mn contents (Cu soil, Zn soil and Mn soil), concentration of Cu, Zn and Mn in the shoot (Cu shoot, Zn shoot and Mn shoot) and in the roots (Cu root, Zn root and Mn root) in the species with higher biomass contribution in the NC and in the interrow of vineyards (V1 and V2) (Figure 5b). The variables Mn in the roots and shoot are related to the NF. The variables Zn in the shoot and roots and Cu in the shoot and roots and the soil available Cu, Zn and Mn contents are related to the vineyards. The concentration of Mn in the shoot shows inverse relationship with Zn in the shoot and roots, with Cu in the shoot and roots and the soil available Cu, Zn and Mn contents. Furthermore, the analysis shows that there are differences in the variance of the data between the summer and winter seasons, where the variables Cu in the shoot and Mn and Cu in the roots are related to the summer season (Figure 5b).

2.2.4 Discussion

2.2.4.1 Available Cu, Zn, and Mn contents in the soil and shoot totals

Subtropical soils naturally have Cu, Zn, and Mn contents (ALTHAUS et al., 2018; NOOR et al., 2022). However, the higher contents of the three elements observed in vineyard soils may be due to fungicide applications on leaves and fruit for fungal disease control (HUMMES et al., 2019; ROVIELLO et al., 2021; CAMPILLO-CORA et al., 2019; BEYGI; JALALI, 2019). Also, industrialized, and organic fertilizers can have Cu, Zn and Mn in their composition (DRESCHER et al., 2021; FERREIRA et al., 2023) and, therefore, when applied to vineyards, can increase the contents of the heavy metals in soils. Moreover, the soils of the evaluated areas (NF, V1 and V2) have low clay contents (< 20%), organic matter ($\leq 2.5\%$) and CEC (pH_{7,0}) value ($\leq 7.5 \text{ cmol}_c/\text{dm}^3$) (CQFS-RS/SC, 2016) and, therefore, tend to have low metal adsorption capacity (MIOTTO et al., 2017; LAURENT et al., 2020; GUPTA et al., 2019). This happens because the sand fraction predominates in these soils, and the amount of organic and inorganic particles (clay) is very small and, consequently, the number of functional groups that can retain heavy metals (LIU et al., 2018). With that, in these soils with low metal retention capacity, a higher availability of these metals to plants or mobility in the soil profile is expected (COUTO et al., 2016; BRUNETTO et al., 2018). In addition, the greater simultaneous availability of metals and synergistic or antagonistic interactions between them can potentiate toxicity to plants (TIECHER et al., 2016, 2017; HAMMERSCHMITT et al., 2020).

The highest Cu, Zn, and Mn contents were observed mainly in the most superficial soil layers in V1 and V2 (Figure 1a-d), possibly because of the unidirectionality of fungicide applications that have Cu, Zn, and Mn in their composition (BRUNETTO et al., 2018). Thus, part of the metals is deposited directly on the soil surface and another part comes in contact with the leaves and branches, and can be deposited on the soil, and during the decomposition of these materials, it can contribute to the increase of heavy metal contents (BRUNETTO et al., 2018). Also, cover plant species can absorb and transport Cu, Zn, and Mn to the shoot, which can subsequently senesce and be deposited on the soil surface (BRUNETTO et al., 2018). Thus, the metals Cu, Zn and Mn are retained in the soil on organic and inorganic particles through physicochemical bonds with different degrees of energy (COUTO et al., 2016; BRUNETTO et al., 2018; FLOGEAC et al., 2005). Initially, the bonds may occur at high-affinity sites, usually forming inner-sphere complexes, which may explain the low mobility of metals in soil (FLOGEAC et al., 2005; SPARKS, 2005; DE CONTI et al., 2016). However, with the saturation of functional groups, the binding energy can decrease, increasing the availability and mobility of ions (COUTO et al., 2016; BRUNETTO et al., 2018; FERREIRA et al., 2023).

The higher levels of Cu and Zn in the deeper layers in V2 may be due to soil disturbance after the eradication of the first vineyard. This is because topsoil, which normally has the highest Cu and Zn contents in vineyards with a long history of fungicide applications, is incorporated in deeper layers. In addition, large amounts of metals can be complexed to organic matter (BRUNETTO et al., 2014; DHALI WAL et al., 2019; FERREIRA et al., 2023) and with soil tillage occurs the destruction of soil aggregates and increased soil aeration, which stimulates the activity of microbial biomass, increasing the mineralization of organic matter and, consequently, the availability of Cu and Zn (TRENTIN et al., 2019). But also, the revolving and increased mineralization of organic matter may help explain the lower organic matter content observed in the 0-0.20 m layer in V2 (Supplementary material, Table S1; LAURENT et al., 2020).

The higher concentrations of Cu and Zn in the shoot of plants present in V1 and V2, in winter and summer (Figure 2a-d), can be attributed to the higher Cu and Zn contents in the soil (Figure 1a-b; TIECHER et al., 2016, 2017; HAMMERSCHMITT et al., 2020). Plants present at V1 showed the highest accumulated amounts of Zn and the lowest amounts of Mn in the shoot in winter and summer (Supplementary material, Table S2) because the metals can have synergistic or antagonistic relationships (KABATA-PENDIAS, 2011). Thus, high Zn supply can decrease the concentration of Mn in plants (MARSCHNER et al., 2012). In the

PCA, in general, it can be observed that Mn concentrations in the shoot and roots of the species with the highest biomass contribution in the three areas, are associated with NF and have an inverse relationship with Zn and Cu concentrations, as they are on opposite sides (Figure 5a-b). This can be attributed to the transport of Mn across membranes, which is normally done by proteins that are not specific for the metal and, in this way, Mn transporters in plants can also transport other divalent cations, such as Zn (ALEJANDRO et al., 2020). Also, the ability to accumulate Cu, Zn or Mn in the shoot, as well as to develop adaptive strategies to tolerate higher metal contents is different among the species present within the vineyards, which may also have contributed to the different concentrations of Cu, Zn and Mn in the shoot of the plants in the different areas (SILVA et al., 2020).

2.2.4.2 Dynamics of the grassland vegetation

The contribution of exotic species was higher in the vineyards compared to the NF. This may be due to the increase in Cu, Zn, and Mn contents in the soil that may cause the disappearance of species more sensitive to metals, while more tolerant species may become more abundant (WOCH et al., 2016). Tolerant species use different mechanisms to decrease metal toxicity, uptake, and mobility (XIAO et al., 2020; THIESEN et al., 2023). For example, avoiding translocation of metals to the shoot, where the effects of metals are most harmful (TIECHER et al., 2017; HAMMERSCHMITT et al., 2020) and/or compartmentalizing metals in metabolically less active subcellular structures, such as the vacuole (XIAO et al., 2020; THIESEN et al., 2023). In this way, tolerant exotic species can also benefit, because with the lower growth of sensitive species, there is less competition for water, light, and nutrients (SILVA et al., 2020). Also, the increase in the number of metal-tolerant exotic species may have contributed to the lower species richness (DRESSENO et al., 2018), mainly because exotic species can gain competitive advantage by releasing specific and novel compounds to the native community (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). In vineyards it is also possible to observe an increase in biomass contribution of species of the Poaceae family, in relation to NF, indicating a change in botanical composition in the areas. Changes in botanical composition in vineyards in the Pampa biome due to higher Cu availability in soils have already been reported by Silva et al. (2020).

The biomass production in the interrow of V1 was lower than in the other areas in winter. Moreover, the accumulated Mn in the shoot was the most important variable to explain this biomass difference. This is because increasing or decreasing the concentration of an element in plants can cause nutritional variations and thus decrease biomass production

(KUMAR et al., 2021). The lower species richness in summer and species diversity in winter and summer in V1 and V2 may be due to increased soil available Cu, Zn, and Mn contents and concentrations in plant tissue (Figure 4, 2b, 2d; HUANG et al., 2020; SILVA et al., 2020). So that, high concentrations of metals, such as Cu, Zn and Mn, can cause toxicity to plants and the most sensitive species, decreasing growth or even causing their disappearance in these areas (WOCH et al., 2016; SILVA et al., 2020).

Other factors, such as higher soil fertility in these areas may also be contributing to the change in botanical composition and lower diversity, since it may benefit species that respond better to these factors (SILVA et al., 2020; LAMBERS et al., 2013). This may justify the shoot P content in plants as the most important variable to explain the difference in species diversity during winter. In addition, the growth rate of plants, the amount and composition of root exudates at lower temperatures are different, so that plants may absorb lower concentrations of metals when grown at lower temperatures (WANG et al., 2016). In the PCA it is evident that the variables Cu in the part area and Mn and Cu in the roots are related to the summer season (Figure 5b).

2.2.4.1 Phytoremediation potential

The maintenance of vegetation between the rows of vineyards can be an effective strategy to decrease the availability of metals in the soil, but also, its presence contributes to soil protection and nutrient cycling (DE CONTI et al., 2019). Thus, the phytostabilization process may be the best strategy for phytoremediation of these areas (TEODORO et al., 2020), since it is not necessary to extract the plants from the site (YAN et al., 2020). In addition, plants have a diverse biology, so careful selection of species is necessary to effectively remediate and restore specific ecosystems (WEI et al., 2021). Using exotic species can cause changes in soil fertility and ecosystem function (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). This is because, plants release their own root exudates that can chelate and/or mobilize nutrients, moreover, the nutritional composition of the tissue is also different among species, which can make biogeochemical cycles different from those of native species (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010).

Most of the plants with the highest contribution of shoot biomass showed TF less than one ($TF < 1$), indicating that metals are accumulated mainly in the roots. Keeping excess Cu, Zn, and Mn in the roots may be a tolerance mechanism used by these species to prevent the metals from reaching the shoot, where the metals can be more harmful (TIECHER et al., 2017; YOTOVA et al., 2018; DE CONTI et al., 2021). This is because, metals such as Cu,

Zn, and Mn can be adsorbed on functional groups in the cell wall and/or vacuoles in roots, decreasing free ion activity and transport (FU et al., 2011; YANG et al., 2018; XIAO et al., 2020). Our results agree with Yotova et al. (2018), who found that in some grass species in areas contaminated with Cu, Zn, and Mn, these metals were accumulated mainly in the roots. The low translocation of Cu, Zn, and Mn to the shoot indicates that these species may have potential for the phytostabilization process (TEODORO et al., 2020). The TF was greater than one in some species for Cu, Zn or Mn, however, none of them can be considered hyper accumulative, and therefore used for phytoextraction, because they did not reach the concentrations of 10,000 mg kg⁻¹ of Zn and Mn and of > 1,000 mg kg⁻¹ of Cu in the dry matter of the shoot (BAKER; BROOKS, 1989). In addition, all species showed BCF greater than one, indicating that these species present in vineyards can be used in the process of phytostabilization of metals (YOON et al., 2006; HOSSEINIAEE et al., 2022).

For phytoremediation, it is important that species have a wide distribution and biomass contribution, rapid growth, as well as, have the ability to tolerate high concentrations of metals, so that vegetation is quickly established (SUMAN et al., 2018; YAN et al., 2020). *P. plicatum* and *P. notatum* were the species that had the highest contribution of shoot biomass in the vineyards. This, due to their adaptive potential in tolerating the heavy metals, since the concentrations of the metals in the plant tissue were different among the areas (SILVA et al., 2020; YAN et al., 2020). In addition, *P. plicatum* and *P. notatum* also appeared several times among the species with higher Cu, Zn and/or Mn contents in the shoot and/or roots in the vineyards, as evidenced in tables 2 and 3.

P. plicatum and *P. notatum* may be tolerant to metals, because in some areas and/or seasons, metal concentrations were in the ranges of 20 to 100 mg Cu kg⁻¹ in the shoot, 150 to 200 mg Zn kg⁻¹ and 400 to 500 mg Mn kg⁻¹ of plant tissue dry matter, which are considered toxic to the most sensitive crops (KABATA-PENDIAS, 2011). Also, Mn concentrations tend to be higher in NF compared to vineyards (Tables 2 and 3). This may be because native plants that have evolved in soil with low natural fertility, such as those in the Pampa biome (SCHWALBERT et al., 2022; LAMBERS et al., 2021), may use strategies to increase the solubilization of compounds that have P, and concomitantly other compounds may be solubilized, increasing the availability of Mn. This may explain the high Mn concentrations in the shoot and roots of plants growing in the NF (Figures 2e-f, Tables 2 and 3, LAMBERS et al., 2015, 2021).

Some studies have reported that *P. plicatum* has potential for phytostabilization of Cu in contaminated soils, since the species accumulates Cu mainly in the roots and has a high

bioconcentration factor (DE CONTI et al., 2021; SILVA et al., 2022). Also, De Conti et al. (2019) observed that the consortium of grapevines with native species of the Pampa biome was efficient in reducing Cu availability in soils with moderate and low levels of contamination. In a study with nutrient solution to evaluate Mn toxicity in *P. notatum*, the authors found that this species tolerates high contents of the metal, while the exotic annual species *L. multiflorum* is more sensitive (THIESEN et al., 2023). Thus, we highlight that the species *P. plicatulum* and *P. notatum* have potential for phytostabilization and can be used to phytoremediate the soils of vineyards in the Pampa biome, as well as in future projects for the restoration of these areas. But it is worth reinforcing that native species in the interrow should not be desiccated, because the cycle of plants is interrupted as well as all interactions in the rhizosphere. Therefore, we suggest enriching the interrow vineyards with the native species indicated in this study.

2.2.5 Conclusions

Phytosanitary treatments and fertilization in viticulture increase the levels of Cu, Zn, and Mn in soils and the accumulation of the three metals in the species that cohabit the vineyard rows.

High levels of Cu, Zn, and Mn in the soil promote a higher contribution of exotic species, as well as lower richness and diversity of plant species in the vineyards.

Accumulated Mn in plant tissue is the most important variable in explaining the variation in dry matter between areas, NF, V1 and V2.

The available Zn content in the soil is the most important variable in explaining the difference in plant species richness and diversity in summer, followed by the available Mn contents in the soil.

The concentration of P in plant tissue is the most important variable to explain the difference in diversity of plant species in winter.

The species *P. plicatulum* and *P. notatum* are native species of the Pampa biome that have the highest biomass contribution in the vineyards, in summer and winter, and accumulate the highest amounts of Cu, Zn and Mn in the tissue. Thus, they are the most suitable for the phytostabilization of metals in vineyards of the Pampa biome, as well as being key species for restoration projects in these areas contaminated with metals.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Miolo Group for the structure and for allowing this work to be carried out. To the members of the GEPACES group for all the help, learning, and exchange of experiences. The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education) - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) - CNPq (Process number 408318/2018-0; 302023/2019-4), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul) - FAPERGS (Term of grant 17/2551-0000925-8) for the scholarships provided and the financial resources made available for this study.

References

- ALEJANDRO, Santiago et al. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 300, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00300>.
- ALTHAUS, Daiana et al. Natural fertility and metals contents in soils of Rio Grande do Sul (Brazil). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 42, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20160418>.
- ALVARES, Clayton Alcarde et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- ANDRADE, Bianca O. et al. 12,500+ and counting: biodiversity of the Brazilian Pampa. **Frontiers of Biogeography**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21425/F5FBG59288>.
- BAKER, Alen JM; BROOKS, RR1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v. 1, n. 2, p. 81-126, 1989.
- BEYGI, Mohsen; JALALI, Mohsen. Assessment of trace elements (Cd, Cu, Ni, Zn) fractionation and bioavailability in vineyard soils from the Hamedan, Iran. **Geoderma**, v. 337, p. 1009-1020, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.11.009>.
- BOX, George EP; COX, David R. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, v. 26, n. 2, p. 211-243, 1964.
- BRUNETTO, Gustavo et al. Copper and zinc fractions in the profile of an Inceptisol cultivated with apple in southern Brazil. **Bragantia**, v. 77, p. 333-347, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017033>.

BRUNETTO, Gustavo et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.104>.

BRUNETTO, Gustavo et al. Copper and zinc fractions in vineyard soils in the Middle Western of Santa Catarina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 805-810, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n08p805-810>.

CAMPILLO-CORA, C. et al. Copper and zinc in rhizospheric soil of wild plants growing in long-term acid vineyard soils. Insights on availability and metal remediation. **Science of The Total Environment**, v. 672, p. 389-399, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.301>.

CHOMENKO, Luiza; BENCKE, Glayson A.; BECKER, Adriano Nygaard. Nosso pampa desconhecido. **Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul**, 2016.

COUTO, Rafael da Rosa et al. Accumulation and distribution of copper and zinc in soils following the application of pig slurry for three to thirty years in a microwatershed of southern Brazil. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 5, p. 593-616, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2015.1074183>.

CQFS RS/SC- **Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. SBCS/Núcleo Regional Sul, Porto Alegre. 2016.

DE CONTI, Lessandro et al. Soil solution concentrations and chemical species of copper and zinc in a soil with a history of pig slurry application and plant cultivation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 216, p. 374-386, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.040>.

DE CONTI, Lessandro et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.134>.

DE CONTI, Lessandro et al. Tolerance and phytoremediation potential of grass species native to South American grasslands to copper-contaminated soils. **International Journal of Phytoremediation**, v. 23, n. 7, p. 726-735, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1852528>.

DHALIWAL, S. S. et al. Dynamics and transformations of micronutrients in agricultural soils as influenced by organic matter build-up: A review. **Environmental and Sustainability Indicators**, v. 1, p. 100007, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indic.2019.100007>.

DRESCHER, Gerson Laerson et al. Copper and Zinc fractions and adsorption in sandy soil with long-term pig manure application. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 68, n. 14, p. 1930-1946, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2021.1941904>.

DRESSENO, André LP et al. Negative effects of an invasive grass, but not of native grasses, on plant species richness along a cover gradient. **Austral Ecology**, v. 43, n. 8, p. 949-954, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/aec.12644>.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2. ed. rev. ampl. **Embrapa Informação Tecnológica: Brasília**. 627p. 2009.

FERREIRA, Guilherme Wilbert et al. Effect of organic and mineral fertilizers applications in pasture and no-tillage system on crop yield, fractions and contaminant potential of Cu and Zn. **Soil and Tillage Research**, v. 225, p. 105523, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105523>.

FLOGEAC, Karine; GUILLON, Emmanuel; APLINCOURT, Michel. Adsorption of several metal ions onto a model soil sample: Equilibrium and EPR studies. **Journal of colloid and interface science**, v. 286, n. 2, p. 596-601, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.01.027>.

FLORES, Shana Sabbado. A Região dos " Vinhos da Campanha" e suas Perspectivas de Sustentabilidade. **Territoires du vin**, n. 9, 2018.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *ejmp & ep (European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection)*, v. 3, n. 1, p. 58-66, 2003.

GUPTA, Neha et al. Trace elements in soil-vegetables interface: translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration-a review. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 2927-2942, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.047>.

HAMMERSCHMITT, Rodrigo K. et al. Copper and zinc distribution and toxicity in 'Jade'/'Genovesa' young peach tree. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108763, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108763>

HOSSEINNIAEE, Sadegh et al. Perspectives for phytoremediation capability of native plants growing on Angouran Pb–Zn mining complex in northwest of Iran. *Journal of Environmental Management*, v. 315, p. 115184, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115184>

HUANG, Jingxin et al. Phosphorus is more effective than nitrogen in restoring plant communities of heavy metals polluted soils. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115259, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115259>.

HUMMES, Ana Paula et al. Transfer of copper and zinc from soil to grapevine-derived products in young and centenarian vineyards. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4198-6>

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil. 2021. Normais Climatológicas (1961/1990). Brasília – DF. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/normais>. Acesso em: 05 Set. 2021.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4th ed. 2011.

KUHN, Max. **Caret: Classification and Regression Training**. R package version 6.0-73, 2016. URL <https://CRAN.R-project.org/package=caret>.

KUMAR, Vinod et al. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, p. 127810, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>.

LAMBERS, Hans et al. Phosphorus nutrition of phosphorus-sensitive Australian native plants: threats to plant communities in a global biodiversity hotspot. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. cot010, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/cot010>.

LAMBERS, Hans et al. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. **Trends in plant science**, v. 20, n. 2, p. 83-90, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.007>.

LAURENT, Céline et al. Increased soil pH and dissolved organic matter after a decade of organic fertilizer application mitigates copper and zinc availability despite contamination. **Science of the Total Environment**, v. 709, p. 135927, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135927>.

LIU, Guannan et al. Partitioning and geochemical fractions of heavy metals from geogenic and anthropogenic sources in various soil particle size fractions. *Geoderma*, v. 312, p. 104-113, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.013>.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press. 2012.

MENGUE, Vagner Paz et al. LAND-USE and land-cover change processes in Pampa biome and relation with environmental and socioeconomic data. **Applied Geography**, v. 125, p. 102342, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2020.102342>.

MIOTTO, Alcione et al. Copper accumulation and availability in sandy, acid, vineyard soils. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 48, n. 10, p. 1167-1183, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1341908>.

MOTA, Fernando Silveira da. Identificação da região com condições climáticas para produção de vinhos finos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, n. 5, p. 687-694, 1992.

MURPHY, JAMES; RILEY, John P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NOOR, Iqra et al. Phosphorus confers tolerance against manganese toxicity in *Prunus persica* by reducing oxidative stress and improving chloroplast ultrastructure. **Chemosphere**, v. 291, p. 132999, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132999>.

OLIVEIRA, Tamara Esteves de et al. Agricultural land use change in the Brazilian Pampa Biome: The reduction of natural grasslands. **Land use policy**, v. 63, p. 394-400, 2017.

OVERBECK, Gerhard E. et al. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 9, n. 2, p. 101-116, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2007.07.005>.

OVERBECK, Gerhard E. et al. Conservation in Brazil needs to include non-forest ecosystems. **Diversity and distributions**, v. 21, n. 12, p. 1455-1460, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ddi.12380>.

PINTO, A. P. et al. Biological approaches for remediation of metal-contaminated sites. **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants**, Volume 3, p. 65-112, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40148-5_3.

R CORE TEAM. 2021. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

ROVIELLO, Valentina et al. Assessment of Copper and Heavy Metals in Family-Run Vineyard Soils and Wines of Campania Region, South Italy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, p. 8465, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18168465>.

SARMENTO, Marcelo Benevenga. Diagnóstico da Vitivinicultura na Campanha Gaúcha. **Revista Científica Agropampa**, v. 1, n. 1, 2016.

SCHWALBERT, Raíssa et al. Soil tillage affects soybean growth and promotes heavy metal accumulation in seeds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 216, p. 112191, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112191>.

SCHWALBERT, Raíssa et al. How do native grasses from South America handle zinc excess in the soil? A physiological approach. *Environmental and Experimental Botany*, v. 195, p. 104779, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112191>.

SCOTT, Andrew Jhon; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da et al. Potential phytoremediation of Pampa biome native and invasive grass species cohabiting vineyards contaminated with Cu in Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 56, p. 85376-85388, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21738-1>.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da et al. Spatial variation of herbaceous cover species community in Cu-contaminated vineyards in Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13348-13359, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07851-z>.

SOIL SURVEY STAFF. **Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys**, 2nd ed. US Government Printing Office, Washington DC. 2006.

SONODA, Kent et al. Copper and zinc in vineyard and orchard soils at millimeter vertical resolution. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 958-962, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.486>.

SPARKS, Donald L. Toxic metals in the environment: the role of surfaces. *Elements*, v. 1, n. 4, p. 193-197, 2005.

STRECK, E. V., et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre-RS, EMATER-RS/UFRGS. 107p. 2018.

SUMAN, Jachym et al. Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1476, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01476>.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais** (Vol. 5, p. 174). Porto Alegre: Ufrgs. 1995.

TEODORO, Manuel et al. Seasonal fluctuations of Zn, Pb, As and Cd contents in the biomass of selected grass species growing on contaminated soils: Implications for in situ phytostabilization. **Science of The Total Environment**, v. 703, p. 134710, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134710>.

THIESEN, Leonardo Antonio et al. Subcellular distribution and physiological responses of native and exotic grasses from the Pampa biome subjected to excess manganese. **Chemosphere**, v. 310, p. 136801, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136801>.

TIECHER, Tadeu L. et al. Effects of zinc addition to a copper-contaminated vineyard soil on sorption of Zn by soil and plant physiological responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 109-119, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.016>.

TIECHER, Tadeu L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.026>.

TIECHER, Tadeu L. et al. The interaction of high copper and zinc doses in acid soil changes the physiological state and development of the root system in young grapevines (*Vitis vinifera*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 985-994, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.074>.

TOTHILL, J. C. et al. BOTANAL—a comprehensive sampling and computing procedure for estimating pasture yield and composition. 1. Field sampling. *Tropical Agronomy Technical Memorandum*, v. 78, n. 24, 1992.

TRENTIN, Edicarla et al. Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. **Chemosphere**, v. 226, p. 421-430, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.141>.

TROIAN, Alessandra; FERREIRA, Rosimari Simas; HOFF, Débora Nayar. A vitivinicultura em Santana do Livramento/RS. **Revista Científica Agropampa**, v. 1, n. 1, p. 4-21, 2021.

WANG, Jianqing et al. Changes in micronutrient availability and plant uptake under simulated climate change in winter wheat field. **Journal of Soils and Sediments**, v. 16, p. 2666-2675, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1464-8>.

WEI, Zihan et al. A review on phytoremediation of contaminants in air, water and soil. **Journal of hazardous materials**, v. 403, p. 123658, 2021.

WEIDENHAMER, Jeffrey D.; CALLAWAY, Ragan M. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of chemical ecology**, v. 36, p. 59-69, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9735-0>.

WOCH, Marcin W.; KAPUSTA, Paweł; STEFANOWICZ, Anna M. Variation in dry grassland communities along a heavy metals gradient. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 80-90, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1569-7>.

XIAO, Zehua et al. Effects of exogenous manganese on its plant growth, subcellular distribution, chemical forms, physiological and biochemical traits in *Cleome viscosa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p. 110696, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110696>.

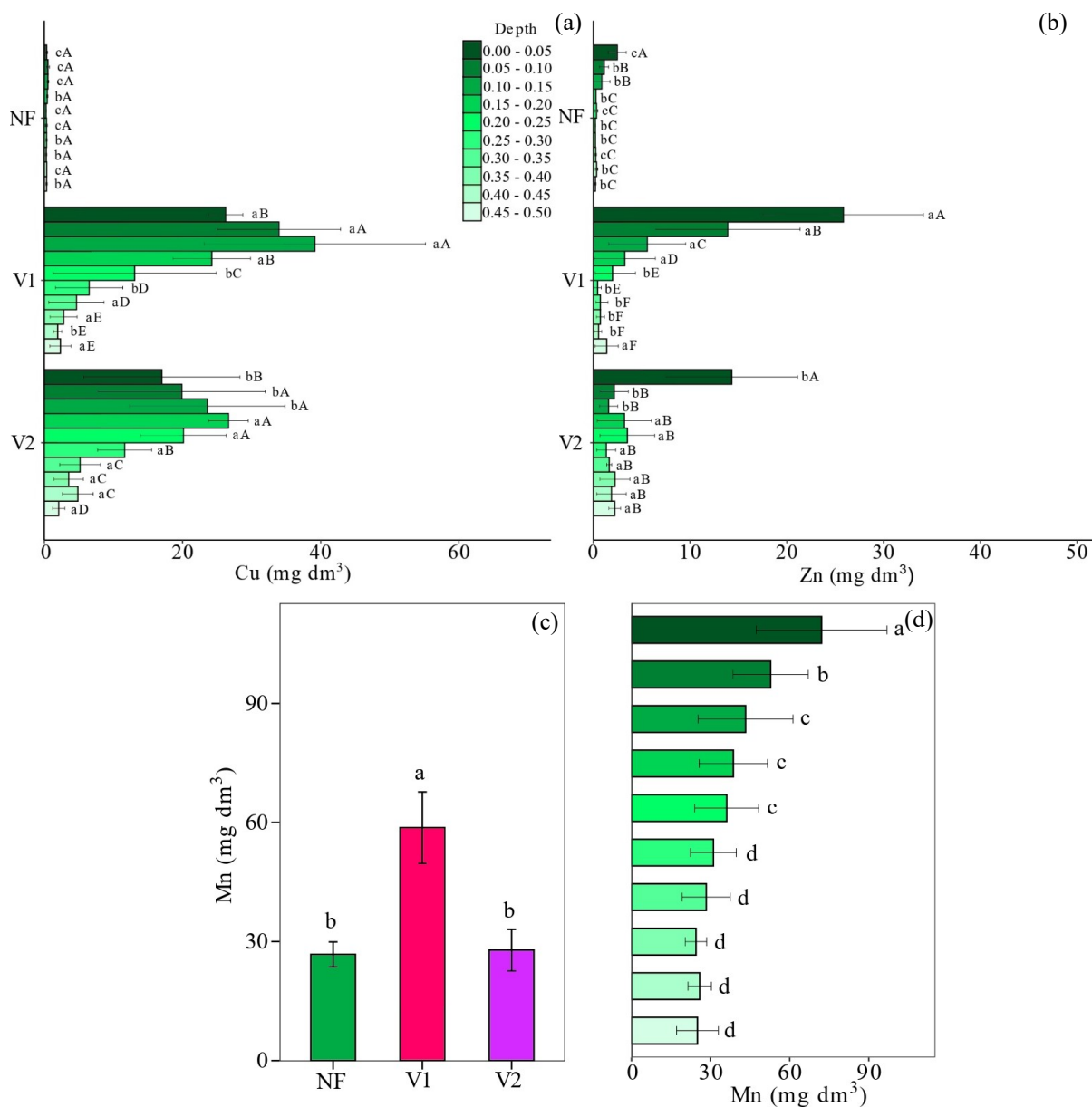
YAN, An et al. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 359, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>.

YOON, Joonki et al. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the total environment**, v. 368, n. 2-3, p. 456-464, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>.

YOTOVA, Galina et al. Phytoavailability of potentially toxic elements from industrially contaminated soils to wild grass. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 317-324, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.077>.

Figures

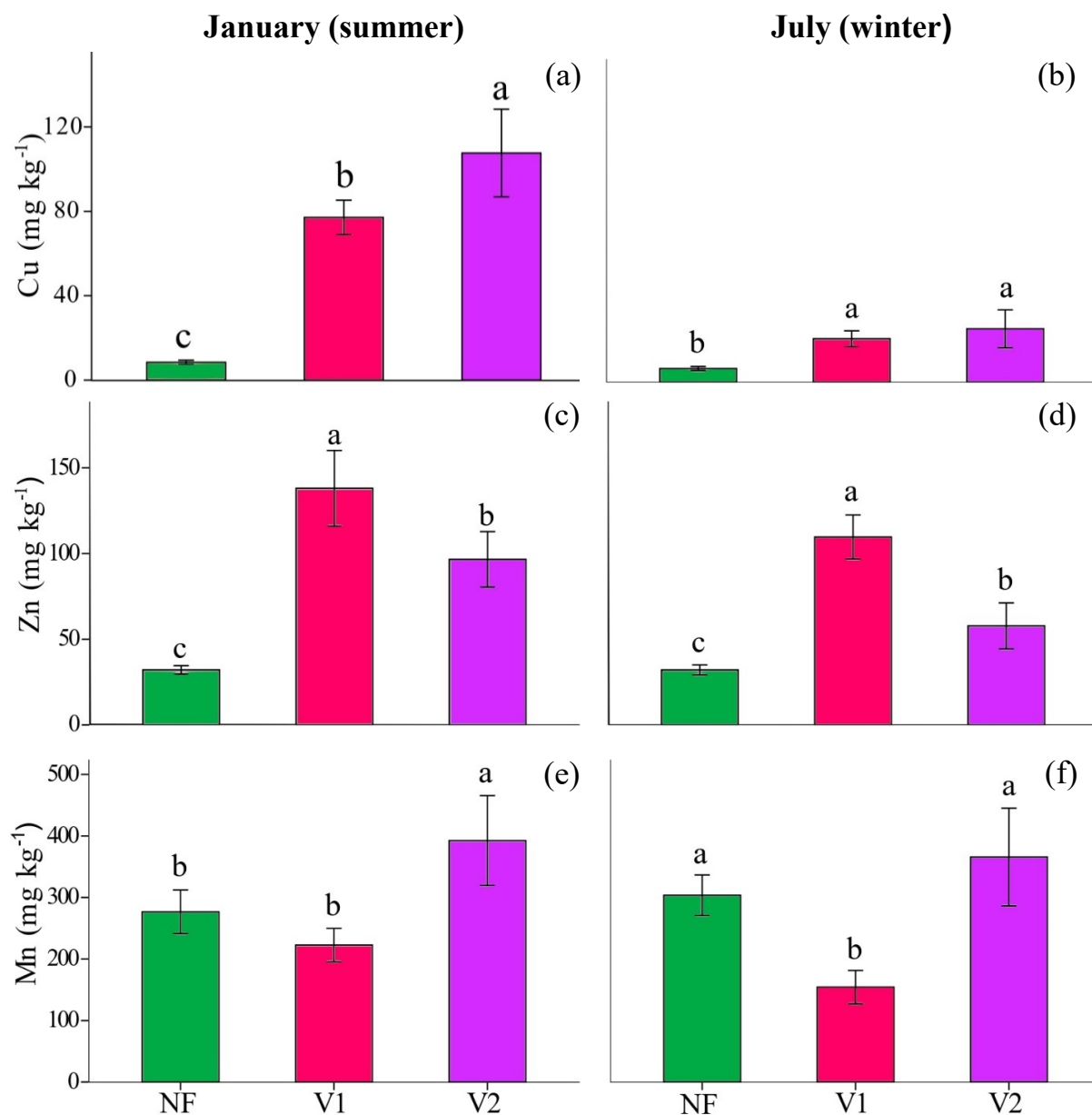
Figure 1 - Cu, Zn and Mn extracted by Mehlich-1 in soil layers in native field (NF), soil from a vineyard with 43 years of cultivation (V1) and soil from a vineyard turned over after 29 years of implantation (V2).



Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: In figures (a) and (b), upper-case letters compare depths within each area and lower-case letters compare each depth between areas. Bars with equal letters do not differ statistically by the Scott-Knott test at 5% ($P < 0.05$).

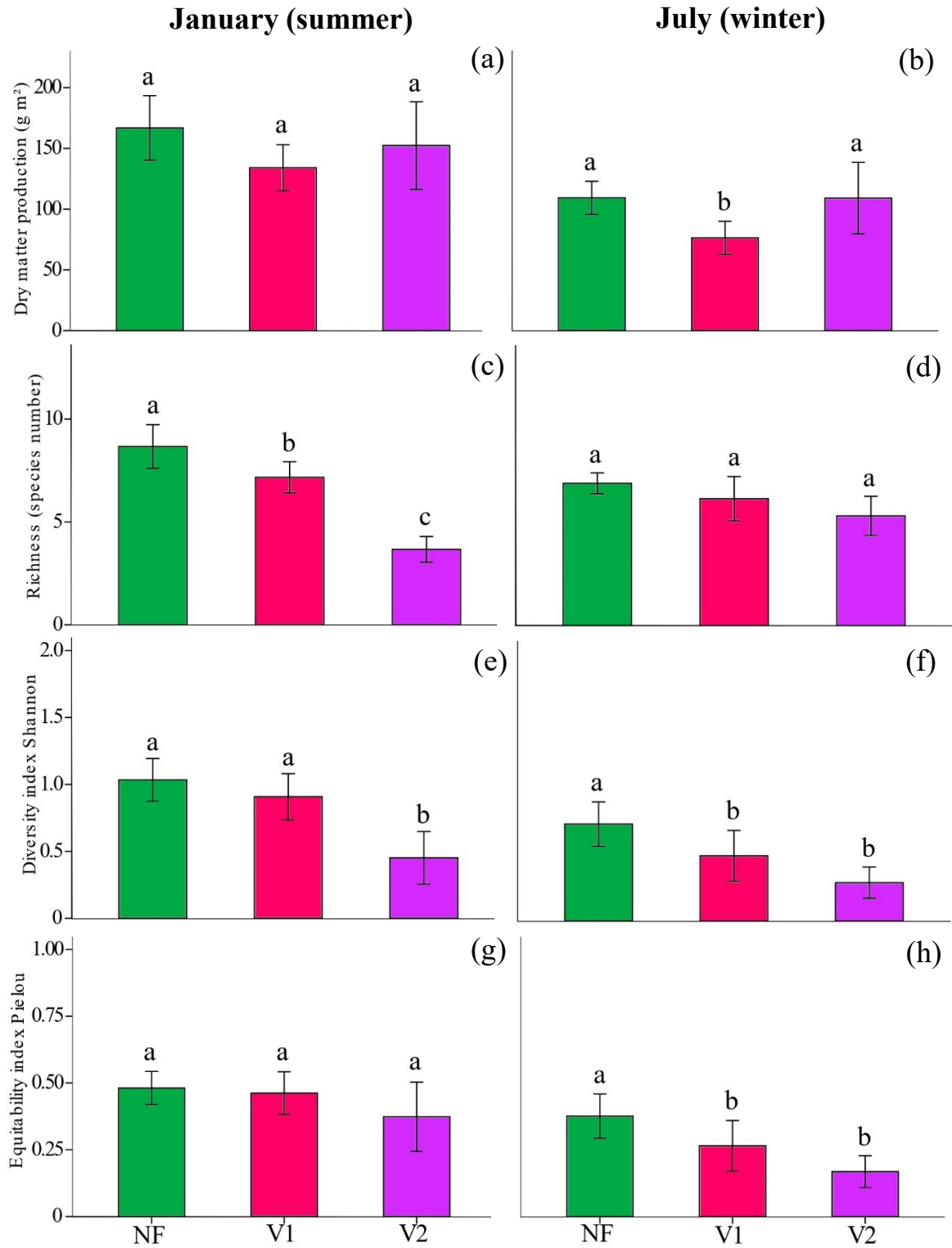
Figure 2. Concentrations of Cu in January (a) and July (b), of Zn in January (c) and July (d) and of Mn in January (e) and July (f), in the shoot of plants collected in an area (0.36 m²) of native field (NF), soil from a vineyard with 43 years of cultivation (V1) and soil from a vineyard turned over after 29 years of implantation (V2).



Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: The same letters do not differ using the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

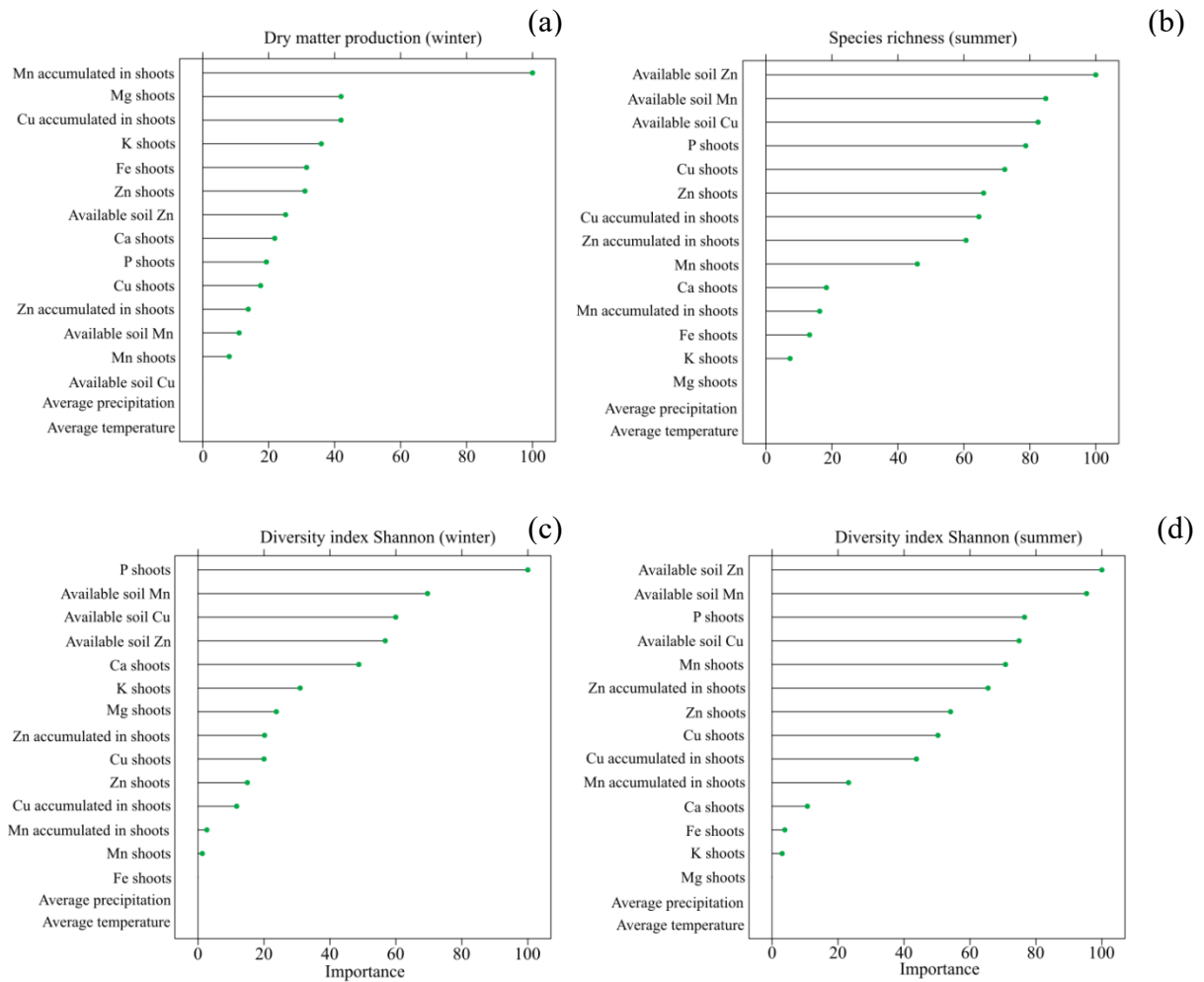
Figure 3. Shoot dry matter in January (a) and July (b), richness in January (c) and July (d), diversity in January (e) and July (f), and equitability in January (g) and July (h). In an area (0.36 m²) of native field (NF), soil from a vineyard with 43 years of cultivation (V1) and soil from a vineyard turned over after 29 years of implantation (V2).



Fonte: elaborado pelos autores

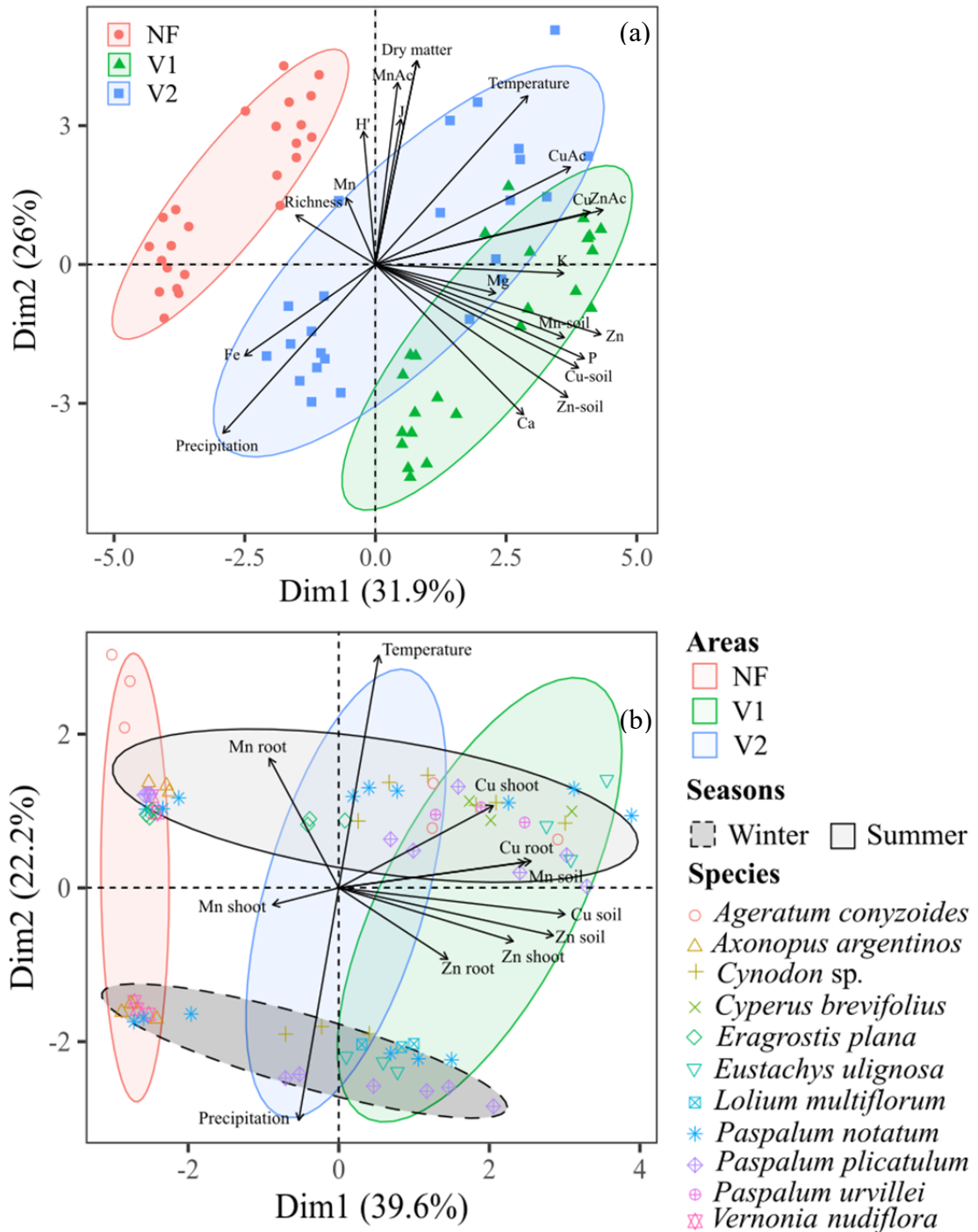
Legenda: Equal letters do not differ by the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

Figure 4. Importance (relative %) of each variable in explaining the variation in dry matter production in winter (a), species richness in summer (b), and difference in Shannon diversity index in winter (c) and summer (d).



Fonte: elaborado pelos autores

Figure 5. (a) Concentrations of Cu, Zn, Mn, Fe, P, Ca, Mg and K present in between rows of vineyards (V1 and V2) and in the native field (NF), average temperature, accumulated precipitation, concentration of Cu, Zn and Mn accumulated in the shoot (CuAc, ZnAc and MnAc), soil-available Cu, Zn and Mn contents (Cu-soil, Zn-soil and Mn-soil), shoot dry matter production, species richness, Shannon diversity index (H') and Pielou index (J). (b) Accumulated precipitation, average temperature, soil-available Cu, Zn and Mn contents (Cu-soil, Zn-soil and Mn-soil), concentration of Cu, Zn and Mn in the shoot (Cu shoot, Zn shoot and Mn shoot) and in the roots (Cu root, Zn root and Mn root) of species with higher biomass contribution in the native field (NF) and in the interrow of vineyards (V1 and V2).



Fonte: elaborado pelos autores

Tables

Table 1. Biomass contribution (%) of the main species in each area (NF, V1 and V2) in the two evaluation periods (summer and winter)

	NF		V1		V2	
	Species	%	Species	%	Species	%
January (summer)	<i>Axonopus argentinus</i>	51.32	<i>Paspalum notatum</i>	41.66	<i>Paspalum plicatulum</i>	66.15
	<i>Paspalum notatum</i>	15.87	<i>Cynodon</i> sp.	13.20	<i>Cynodon</i> sp.	22.81
	<i>Paspalum plicatulum</i>	9.38	<i>Eustachys uliginosa</i>	10.26	<i>Paspalum notatum</i>	6.53
	<i>Ageratum conyzoides</i>	6.70	<i>Cyperus brevifolius</i>	9.59	<i>Eragrostis plana</i>	2.43
	<i>Vernonia nudiflora</i>	6.46	<i>Paspalum plicatulum</i>	9.48		
	<i>Eragrostis plana</i>	3.94	<i>Paspalum urvillei</i>	8.68		
			<i>Ageratum conyzoides</i>	2.38		
July (winter)	<i>Axonopus argentinus</i>	64.93	<i>Lolium multiflorum</i>	84.13	<i>Paspalum plicatulum</i>	93.35
	<i>Paspalum notatum</i>	19.90	<i>Paspalum notatum</i>	5.66	<i>Cynodon</i> sp.	2.40
	<i>Andropogon lateralis</i>	6.75	<i>Eustachys uliginosa</i>	5.46		
	<i>Vernonia nudiflora</i>	3.58				

Fonte: elaborado pelos autores

Table 2. Concentrations of Cu, Zn and Mn in the shoot and roots of the main species in each area in January (summer).

Species January (summer)	Cu (mg kg ⁻¹)					
	NF		V1		V2	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
<i>Ageratum conyzoides</i>	16.38a	15.59c	46.04a	30.67d	nf	nf
<i>Axonopus argentinus</i>	8.24b	31.61b	nf	nf	nf	nf
<i>Cynodon</i> sp.	⁽¹⁾ nf	nf	40.96a	109.86b	58.95a	91.78a
<i>Cyperus brevifolius</i>	nf	nf	41.11a	104.75b	nf	nf
<i>Eragrostis plana</i>	5.10b	5.97c	nf	nf	34.61a	46.38b
<i>Eustachys uliginosa</i>	nf	nf	47.70a	124.12b	nf	nf
<i>Paspalum notatum</i>	8.87b	38.95a	43.29a	172.68a	49.43a	92.69a
<i>Paspalum plicatulum</i>	10.27b	22.16b	44.74a	84.48c	61.13a	65.22b
<i>Paspalum urvillei</i>	nf	nf	16.32b	129.34b	nf	nf
<i>Vernonia nudiflora</i>	10.65b	14.80c	nf	nf	nf	nf
Species January (summer)	Zn (mg kg ⁻¹)					
	NF		V1		V2	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
<i>Ageratum conyzoides</i>	47.49a	39.77c	152.64a	70.85c	nf	nf
<i>Axonopus argentinus</i>	66.15a	91.93b	nf	nf	nf	nf
<i>Cynodon</i> sp.	nf	nf	107.96b	150.51b	111.30b	121.22b
<i>Cyperus brevifolius</i>	nf	nf	94.73b	129.59b	ne	ne
<i>Eragrostis plana</i>	39.29a	36.10c	nf	nf	82.02b	118.40b
<i>Eustachys uliginosa</i>	nf	nf	210.74a	164.62b	nf	nf
<i>Paspalum notatum</i>	58.58a	20.54d	159.38a	79.86c	98.12b	122.17b
<i>Paspalum plicatulum</i>	47.92a	152.15a	182.77a	476.66a	139.31a	305.37a
<i>Paspalum urvillei</i>	nf	nf	81.03b	121.84b	nf	nf
<i>Vernonia nudiflora</i>	21.67a	16.06d	nf	nf	nf	nf
Species January (summer)	Mn (mg kg ⁻¹)					
	NF		V1		V2	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
<i>Ageratum conyzoides</i>	188.22c	399.46a	186.65b	110.12a	nf	nf
<i>Axonopus argentinus</i>	311.47b	244.44b	nf	nf	nf	nf
<i>Cynodon</i> sp.	nf	nf	78.27d	133.78a	174.38b	120.28a

<i>Cyperus brevifolius</i>	nf	nf	78.35d	102.27a	nf	nf
<i>Eragrostis plana</i>	140.34d	108.71c	nf	nf	108.20b	89.30a
<i>Eustachys ulignosa</i>	nf	nf	137.78c	146.53a	nf	nf
<i>Paspalum notatum</i>	348.63b	116.11c	176.51b	148.73a	83.42b	141.23a
<i>Paspalum plicatulum</i>	417.52a	231.78b	357.22a	111.28a	325.32a	144.78a
<i>Paspalum urvillei</i>	nf	nf	73.33d	154.88a	nf	nf
<i>Vernonia nudiflora</i>	104.38d	99.80c	nf	nf	nf	nf

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ⁽¹⁾nf= species not found in the area. Equal letters in the column within each area did not differ by the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

Table 3. Concentrations of Cu, Zn and Mn in the shoot and roots of the main species in each area in July (winter).

Species July (winter)	Cu (mg kg ⁻¹)					
	NF		V1		V2	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
<i>Axonopus argentinus</i>	6.97b	32.68a	nf	nf	nf	nf
<i>Cynodon sp.</i>	⁽¹⁾ nf	nf	nf	nf	26.16a	79.59a
<i>Eustachys ulignosa</i>	nf	nf	12.94c	39.80b	nf	nf
<i>Lolium multiflorum</i>	nf	nf	18.38b	80.67a	nf	nf
<i>Paspalum notatum</i>	8.26b	48.45a	14.83c	75.76a	nf	nf
<i>Paspalum plicatulum</i>	nf	nf	25.45a	70.68a	12.53b	53.33a
<i>Vernonia nudiflora</i>	22.59a	13.45a	nf	nf	nf	nf
Species July (winter)	Zn (mg kg ⁻¹)					
	NF		V1		V2	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
<i>Axonopus argentinus</i>	69.91b	27.84a	nf	nf	nf	nf
<i>Cynodon sp.</i>	nf	nf	nf	nf	85.91a	72.48b
<i>Eustachys ulignosa</i>	nf	nf	126.86c	172.51b	nf	nf
<i>Lolium multiflorum</i>	nf	nf	81.53d	163.76b	nf	nf
<i>Paspalum notatum</i>	113.41a	26.37a	170.46b	63.23c	nf	nf
<i>Paspalum plicatulum</i>	nf	nf	185.18a	580.69a	95.22a	412.21a
<i>Vernonia nudiflora</i>	57.74b	20.43a	nf	nf	nf	nf
Species July (winter)	Mn (mg kg ⁻¹)					
	NF		V1		V2	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
<i>Axonopus argentinus</i>	264.01a	138.13a	nf	nf	nf	nf
<i>Cynodon sp.</i>	nf	nf	nf	nf	63.07b	45.20b
<i>Eustachys ulignosa</i>	nf	nf	147.88b	90.38b	nf	nf
<i>Lolium multiflorum</i>	nf	nf	78.02c	77.76b	nf	nf
<i>Paspalum notatum</i>	382.09a	143.91a	48.96c	70.52b	nf	nf
<i>Paspalum plicatulum</i>	nf	nf	443.11a	139.77a	209.67a	73.58a
<i>Vernonia nudiflora</i>	243.58a	98.40b	nf	nf	nf	nf

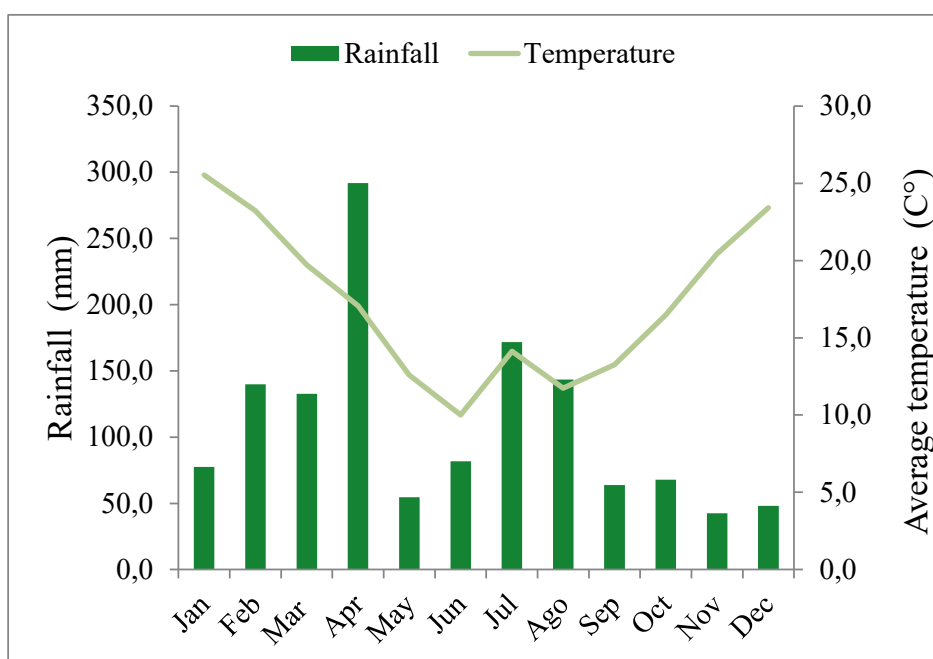
Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ⁽¹⁾nf= species not found in the area. Equal letters in the column within each area did not differ by the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

Table 4. Translocation factor (TF) and bioconcentration factor (BCF) in the species with the highest biomass contribution in the vineyards.

		Species January (summer)					
Species	Cu		Zn		Mn		
	TF	BCF	TF	BCF	TF	BCF	
V1	<i>Ageratum conyzoides</i>	1.53	1.03	2.04	5.63	1.69	1.60
	<i>Cynodon</i> sp.	0.37	3.58	0.73	12.22	0.59	1.60
	<i>Cyperus brevifolius</i>	0.39	3.37	0.73	10.72	0.76	1.30
	<i>Eustachys uliginosa</i>	0.37	4.16	1.39	13.70	0.97	1.75
	<i>Paspalum notatum</i>	0.25	5.70	2.00	6.66	1.19	1.78
	<i>Paspalum plicatulum</i>	0.53	2.76	0.39	39.04	3.21	1.37
	<i>Paspalum urvillei</i>	0.13	4.21	0.66	10.00	0.47	1.83
V2	<i>Cynodon</i> sp.	0.64	4.79	0.95	24.65	1.45	3.93
	<i>Eragrostis plana</i>	0.75	2.15	0.69	24.51	1.21	2.96
	<i>Paspalum notatum</i>	0.56	4.24	0.81	25.32	0.60	4.64
	<i>Paspalum plicatulum</i>	0.94	3.16	0.47	69.93	2.25	4.69
		Species July (winter)					
V1	<i>Eustachys uliginosa</i>	0.33	1.66	0.74	13.81	1.64	1.42
	<i>Lolium multiflorum</i>	0.23	3.37	0.50	13.20	1.10	1.16
	<i>Paspalum notatum</i>	0.20	3.19	2.70	5.13	0.69	1.13
V2	<i>Cynodon</i> sp.	0.34	3.22	1.20	14.03	1.44	1.38
	<i>Paspalum plicatulum</i>	0.24	2.14	0.23	79.84	2.85	2.30

Fonte: elaborado pelos autores

Supplementary material**Figure S1.** Average temperature and precipitation in the municipality of Santana do Livramento, Rio Grande do Sul, Brazil, in the year 2022.

Fonte: adaptado de INMET

Table S1. Characterization of soils in native field (NF), vineyard 1 (V1) and vineyard 2 (V2).

	NF	V1	V2
Year of implementation / reimplementation	—	1979	1977/ 2006
Planted area (ha ⁻¹)	—	2.04	6.51
Spacing (m)	—	3.5 x 2	3 x 2
Cultivars	—	Sauvignon blanc	Gewurztraminer
Clay (g kg ⁻¹)	49.29	69.83	49.54
Sand (g kg ⁻¹)	893.98	849.18	915.26
Soil organic matter (%)	0.74	0.85	0.39
pH in H ₂ O (relation 1:1)	5.35	5.94	6.55
Available P by Mehlich-1 (mg dm ³)	3.68	22.62	38.07
Available K by Mehlich-1 (mg dm ³)	288	246.67	406.67
Exchangeable Ca (cmol _c dm ³)	0.91	1.39	0.81
Exchangeable Mg (cmol _c dm ³)	0.29	0.13	0.03
Fe (extracted by EDTA) (mg dm ³)	29.43	29.45	18.37
Cu (extracted by Mehlich-1) (mg dm ³)	1.45	31.10	21.15
Cu (extracted by EDTA) (mg dm ³)	1.25	35.36	22.28
Zn (extracted by Mehlich-1) (mg dm ³)	1.95	7.95	3.86
Zn (extracted by EDTA) (mg dm ³)	1.42	7.08	4.07
Mn (extracted by Mehlich-1) (mg dm ³)	75.99	89.23	49.43
Mn (extracted by EDTA) (mg dm ³)	33.99	71.70	26.76
CEC (pH _{7.0}) (cmol _c kg ⁻¹)	6.20	4.72	2.97

Fonte: elaborado pelos autores

Table S2. Amount of Cu, Zn, and Mn accumulated in the shoot of plants collected in native field (NF), soil from a vineyard with 43 years of cultivation (V1), and soil from a vineyard turned over after 29 years of implantation (V2).

Nutrient (mg m ²)	NF	V1		V2
		January (summer)		
Accumulated amount of Cu (mg m ²)	1.39c	10.33b		16.48a
Accumulated amount of Zn (mg m ²)	32.12c	138.08a		96.61b
Accumulated amount of Mn (mg m ²)	45.60a	29.54b		58.28a
July (winter)				
Accumulated amount of Cu (mg m ²)	0.73c	1.63b		2.62a
Accumulated amount of Zn (mg m ²)	3.54c	8.46a		5.97b
Accumulated amount of Mn (mg m ²)	32.90a	11.80b		37.63a

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: The same letters in the row do not differ by the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

Table S3. Concentrations of P, K, Ca, Mg and Fe in the shoot of plants collected in an area (0.36 m²) of native field (NF), soil from a vineyard with 43 years of cultivation (V1) and soil from a vineyard turned over after 29 years of implantation (V2).

Nutrient	NF	V1		V2
		January (summer)		
P (g kg ⁻¹)	1.49c	2.86b		3.31a
K (g kg ⁻¹)	13.68a	14.95a		14.35a
Ca (g kg ⁻¹)	3.63b	6.37a		5.42a
Mg (g kg ⁻¹)	1.97b	2.52a		2.14b
Fe (mg kg ⁻¹)	153.25b	214.01a		145.38b
July (winter)				
P (g kg ⁻¹)	1.09c	3.47a		2.29b
K (g kg ⁻¹)	5.04b	17.37a		6.17b
Ca (g kg ⁻¹)	3.41b	7.13a		6.40a
Mg (g kg ⁻¹)	1.76a	2.12a		2.08a
Fe (mg kg ⁻¹)	364.52a	243.22b		272.48b

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: The same letters in the row do not differ by the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

Table S4. Biomass contribution (%), of the exotic species in each area (NF, V1 and V2) in the two evaluation periods (summer and winter).

Species	January (summer)			July (winter)		
	NF	V1	V2	NF	V1	V2
<i>Cynodon sp.</i>	⁽¹⁾ nf	13.20	22.81	nf	nf	2.40
<i>Eragrostis plana</i>	3.94	nf	2.43	nf	nf	nf
<i>Lolium multiflorum</i>	nf	nf	nf	nf	84.13	nf

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ⁽¹⁾ nf= species not found in the area.

Table S5. Cu, Zn and Mn contents accumulated in the shoot in species with higher biomass contribution in summer and winter.

	Species January (summer)	Shoot dry matter (g m ²)	Accumulated amount in shoot (g ha ⁻¹)		
			Cu	Zn	Mn
NF	<i>Ageratum conyzoides</i>	11.52	1.81b	5.44b	21.28c
	<i>Axonopus argentinus</i>	88.22	7.30a	62.84a	276.07a
	<i>Eragrostis plana</i>	6.77	0.35b	2.67b	9.62c
	<i>Paspalum notatum</i>	27.28	2.42b	15.76b	92.89b
	<i>Paspalum plicatulum</i>	16.12	1.66b	7.61b	67.06b
	<i>Vernonia nudiflora</i>	11.11	1.16b	2.33b	11.97c
V1	<i>Ageratum conyzoides</i>	3.19	1.47c	4.86c	5.95c
	<i>Cynodon sp.</i>	17.70	6.99b	18.44b	13.74c
	<i>Cyperus brevifolius</i>	12.86	5.75b	12.21c	11.08c
	<i>Eustachys uliginosa</i>	13.75	6.38b	28.65b	18.67c
	<i>Paspalum notatum</i>	55.85	24.45a	93.11a	103.20a
	<i>Paspalum plicatulum</i>	12.71	5.67b	23.21b	45.39b
V2	<i>Paspalum urvillei</i>	11.64	1.90c	9.42c	8.53c
	<i>Cynodon sp.</i>	34.76	20.39b	38.81b	57.65b
	<i>Eragrostis plana</i>	3.70	1.28b	3.04b	4.01b
	<i>Paspalum notatum</i>	9.35	4.90b	9.75b	8.27b
	<i>Paspalum plicatulum</i>	100.82	69.29a	184.19a	365.31a
	Species July (winter)	Shoot dry matter (g m ²)	Accumulated amount in shoot (g ha ⁻¹)		
			Cu	Zn	Mn
NF	<i>Axonopus argentinus</i>	70.97	5.04a	52.37a	181.00a
	<i>Paspalum notatum</i>	21.75	1.80b	24.57b	82.03b
	<i>Vernonia nudiflora</i>	4.00	0.89b	2.31b	9.88c
V1	<i>Eustachys uliginosa</i>	4.53	0.58b	5.76b	6.60b
	<i>Lolium multiflorum</i>	60.52	11.07a	48.28a	45.38a
	<i>Paspalum notatum</i>	3.69	0.53b	6.34b	1.78b
V2	<i>Cynodon sp.</i>	2.62	0.69b	2.25b	1.66b
	<i>Paspalum plicatulum</i>	101.80	11.65a	100.60a	211.57a

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: Equal letters in the column within each area do not differ by the Scott-Knott test ($p < 0.05$).

2.3 ARTIGO 2

Potencial de fitoestabilização e mecanismos de tolerância de espécies nativas do bioma Pampa em áreas com elevados teores de Cu, Zn e Mn no solo

Resumo

Na vitivinicultura realizada no bioma Pampa da América do Sul é possível preservar as espécies nativas do bioma no interior de vinhedos. No entanto, os tratamentos fitossanitários

aplicados em videiras podem incrementar os teores de cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em solos e causar fitotoxidez às plantas. Porém, plantas nativas do bioma Pampa, com maiores contribuições de biomassa em vinhedos, podem possuir mecanismos de tolerância para se desenvolverem nessas áreas com excesso de metais. Assim, conhecer esses mecanismos pode ajudar na seleção de espécies mais adequadas para a fitoestabilização de Cu, Zn e Mn em solos contaminados. O estudo objetivou (a) verificar se maiores teores de Cu, Zn e Mn no solo aumentam as concentrações desses elementos em diferentes órgãos das espécies nativas do bioma Pampa, *Axonopus compressus*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*; (b) identificar a(s) variável(s) com maior importância para explicar as alterações na massa seca dessas plantas, e (c) verificar os mecanismos de tolerância utilizados por essas espécies nativas do bioma Pampa, para tolerar altos teores de Cu, Zn e Mn no solo, bem como, seu potencial de fitoestabilização. Três espécies nativas do bioma Pampa, *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* foram cultivadas em solo de vinhedo com altos teores de Cu, Zn e Mn e em solo de campo nativo, sem cultivo agrícola. A massa seca, quantidade acumulada de Cu, Zn e Mn, e concentrações de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn em folhas, caule e raízes; concentrações e distribuição subcelular de Cu, Zn e Mn, valores de pigmentos fotossintéticos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) em folhas e raízes foram determinadas. As plantas que cresceram no solo do vinhedo acumularam as maiores quantidades de Cu, Zn e Mn em folhas, caule e raízes, além disso, em alguns órgãos o Mn acumulado foi menor. A parede celular e o vacúolo desempenharam um importante mecanismo para desintoxicação dos metais. As concentrações de pigmentos fotossintéticos foram menores nas espécies *A. compressus* e *P. notatum* cultivadas no solo do vinhedo. Os metais causaram estresse oxidativo em raízes e as enzimas antioxidantes SOD e POD aumentaram a sua atividade em folhas e raízes. As três espécies diminuíram a produção de massa seca na parte aérea. A concentração de Mn acumulada em raízes é o fator mais importante para explicar a variação na produção de massa seca. As espécies *P. notatum* e *P. plicatulum* são as mais tolerantes e são as mais indicadas para serem utilizadas para a fitoestabilização do Cu, Zn e Mn em vinhedos no bioma Pampa.

Palavras-chave: Metais pesados; fitotoxidez; vitivinicultura; fitorremediação.

2.3.1 Introdução

O bioma Pampa está localizado na América do Sul e possui uma grande biodiversidade de vegetação campestre (ANDRADE et al., 2023). A vitivinicultura é uma

atividade agrícola presente nesse bioma, porém causa menores impactos ao bioma, pois não altera drasticamente a paisagem (CHOMENKO; BENCKE, 2016). Isso porque as videiras são conduzidas em espaldeira (SARMENTO, 2016), o que permite a entrada de luz e manutenção de espécies nativas do bioma Pampa na entrelinha de cultivo. Porém, os tratamentos fitossanitários realizados na vitivinicultura podem aumentar os teores de metais pesados como cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) no solo, o que é observado em vários países pelo mundo (KOMÁREK et al., 2010; BRUNETTO et al., 2018; BEYGI; JALALI, 2019; CAMPILLO-CORA et al., 2019; SONODA et al., 2019).

O Cu, Zn e Mn são essenciais para o desenvolvimento de plantas, por outro lado, elevados teores desses metais no tecido podem causar toxidez às plantas (KABATA-PENDIAS, 2011; MARSCHNER, 2012). Na região Sul do Brasil, solos com teores maiores que 0,4 mg dm³ de Cu (Mehlich-1), 0,5 mg dm³ de Zn (Mehlich-1) e 0,5 mg dm³ de Mn (KCl 1 mol L⁻¹) são considerados altos para a maioria das culturas (CQFS-RS/SC, 2016). Os efeitos da toxidez causados pelo Cu, Zn e Mn podem ser observados através de alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas (TIECHER et al., 2016; TRENTIN et al., 2019; XIAO et al., 2020; HAMMERSCHMITT et al., 2020; YADAV et al., 2021; SCHWALBERT et al., 2021). Também, o excesso de metais pesados pode causar desbalanços nutricionais (KABATA-PENDIAS, 2011; MARSCHNER, 2012) e diminuir a concentração de pigmentos fotossintéticos em plantas, o que pode reduzir a taxa fotossintética (SILVA et al., 2022; MARQUES et al., 2023). Ainda, podem causar estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o peróxido (H₂O₂) (SILVA et al., 2022). Assim, todas essas alterações no metabolismo das plantas podem causar menor crescimento e produção de biomassa (SILVA et al., 2022; MARQUES et al., 2023) e, em casos mais extremos, até a morte da planta (SILVA et al., 2022).

Diante do estresse causado pelo excesso dos metais, as plantas mais tolerantes podem utilizar diferentes mecanismos de tolerância para diminuir a toxicidade, absorção e mobilidade dos metais. As plantas cultivadas com altas concentrações de metais, como Cu, Zn e Mn, podem diminuir a translocação dos metais para a parte aérea, para evitar que altas concentrações de metais cheguem principalmente até as folhas onde os efeitos dos metais podem ser mais nocivos (TIECHER et al., 2017; HAMMERSCHMITT et al., 2020; HE et al., 2022; MARQUES et al., 2023). Mas também, para manter o metabolismo celular ideal, as plantas podem armazenar o excesso do Cu, Zn e Mn em áreas metabolicamente menos ativas como parede celular e vacúolo (ALEJANDRO et al., 2020; BASHIR et al., 2021; HE et al., 2022; XIAO et al., 2020). Além disso, para diminuir o estresse oxidativo causado pelo

excesso dos metais, as plantas podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) (TIECHER et al., 2016; BALAFREJ et al., 2020; XIAO et al., 2020; KUMAR et al., 2021; MARQUES et al., 2023). Porém, não são suficientemente conhecidos os mecanismos de tolerância em plantas nativas do bioma Pampa quando cultivadas em solos com excesso de Cu, Zn e Mn.

A manutenção das espécies nativas do bioma Pampa desempenha importantes funções nessas áreas, na proteção física do solo e na ciclagem de nutrientes (DE CONTI et al., 2019). Isso porque o solo dessas áreas são caracterizado por baixos teores de argila, matéria orgânica e capacidade de troca de cátions (CTC) (COUTO et al., 2016; SILVA et al., 2020). Além disso, essas espécies podem diminuir a disponibilidade do Cu, Zn e Mn às videiras, através da técnica de fitorremediação (DE CONTI et al., 2021; SCHWALBERT et al., 2022; THIESEN et al., 2023). Normalmente, os processos de fitoextração e fitoestabilização são os mais utilizados para a fitorremediação de solos com elevados teores de metais pesados (GARBUSU; ALKORTA, 2003; PINTO et al., 2016). Porém, diante das características físicas e químicas dos solos da região do bioma Pampa o processo de fitoestabilização pode ser o mais adequado (TEODORO et al., 2020), já que, diferentemente da fitoextração, na fitoestabilização as plantas não são extraídas da área (YAN et al., 2020). Porém, poucos estudos avaliaram o comportamento dessas espécies em solos com aumento simultâneo dos teores de Cu, Zn e Mn.

A fitoestabilização pode ser uma boa opção para diminuir os metais disponíveis no solo de vinhedos. Mas, para uma melhor eficiência da técnica é importante selecionar espécies adequadas, que sejam eficazes e não causem prejuízos ao ecossistema (WEI et al., 2021). Nesse sentido, as espécies locais podem ser mais adequadas para serem utilizadas na fitoestabilização, para obter o maior crescimento e também o desenvolvimento de mecanismos de tolerância pelas espécies (WEI et al., 2021). Mas também, as espécies que permanecem nas áreas são resultado de uma pressão ambiental para seleção de mecanismos de tolerância para favorecer a permanência dessas espécies nas áreas contaminadas (MATANZAS et al., 2021). Além disso, as espécies nativas do bioma devem ser utilizadas preferencialmente, pois espécies exóticas podem, por exemplo, através de exsudatos radiculares, modificar a química do solo rizosférico, as relações entre as plantas e microrganismos e assim alterar as funções do ecossistema (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). Espécies nativas do bioma Pampa *Paspalum plicatulum* e *Paspalum notatum* possuem grande contribuição de biomassa aérea em vinhedos (SILVA et al., 2020),

enquanto que espécies do gênero *Axonopus* sp. possuem maior contribuição de biomassa em áreas de campo nativo, em relação aos vinhedos (SILVA et al., 2020, 2022).

Conhecer espécies nativas que podem tolerar altos teores de metais é importante para selecionar possíveis candidatas a fitoestabilização, ou até mesmo serem utilizadas como espécies estratégicas para futuras restaurações dessas áreas. Além disso, conhecer os mecanismos de tolerância utilizados por elas pode ajudar na seleção das espécies mais adequadas, mas também esses mecanismos poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético de espécies futuramente (BASHIR et al., 2021). O estudo objetivou (a) verificar se maiores teores de Cu, Zn e Mn no solo aumentam as concentrações desses elementos em diferentes órgãos das espécies nativas do bioma Pampa, *Axonopus compressus*, *Paspalum notatum* e *Paspalum plicatulum*, (b) identificar a(s) variável(s) com maior importância para explicar as alterações na biomassa dessas plantas, e (c) verificar os mecanismos de tolerância utilizados por essas espécies nativas do bioma Pampa, para tolerar altos teores de Cu, Zn e Mn no solo, bem como, seu potencial de fitoestabilização.

2.3.2 Material e Métodos

2.3.2.1 Descrição da Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante os meses de fevereiro e junho de 2022. O solo foi coletado em uma área de vinhedo (VN) comercial no município de Santana do Livramento, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O vinhedo foi implantado no ano de 1979 e possuía elevados teores de Cu, Zn e Mn. Como testemunha foi coletado solo em uma área adjacente ao vinhedo, em uma área de campo nativo (NF), sem cultivo agrícola. O solo nos dois locais foi classificado como *Typical Hapludalf* (SOIL SURVEY STAFF, 2006). As características físicas e químicas do solo podem ser observadas na Tabela 1. Foram utilizadas três espécies da família Poaceae e nativas do bioma Pampa, *Paspalum plicatulum* Michx, *Paspalum notatum* Flügge e *Axonopus compressus* (Sw.) P. Beauv. O experimento foi conduzido durante 110 dias, em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Para possibilitar a condução do experimento por esse período, foram adicionadas duas vezes 10 mL de solução nutritiva por repetição (HOAGLAND; ARNON, 1950), sem a adição de Cu, Zn e Mn, com 50% da força e pH 5,5, a primeira aos 45 e a segunda aos 58 dias após o plantio das mudas.

2.3.2.2 *Rizobox e acondicionamento do solo*

O solo foi coletado em duas áreas, na entrelinha de um VN com 44 anos de cultivo e a segunda em uma área de NF. As amostras de solo foram coletadas indeformadas, para que as camadas do solo fossem mais parecidas possíveis com as condições reais de campo. Para isso, foi utilizado uma “forma” de metal com as dimensões de cada repetição. Uma trincheira foi aberta em cada área e destacada as dimensões de cada forma na trincheira (Material suplementar, figura S1a). A forma foi pressionada ao solo (Material suplementar, figura S1b). Após o solo foi retirado (Material suplementar, figura S1c). Em seguida, foi feita uma limpeza do solo e, posteriormente, o solo foi acondicionado no rizobox (Material suplementar, figura S1d). Após a coleta das duas repetições em cada rizobox, ele foi fechado com acrílico e parafusos (Material suplementar, figura S1e).

Os rizobox foram fabricados em madeira e acrílico com dimensões de 0,5 m de comprimento, 0,45 m de altura e 0,045 m de profundidade. Cada rizobox teve seu comprimento dividido ao meio para proporcionar duas repetições. Assim, cada repetição possuía dimensões de 0,25 x 0,45 x 0,045 m.

Em casa de vegetação, os rizobox foram acondicionados em suportes com inclinação de 45°. Além disso, após a coleta do solo, os rizobox foram cobertos com plástico escuro durante 75 dias, para evitar a entrada de luz, emergência e sobrevivência de plantas. Após esse período o plástico foi retirado e as duas faces de cada rizobox foram cobertas com papel de alumínio, durante toda a condução do experimento para evitar a entrada de luz. A cada 30 dias os rizobox foram girados, de forma que a face inferior fique na superior, para uma melhor distribuição das raízes.

2.3.2.3 *Coleta, multiplicação e transplante das mudas*

As mudas das três espécies foram coletadas em vinhedos e em áreas adjacentes a eles. Mas todas as mudas de cada espécie foram coletadas no mesmo local. Após as plantas foram lavadas com água, cada perfilho separado e a parte aérea e o sistema radicular padronizados em 6 cm. Em seguida, as mudas foram transplantadas em bandejas plásticas de 15 L contendo areia como substrato e supridas com a solução nutritiva, como sugerido por Marques et al. (2020). As mudas que se desenvolveram, nestas condições, durante 30 dias, foram retiradas da areia. Cada perfilho foi separado novamente e lavado com água destilada. Para a condução do experimento cada perfilho foi mantido com três raízes. O comprimento da parte aérea e raízes foram padronizadas novamente em 6 cm de comprimento. Em seguida, 5 perfilhos foram plantados em cada repetição.

2.3.2.4 *Massa seca e composição nutricional do tecido*

Aos 110 dias após o plantio das mudas, as plantas foram coletadas e separadas em folhas, caule e raízes. Também, as folhas senescentes foram coletadas separadas e consideradas como material senescente. As folhas, caule e raízes foram limpas em água destilada e secas em estufa de ventilação forçada à 65°C até atingir peso constante. A massa seca foi determinada com o auxílio de uma balança de precisão.

As amostras secas de folhas, caule e raízes foram moídas em moinho Wiley, preparadas e submetidas a digestão nitroperclórica (EMBRAPA, 2009). As concentrações de Ca, Mg, Cu, Zn, Mn e Fe no extrato foram determinadas em espectrofotômetro de absorção atômica (AAAnalyst 200, Perkin-Elmer, USA). A concentração de P foi determinada de acordo com Murphy e Riley (1962), usando um espectrofotômetro UV-visível a 882 nm (SF325NM, Bel Engineering, Itália). A concentração de K foi quantificada em espectrofotômetro de chama (Digimed, DM-62, Brasil).

2.3.2.5 *Acúmulo de Cu, Zn e Mn, fator de translocação (FT), fator de bioconcentração (BCF) e índice de tolerância (TI)*

As quantidades de Cu, Zn e Mn acumulados no *P. plicatum*, *P. notatum* e *A. compressus* foram calculadas pela multiplicação das concentrações de metais em folhas, caule e raízes e a massa seca correspondente.

Alguns índices foram calculados às plantas que cresceram no solo do VN. O fator de translocação (FT) é a relação da concentração dos metais na parte aérea e raízes de cada espécie e foi calculado para verificar a capacidade das três espécies translocar os metais, Cu, Zn e Mn das raízes para a parte aérea. O fator de bioconcentração (BCF) é a razão entre a concentração do metal nas raízes e a concentração do metal disponível no solo. O índice de tolerância (TI) é a relação entre a massa seca das plantas inteiras, cultivadas no solo do VN e das plantas cultivadas no solo do NF. O fator foi utilizado para verificar a tolerância das três espécies cultivadas no solo com altos teores de Cu, Zn e Mn.

2.3.2.6 *Fracionamento subcelular do Cu, Zn e Mn em folhas e raízes*

Aos 110 dias do plantio das mudas, amostras de folhas e raízes das três espécies foram coletadas e imediatamente acondicionadas em N₂ líquido, para posterior preparação e fracionamento subcelular dos elementos Cu, Zn e Mn.

Para o fracionamento subcelular foi pesado 1 g de tecido fresco de folhas e 1 g de raízes. O protocolo de Huang et al. (2017), Fu et al. (2013), Wang, Liu e Hu (2016), Zeng et

al. (2011) foi seguido com adaptações. As amostras de tecido congelado foram homogeneizadas em 10 mL de solução tampão contendo Tris – HCl 50 mM (pH7.5), sacarose 250 mM e dithioeritritol 1.0 mM. O extrato homogeneizado foi centrifugado a $300 \times g$ por 5 min a $4^\circ C$, o *pellet* que ficou no fundo do tubo foi considerado a parede celular. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado a $5000 \times g$ por 20 minutos, obtendo-se a fração núcleos e plastídios. A solução sobrenadante da segunda etapa foi centrifugada a $15000 \times g$ por 30 minutos, o residual resultante foi considerado a fração mitocondrial. O sobrenadante restante foi considerado a fração solúvel. Todos os passos foram realizados a $4^\circ C$. Após as frações foram secas em estufa a $70^\circ C$ até peso constante e submetidas a digestão nitroperclórica (3:1, v/v). As concentrações de Cu, Zn e Mn nas diferentes frações foram analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica (AAAnalyst 200, Perkin-Elmer, USA).

2.3.2.7 Pigmentos, estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes

Aos 110 dias após o plantio das mudas, amostras de folhas e raízes foram retiradas. As raízes foram lavadas com água destilada para remover o solo. Após as amostras de folhas e raízes foram imediatamente acondicionadas em N_2 líquido e, posteriormente, armazenadas no ultrafreezer à $-80^\circ C$, até o momento de realização das análises. Os pigmentos em folhas (clorofila *a*, *b*, total (*a+b*) e carotenoides); concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) em folhas e raízes foram determinados.

Para a determinação da concentração de pigmentos, as folhas foram maceradas em N_2 líquido. Posteriormente foi pesado 0,05 g de tecido e incubado com dimethylsulfoxide (DMSO) à $65^\circ C$ até as amostras estarem completamente branqueadas (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). Em um espectrofotômetro foram determinadas as absorbâncias do extrato sobrenadante, nos comprimentos de onda de 470, 645 e 663 nm. Após, através da fórmula de Lichtenthaler (LICHTENTHALER, 1987) foram determinadas as concentrações de clorofila *a*, *b*, total (*a+b*) e de carotenoides.

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada de acordo com Loreto; Velikova (2001). Foi pesado 0,3 g de amostra. Posteriormente ela foi homogeneizada em 1,5 mL de 0,1% (w/v) de TCA. Em seguida, a amostra foi centrifugada à $10.000g$ durante 15 minutos à $4^\circ C$. A concentração de H_2O_2 foi determinada, com uma curva de calibração padrão, por comparação da sua absorbância e 0,5 ml de tampão de fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de KI 1M em 390 nm.

A atividade da enzima SOD foi determinada através da metodologia sugerida por Loreto; Velikova (2001). Foi pesado 0,5 g de tecido. Em seguida, a amostra foi homogeneizada em 3 mL de tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,8), incluindo EDTA 1 mM e 1% de Triton X-100. Posteriormente, a amostra foi centrifugada à 13.000 g durante 20 minutos à 4°C. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe o Nitroblue Tetrazolium (NBT) por fotorredução de 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). A atividade da SOD foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Giannopolitis ; Ries (1977).

A atividade da enzima POD foi determinada através da metodologia proposta por Zeraik et al. (2008). Foram utilizados 1,0 mL de tampão fosfato de potássio com pH 6,5 (100 mmol L⁻¹), 1,0 mL de guaiacol (15 mmol L⁻¹), 1,0 mL de H₂O₂ (3 mmol L⁻¹) e 50 µL do extrato vegetal. A oxidação do guaiacol a tetraguaiacol foi medida através do aumento da absorvância a 470 nm.

2.3.2.8 Análises estatísticas

A distribuição subcelular de Cu, Zn e Mn foi analisada considerando as áreas (NF e VN), as espécies (*P. plicatulum*, *P. notatum* e *A. compressus*) e as frações, sendo trifatorial. Para as demais variáveis foi considerado apenas as áreas e as espécies, sendo bifatorial. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando constatado efeito significativo, as médias foram separadas pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), à 5% de probabilidade de erro. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico ExpDes.pt do software R (R CORE TEAM, 2021).

Para quantificar a importância das variáveis (concentração dos metais Cu, Zn e Mn acumulados em folhas, caule e raízes, bem como, a concentração total na planta) que mais contribuem para explicar a variação da produção de massa seca, um modelo de regressão linear múltipla foi ajustado. O modelo foi implementado no R (R CORE TEAM, 2021), utilizando o pacote *caret* (KUHN, 2016). A partir desse modelo foi calculada a métrica “*variable importance* - VARIMP”, que mostra a importância das variáveis na explicação da variação dos dados. O VARIMP foi implementado utilizando o pacote “*caret*” no software R (KUHN et al., 2016).

Massa seca em folhas (DM_L), caule (DM_S), raízes (DM_R), material senescente (DM_Sen) e total (DM_total); concentrações de Cu, Zn, Mn, Fe, P, Ca, Mg e K em folhas (Cu_L, Zn_L, Mn_L, Fe_L, P_L, Ca_L, Mg_L e K_L), caule (Cu_S, Zn_S, Mn_S, Fe_S, P_S, Ca_S, Mg_S e K_S) e raízes (Cu_R, Zn_R, Mn_R, Fe_R, P_R, Ca_R, Mg_R e K_R);

concentração de clorofila *a* (Chla), *b* (Chlb), total (Chl_total) e carotenoides (Carot); concentração de H₂O₂ em folhas (H₂O₂_L) e raízes (H₂O₂_R); atividade da enzima SOD em folhas (SOD_L) e raízes (SOD_R); atividade da enzima POD em folhas (POD_L) e raízes (POD_R) nas espécies *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* foram submetidos análise de componentes principais (ACP), para explorar a variância dos dados. Isso permitiu a identificação de interações mais complexas entre as variáveis, além de verificar a similaridade de entre o VN e o NF, e as espécies. A ACP foi realizada usando os pacotes ‘FactoMineR’ e ‘factoextra’ do R (CORE TEAM, 2021).

2.3.3 Resultados

2.3.3.1 Massa seca, Cu, Zn e Mn acumulado em órgãos e índices

O *A. compressus*, quando cultivado no solo do VN, apresentou menor massa seca de folhas e o *P. notatum* maior, comparativamente, ao solo do NF (Figura 1a). Além disso, o *P. notatum* quando cultivado no solo do NF apresentou a maior massa seca de folhas em relação às demais espécies (Figura 1a). No entanto, quando cultivadas no solo do VN o *P. plicatulum* apresentou a maior massa seca de folha e o *A. compressus* a menor (Figura 1a). As massas secas de caule de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* foram 29,27, 12,09 e 30,68% menores, respectivamente, quando cultivadas no solo do VN, comparativamente, ao solo do NF (Figura 1b). O *A. compressus* apresentou maior massa seca de caule no solo do NF, e o *P. plicatulum* a menor, no solo do NF e VN (Figura 1b). Para a massa seca de raízes, a interação não foi significativa para os fatores áreas e espécies, mas o *P. plicatulum* apresentou a maior massa seca de raízes e o *A. compressus* a menor, quando cultivado no solo do NF e VN (Figura 1c). Para a massa seca de material senescente, a interação não foi significativa para os fatores áreas e espécies, mas a massa seca de material senescente foi menor quando as plantas foram cultivadas no solo do VN, em relação ao NF, para as três espécies avaliadas (Figura 1d).

Para a quantidade de Cu acumulado em folhas, a interação não foi significativa para os fatores áreas e espécies, além disso, a quantidade de Cu acumulado em folhas das plantas foi igual nas três espécies quando cultivado no solo do NF e VN (Figura 2a). O Cu acumulado nos caules de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, quando cultivadas no solo do VN, foi 2,5, 0,46 e 2,77 vezes maiores, respectivamente, quando comparado ao solo do NF (Figura 2b). O *A. compressus* apresentou a menor e o *P. plicatulum* a maior quantidade de Cu acumulado no caule, quando cultivado no solo do VN (Figura 2b). O Cu acumulado em raízes no *P. notatum* foi maior quando cultivado no solo do VN, comparativamente, ao solo do NF

(Figura 2c). O *A. compressus* acumulou a maior e o *P. plicatum* a menor quantidade de Cu em raízes, quando cultivado no solo do VN (Figura 2c). O Cu acumulado em toda a planta (folhas, caule e raízes) em *A. compressus* não diferiu quando cultivado no solo do NF e VN. No entanto, *A. compressus* foi a espécie que acumulou a maior quantidade de Cu no tecido (Material suplementar, tabela S1). *P. notatum* e *P. plicatum* acumularam 117 e 85%, respectivamente, mais Cu em toda a planta, quando cultivadas no solo do VN, comparativamente, ao solo do NF (Material suplementar, tabela S1).

P. notatum e *P. plicatum* quando cultivadas no solo do VN acumularam 50 e 57% mais Zn em folhas, respectivamente, em relação ao solo do NF (Figura 2d; material suplementar, figura S2). *P. notatum* acumulou a maior quantidade de Zn em folhas, quando cultivada no solo do VN, em relação às demais espécies (Figura 2d). *A. compressus* e *P. plicatum* acumularam 187 e 217% mais de Zn no caule, respectivamente, quando cultivadas no solo do VN, comparativamente, ao solo do NF (Figura 2e; material suplementar, figura S2). *A. compressus* acumulou a menor e o *P. plicatum* a maior quantidade de Zn no caule, quando cultivada no solo VN (Figura 2e). Nas raízes, *A. compressus* e o *P. notatum* acumularam 86 e 329% mais Zn, respectivamente, quando cultivadas no solo do VN, em relação ao solo do NF (Figura 2f; material suplementar, figura S2). Quando cultivadas no solo do VN, *A. compressus* acumulou a maior quantidade de Zn em raízes (Figura 2f). *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatum* acumularam 98, 46 e 148% mais Zn em toda a planta, respectivamente, quando cultivadas no solo do VN, em relação ao NF (Material suplementar, tabela S1). Além disso, no solo do NF e do VN, *A. compressus* acumulou as menores quantidades e o *P. plicatum* as maiores de Zn em toda a planta (Material suplementar, tabela S1).

O maior acúmulo de Mn em folhas foi observado na espécie *P. notatum*, sendo o menor acúmulo verificado em *P. plicatum*, quando cultivados no solo do VN (Figura 2g). O *A. compressus* acumulou a menor quantidade de Mn em folhas, em relação às outras espécies, quando cultivado no solo do NF e VN (Figura 2g). O maior acúmulo de Mn no caule foi observado no *P. notatum*, sendo o menor acúmulo verificado no *P. plicatum*, quando cultivado no solo do VN, em relação ao NF (Figura 2h). O *P. plicatum*, quando cultivado no solo do VN, acumulou a maior quantidade de Mn no caule, em relação às outras espécies (Figura 2h). *A. compressus* e o *P. plicatum* acumularam as menores quantidades de Mn no caule, sendo as maiores observadas no *P. notatum*, quando cultivados no solo do VN, comparativamente ao NF (Figura 2i). Considerando toda a planta, o *P. plicatum* acumulou

as maiores quantidades de Mn no tecido, sendo as menores verificadas no *A. compressus*, quando cultivadas no solo do NF e VN (Material suplementar, tabela S1).

O Mn acumulado em raízes, o Zn no caule e o acúmulo total de Zn foram os fatores mais importante para explicar a variação de massa seca em plantas, quando cultivadas no solo do NF e VN (Figura 3). A maior concentração de Cu foi observada em raízes de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* (TF<1) (Material suplementar, tabela S2). O *A. compressus* apresentou as maiores concentrações de Zn e Mn em raízes (TF<1) (Material suplementar, tabela S2). O *P. notatum* translocou maiores concentrações de Zn e Mn e o *P. plicatulum* de Mn para a parte aérea (TF>1) (Material suplementar, tabela S2). As três espécies possuem BCF maior que um para o Cu, Zn e Mn. O TI foi menor que um para as três espécies, mas o valor do TI foi menor para o *A. compressus* em relação as outras espécies (Material suplementar, tabela S2).

2.3.3.2 Distribuição subcelular do Cu, Zn e Mn em folhas e raízes

Em folhas e raízes de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, mais de 90% do Cu estava na parede celular e fração solúvel (Tabela 2; material suplementar, figura S3). Na fração núcleos e plastídeos e na fração mitocôndria em folhas e raízes não houve diferença entre as espécies, nem entre as áreas NF e VN (Tabela 2). As espécies *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* apresentaram a maior concentração de Cu na parede celular em folhas e raízes, quando cultivadas no solo do VN, comparativamente ao solo do NF (Tabela 2). Além disso, as três espécies avaliadas também apresentaram maior concentração de Cu na fração solúvel em raízes, quando cultivadas no solo do VN, em relação ao solo do NF (Tabela 2). O *A. compressus*, quando cultivado no solo do VN, apresentou as menores concentrações de Cu na parede celular e fração solúvel em folhas, porém as maiores em raízes, em relação às outras espécies (Tabela 2).

Em folhas e raízes do *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* mais de 90% do Zn estava na parede celular e fração solúvel (Tabela 3; material suplementar, figura S3). Na fração núcleos e plastídeos e na fração mitocôndria em folhas não houve diferença entre as espécies, nem entre as áreas NF e VN (Tabela 3). As três espécies apresentaram maiores teores de Zn na parede celular em folhas, quando cultivadas no solo do VN em relação ao NF. *A. compressus* e *P. plicatulum* apresentaram maiores teores de Zn na fração solúvel em folhas, quando cultivadas no solo do VN em relação ao NF (Tabela 3). *A. compressus* e o *P. plicatulum* apresentaram maiores concentrações de Zn na parede celular em raízes, quando cultivadas no solo do VN, em relação ao NF. As três espécies avaliadas apresentaram maiores

concentrações de Zn na fração solúvel. *P. plicatulum* apresentou maiores concentrações de Zn na fração núcleo e plastídios em raízes quando cultivadas no solo do VN, em relação ao NF (Tabela 3). *P. notatum* apresentou o menor teor de Zn na parede celular e fração solúvel em raízes, quando cultivado no solo do VN (Tabela 3).

Em folhas e raízes do *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* mais de 90% do Mn estava na parede celular e fração solúvel (Tabela 4; material suplementar, figura S3). *P. notatum* e o *P. plicatulum* apresentaram teores menores de Mn na parede celular e fração solúvel em folhas, quando cultivado no solo do VN, comparativamente ao solo do NF (Tabela 4). *P. plicatulum* apresentou os maiores teores de Mn na parede celular e fração solúvel em folhas, quando cultivado no solo do VN e NF, e na fração núcleo e plastídios, quando cultivado no solo do VN, em relação às outras espécies (Tabela 4). As concentrações de Mn na fração núcleos e plastídeos e na fração mitocôndria em folhas e raízes nas três espécies, não diferiram entre as áreas NF e VN (Tabela 4). Na parede celular, as três espécies avaliadas apresentaram menores concentrações de Mn em raízes, quando cultivadas no solo do VN, em relação ao NF (Tabela 4). *A. compressus* apresentou menores concentrações de Mn, na fração solúvel, em raízes quando cultivados no solo do VN em relação ao NF (Tabela 4). *A. compressus* apresentou os maiores teores de Mn na parede celular e fração solúvel em raízes, em relação às demais espécies (Tabela 4).

2.3.3.3 Alterações nutricionais

Para as concentrações de P e Mg no caule e P, K e Mn em raízes, a interação não foi significativa para os fatores áreas e espécies. *A. compressus*, quando cultivada no solo do VN, comparativamente ao NF, apresentou maiores concentrações de P, Ca, Mg, Cu, Zn e Mn em folhas; maiores de P, K, Ca, Mg e Zn no caule e maiores de P, K, Ca, Mg, Cu, Zn e Fe em raízes (Material suplementar, tabelas S3 e S4). *P. notatum*, quando cultivada no solo do VN, comparativamente ao NF, apresentou maiores concentrações de Ca, Mg, Zn e Mn e menores de K e Fe em folhas; maiores de P, K, Mg, Cu e Zn e menores de Mn no caule, e maiores de P, K, Ca, Mg e Zn em raízes (Material suplementar, tabelas S3 e S4). *P. plicatulum*, quando cultivada no solo do VN, comparativamente ao NF, apresentou maiores concentrações de K e Zn e menores de Ca, Mg, Cu e Mn em folhas; maiores de P, Ca, Mg, Cu, Zn e Fe no caule; maiores de P, K, Mg, Cu e Zn e menores de Fe em raízes (Material suplementar, tabelas S3 e S4).

2.3.3.4 Pigmentos, estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes

A. compressus apresentou menores concentrações de clorofila *a* (Chla), clorofila total (Chl total) e de carotenoides quando cultivadas no solo do VN, comparativamente ao NF (Figura 4a, 4c-d). *P. notatum* apresentou menores concentrações de Chla e Chl total, quando cultivadas no solo do VN, comparativamente ao NF (Figura 4a, 4c). Por outro lado, em *P. plicatum*, as concentrações de Chla, Chl total e carotenoides não foram influenciadas pelo cultivo nos diferentes solos. *P. notatum* apresentou a maior concentração de Chla, clorofila *b* (Chlb) e Chl total em relação às outras espécies, quando cultivadas no solo do VN e NF (Figura 4a-c). Para Chlb a interação não foi significativa para os fatores áreas e espécies.

Para a concentração de H₂O₂ em folhas a interação não foi significativa para os fatores áreas e espécies. Mas, a concentração de H₂O₂ em folhas nas espécies *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatum* foram menores quando foram cultivadas no solo do VN, comparativamente ao solo do NF (Figura 5a). A concentração de H₂O₂ em raízes de *A. compressus* e *P. notatum* foram maiores quando cultivadas no solo do VN, comparativamente ao NF (Figura 5b). *A. compressus* apresentou a maior concentração de H₂O₂ em folhas e o *P. plicatum* em raízes, quando cultivados no solo do VN e NF (Figura 5a).

A. compressus e o *P. plicatum* apresentaram maior atividade da enzima POD em folhas quando cultivadas no solo do VN, em relação ao NF (Figura 5c). *A. compressus* apresentou maior e o *P. plicatum* menor atividade da enzima POD em raízes quando cultivadas no solo do VN, em relação ao NF (Figura 5d). Nas raízes, a menor atividade da POD foi observada no *P. plicatum*, quando cultivado no solo do VN e NF (Figura 5d). *A. compressus* cultivado no solo VN apresentou a maior atividade de POD em raízes, em relação às outras espécies (Figura 5d).

A atividade da enzima SOD em folhas, no *P. plicatum* foi maior e do *P. notatum* menor, quando cultivados no solo do VN, em relação ao NF (Figura 5e). *P. plicatum* apresentou a maior e o *P. notatum* a menor atividade da enzima SOD em folhas, quando cultivadas no solo do VN (Figura 5e). A maior atividade da SOD em raízes de *A. compressus* e de *P. notatum* foi observada quando cultivadas no solo do VN, comparativamente ao solo do NF. A maior atividade da SOD em raízes do *P. plicatum* foi observada quando cultivadas no solo do NF, comparativamente ao solo do VN (Figura 5f). *A. compressus* apresentou a maior e o *P. plicatum* a menor atividade da SOD em raízes, quando cultivadas no solo VN (Figura 5f).

2.3.3.5 Análise de componentes principais

A análise mostrou uma divisão entre o VN e NF (Figura 6a). As variáveis de massa seca em folhas, caule, raízes, material senescente e total, concentração de Mn no caule e raízes e K em folhas estão relacionadas ao NF (Figura 6a). As demais variáveis dos metais e nutrientes em folhas, caule e raízes estão relacionadas ao VN (Figura 6a). A variável Mn em raízes apresentou relação inversa com o Zn em raízes (Figura 6a). A relação entre as espécies com cada metal mostra que as variáveis Fe em folhas (Fe_L), Cu em raízes (Cu_R) e massa seca de caule (DM_S) está relacionado com a espécie *A. compressus* (Figura 6a). Ca em folhas (Ca_L), Mn em raízes (Mn_R), K em folhas (K_L) e massa seca de material senescente (DM_Sen) estão relacionados com a espécie *P. notatum* (Figura 6a). As variáveis de massa seca em folhas (DM_L) e raízes (DM_R), Ca, Mg, Fe, Zn e Mn no caule (Ca_S, Mg_S, Fe_S, Zn_S e Mn_S) e Mn em folhas (Mn_L) estão relacionadas ao *P. plicatum* (Figura 6a).

A ACP também mostrou a divisão entre NF e VN, no entanto essa divisão é sutil (Figura 6b). As concentrações de Cu, Zn e Mn em raízes (Cu_R, Zn_R e Mn_R) e a atividade da enzima SOD têm relação inversa com a concentração de clorofila *a* (Chla), *b* (Chlb), total (Chl_total) e carotenoides (Carot) (Figura 6b). As variáveis Cu, Zn e Mn no caule, massa seca em folhas (DM_L) e raízes (DM_R) e H₂O₂ em raízes, as quais estão associadas ao *P. plicatum*, apresentaram relação inversa com H₂O₂ em folhas, POD_R, DM_S, DM_sen, que estão relacionadas ao *A. compressus* (Figura 6b).

2.3.4 Discussão

2.3.4.1 Acúmulo e distribuição subcelular de Cu, Zn e Mn em *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatum*

P. notatum acumulou as maiores quantidades de Cu, Zn e Mn em raízes, quando cultivada no solo do VN (Figuras 2c, f, i). As maiores concentrações de Cu e Zn normalmente são observadas em raízes (GUPTA et al., 2016). Isso pode ser atribuído a baixa mobilidade desses metais no interior da planta (TIECHER et al., 2016; KABATA-PENDIAS, 2011). O Cu está fortemente ligado ao N das proteínas e por isso possui baixa mobilidade nas plantas (KABATA-PENDIAS, 2011), enquanto que o Zn está ligado a compostos orgânicos leves no xilema, fluídos e em outros extratos de tecido vegetal, o que pode sugerir maior mobilidade que o Cu em plantas (KABATA-PENDIAS, 2011). Por outro lado, as maiores quantidades de Mn foram acumuladas na parte aérea em *P. notatum* e *P. plicatum*, indicando maior mobilidade desse metal (SHAO et al., 2017). O acúmulo de metais em raízes, em condições de excesso dos metais, também é um importante mecanismo de tolerância utilizado, para evitar o transporte para os órgãos da parte aérea, onde os efeitos dos metais são mais nocivos

(YADAV et al., 2021; HE et al., 2022), uma vez que as folhas são os órgãos metabolicamente mais ativos da planta. Isso porque, quando os metais estão dentro do citosol as plantas precisam diminuir a toxidez dos metais, o que é feito através da complexação de íons com ligantes orgânicos e inorgânicos (YAN et al., 2020). No caule, a quantidade acumulada de Cu, Zn e Mn no *P. plicatum*, Cu e Zn no *A. compressus* e de Cu no *P. notatum* foram maiores, quando as plantas foram cultivadas no solo do VN (Figuras 2b, e, h). Isso porque, o caule também pode reter metais, o que diminui o transporte às folhas, gerando menores danos ao aparato fotossintético (MARQUES et al., 2023).

A. compressus, *P. notatum* e *P. plicatum* apresentaram maiores concentrações de Cu e Zn na parede celular e fração solúvel que contém principalmente vacúolos (Tabelas 2, 3). Isso é um mecanismo de tolerância utilizado por essas espécies para desintoxicar os metais. Assim, às plantas mantém o metabolismo celular ideal em condições de altas concentrações de metais, como Cu, Zn e Mn (HE et al., 2022; MWAMBA et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Isso acontece porque, na parede celular existem polissacarídeos e proteínas, e seus grupos funcionais como carboxila, hidroxila, amino e aldeído, quando desprotonados, geram cargas negativas que podem adsorver os metais, diminuindo o transporte (FU et al., 2011; YANG et al., 2018; XIAO et al., 2020). Além disso, os vacúolos são metabolicamente inativos, mas desempenham um papel importante regulando a distribuição de metais pesados (BASHIR et al., 2021). Isso porque, no vacúolo, os metais podem se ligar principalmente a ácidos orgânicos, reduzindo a atividade dos íons livres (FU et al., 2011; XIAO et al., 2020). As concentrações do Cu, Zn e Mn nas espécies avaliadas praticamente não diferiram nas frações núcleo, plastídios e mitocôndria, onde o excesso de metais pode ser extremamente tóxico (BASHIR et al., 2021). Isso sugere que o mecanismo de reter os íons na parede celular ou armazenar os mesmos no vacúolo utilizado nas três espécies foi eficiente.

A quantidade acumulada de Mn em raízes do *A. compressus* e *P. plicatum* foram menores, quando cultivadas no solo do VN. Além disso, as concentrações de Mn na parede celular e fração solúvel em folhas de *P. notatum* e *P. plicatum* foram menores, quando cultivadas no solo do VN. Isso também foi observado na parede celular nas raízes das três espécies e na fração solúvel da espécie *A. compressus*. O resultado pode ser atribuído as relações entre os metais Cu, Zn e Mn, que podem ser antagônicas e/ou sinérgicas (KABATA-PENDIAS, 2011; MARSCHNER, 2012). Além disso, nossos resultados na ACP mostram que o Mn na raiz teve relação inversa com o Zn na raiz (Figura 6a). Isso pode ser atribuído à semelhança dos raios iônicos dos cations bivalentes como Cu, Zn, Mn e Fe. Assim, o Zn pode substituir qualquer um desses cátions e ser absorvido pelas raízes (TEWARU et al., 2008;

TIECHER et al., 2016). Dessa forma, a alta disponibilidade de Zn ou Mn pode diminuir fortemente a concentração do outro (MARSCHNER, 2012). Nossos resultados estão de acordo com Marastoni et al. (2019), que observaram que videiras cultivadas em concentrações crescentes de Cu, apresentaram relações antagônicas entre Zn e Mn.

2.3.4.2 Alterações fisiológicas e bioquímicas em *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, cultivadas com altos teores de Cu, Zn e Mn

A produção de massa seca na parte aérea foi menor em *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, quando cultivadas no solo do VN (Figuras 1a-b). Isso pode ser atribuído, principalmente, a quantidade acumulada de Cu, Zn e Mn em folhas, caule e/ou raízes e, conseqüentemente, variação no estado nutricional (Figuras 2a-i, 3, material suplementar, tabelas S3 e S4). A redução da massa seca nas plantas pode estar associada a menor adaptabilidade dessas plantas aos metais, uma vez que as plantas podem ter atingido concentrações tóxicas dos metais nos tecidos (SCHWALBERT et al., 2022; THIESEN et al., 2023). Além do efeito dos metais tóxicos sobre o estado nutricional da plantas, essas concentrações tóxicas nos tecidos pode afetar vários outros processos bioquímicos e fisiológicos como divisão celular, transporte de nutrientes e água nas plantas, fotossíntese, respiração, estresse oxidativo e dano em organelas sensíveis, ocasionando redução na produção de biomassa (ALSAFRAN et al., 2023). Resultados semelhantes foram observados em espécies nativas da América do Sul quando cultivadas com altos teores de Cu (MARQUES et al., 2023; SILVA et al., 2022) e Zn no solo (SCHWALBERT et al., 2022), e Mn em solução nutritiva (THIESEN et al., 2023).

A. compressus e *P. notatum* apresentaram menores concentrações de pigmentos fotossintéticos, quando cultivadas no solo do VN. Essa redução na concentração de pigmentos fotossintéticos pode ter contribuído para a redução na produção de biomassa das plantas cultivadas no solo do VN. Isso pode ser atribuído a alta concentração dos metais, que quando excedem o nível de tolerância da planta, apresentam sintomas tóxicos, como a redução dos pigmentos fotossintéticos e, conseqüentemente, a capacidade fotossintética e o crescimento (SUMAN et al., 2018; SCHWALBERT et al., 2022; SILVA et al., 2022; THIESEN et al., 2023). Isso acontece porque o excesso de metais como Cu, Zn e Mn, pode inibir a síntese de clorofila, ou degrada-la pela substituição do átomo de Mg na estrutura central da clorofila, o que pode levar a degradação de todo o fotossistema (HE et al., 2022; SCHWALBERT et al., 2022; KÜPPER; ANDRESEN, 2016). Além disso, a alta concentração de Cu e Zn pode levar a redução na concentração de outros íons essenciais na parte aérea, como o Fe e assim

favorecendo a redução nos teores de clorofila, o que pode ter acontecido no *P. notatum* (OSÓRIO et al., 2014; KÜPPER; ANDRESEN, 2016; material suplementar, figura S3), mas também o estresse oxidativo pode auxiliar na redução da concentração dos pigmentos fotossintéticos (DAO; BEARDALL, 2016; KÜPPER; ANDRESEN, 2016). A redução na concentração de pigmentos fotossintéticos já foi observada em espécies da família Poaceae, quando cultivadas com altos teores isolados de Cu (SILVA et al., 2022), Zn (SCHWALBERT et al., 2022) e Mn (HE et al., 2022; THIESEN et al., 2023).

A concentração de H_2O_2 observada em folhas do *P. plicatulum* foi menor quando cultivadas no solo do VN em relação ao NF. Isso pode ser devido ao aumento da atividade das enzimas SOD e POD em folhas dessa espécie (Figuras 5c, 5e; GILL; TUTEJA, 2010; SILVA et al., 2022; MARQUES et al., 2023). No sistema de defesa antioxidante, o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que normalmente é a primeira ERO a ser gerada, pode ser dismutado pela SOD em H_2O_2 (HASANUZZAMAN et al., 2020). Assim, a SOD é a primeira linha de defesa contra as ERO e a atividade da SOD indica que $O_2^{\bullet-}$ está sendo degradado dentro da célula e sendo produzido H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). A POD pode catalisar reações oxidativas em plantas, usando o H_2O_2 como substrato (GILL; TUTEJA, 2010; MARQUES et al., 2023). Dessa forma, nossos dados sugerem que a atividade das enzimas SOD e POD desempenharam um papel ativo no combate ao estresse oxidativo causado pelo excesso dos metais em folhas do *P. plicatulum*. Assim como observado em nosso trabalho, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como SOD e POD já foram observadas em espécies de gramíneas cultivadas em solo contaminado com Cu, em condições controladas (SILVA et al., 2022; MARQUES et al., 2023). Em raízes do *P. plicatulum* não houve alteração na concentração de H_2O_2 quando cultivado no solo do VN e NF, além disso, foi observada menor atividade das enzimas SOD e POD, quando cultivadas no solo do VN. Isso pode ter acontecido porque nas raízes dessa espécie não houve aumento da quantidade acumulada de Cu, Zn e Mn e, assim, não foi necessário ativar o sistema antioxidante nessa região. Além disso, como os metais ficaram retidos principalmente na parede celular e vacúolos, isso pode ter contribuído para a menor toxicidade e estresse oxidativo neste órgão.

A concentração de H_2O_2 em folhas do *P. notatum* foram menores quando cultivadas no solo do VN em relação ao NF. Isso pode ser atribuído a um sistema de defesa antioxidante das plantas que pode ser enzimático ou não enzimático eficiente em combater as ERO (GILL; TUTEJA, 2010). Outras enzimas, além da POD, também podem diminuir a concentração do H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). Isso pode justificar a diminuição na concentração do H_2O_2 em folhas do *P. notatum* sem alterar a atividade da enzima POD. As concentrações de H_2O_2 em

folhas do *A. compressus* também foram menores quando cultivadas no solo do VN em relação ao NF, o que pode significar um aumento de outras ERO, isso porque através do H_2O_2 podem ser formadas outras ERO inclusive mais reativas como o radical hidroxila (OH^\bullet) (GILL; TUTEJA, 2010). Isso pode justificar a redução na concentração dos pigmentos fotossintéticos e de massa seca de folhas nessa espécie, indicando maior estresse (KÜPPER; ANDRESEN, 2016). Por outro lado, a concentração do H_2O_2 foi maior em raízes nas espécies *A. compressus* e *P. notatum*, quando cultivado no solo do VN. Além disso, a atividade da enzima SOD, mas também na enzima POD no *A. compressus* foi maior, quando cultivada no solo do VN. Estes resultados indicam que o sistema de defesa antioxidante nas raízes dessas espécies não foi eficiente, pois mesmo assim, a concentração do H_2O_2 aumentou (GILL; TUTEJA, 2010).

2.3.4.3 Potencial de fitoestabilização

O alto valor de BCF para Cu, Zn e Mn nas espécies *A. compressus*, *P. plicatulum* e *P. notatum* quando cultivadas no solo do VN, sugerem que essas espécies podem ser utilizadas para fitoestabilização de vinhedos com mais de 40 anos de cultivo e altos teores de Cu, Zn e Mn no solo (SILVA et al., 2022). As espécies *P. plicatulum* e *P. notatum* acumularam maiores concentrações de Zn e/ou Mn na parte aérea, porém, as concentrações ficaram bem abaixo do necessário para serem consideradas hiperacumuladoras (BAKER; BROOKS, 1989).

A. compressus é a espécie mais sensível ao aumento simultâneo nos teores de Cu, Zn e Mn no solo. Isso porque foi a espécie que apresentou o menor TI (material suplementar, tabela S2). Isso foi devido a menor produção de massa seca da parte aérea, causada por variação no estado nutricional, diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos e estresse oxidativo. Silva et al. (2022) observaram que outra espécie do gênero *Axonopus* também foi sensível ao excesso de Cu, sendo que os efeitos fitotóxicos do Cu em doses no solo de 70 mg Cu kg^{-1} , o que causou a morte das plantas.

As espécies *P. plicatulum* e *P. notatum* apresentaram maiores TI. Isso indica que estas espécies possuem mecanismos de tolerância mais eficientes em desintoxicar os metais (YAN et al., 2020), como observado nesse estudo, através da menor translocação dos metais pesados para as folhas, compartimentalização dos metais em áreas subcelulares metabolicamente menos ativas, associado e a um sistema de defesa antioxidante mais eficiente no combate as ERO (YAN et al., 2020). Porém, mesmo assim, houve uma redução de massa seca na parte aérea nessas espécies. No entanto, não houve alteração na massa seca de raízes, órgão

importante para fitoestabilizar os metais (YAN et al., 2020). Isso porque, na fitoestabilização as raízes são fundamentais para imobilizar os metais pesados, estabilizar agregados e prevenir a erosão, dessa forma, é importante que as espécies tenham denso sistema radicular (YAN et al., 2020). Assim, nosso estudo mostra que um enriquecimento do vinhedo com as espécies *P. plicatulum* e *P. notatum* pode reduzir a disponibilidade dos metais.

2.3.5 Conclusões

Em solos de vinhedos, em geral, com altos teores de Cu, Zn e Mn, a quantidade acumulada de Cu, Zn e Mn em folhas, caule e raízes das três espécies são maiores. A excessão foi em folhas e raízes de *P. plicatulum*, raízes de *A. compressus* e caule de *P. notatum*, onde a quantidade acumulada de Mn foi menor.

O Mn é o metal mais importante para explicar a diferença de massa seca das plantas, cultivadas no solo do VN e NF.

Altas concentrações de Cu, Zn e Mn no tecido, de forma geral, causam variação no estado nutricional, diminuição de clorofila e estresse oxidativo, que se reflete em menor produção de massa seca da parte aérea em *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*.

As espécies *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* utilizam mecanismos de tolerância ao excesso de Cu, Zn e Mn, como acumulação dos metais no caule e/ou raízes, compartimentalização dos metais em áreas metabolicamente menos ativa, como parede celular e vacúolo, e aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e POD.

P. plicatulum e *P. notatum* são mais indicadas para a fitoestabilização de Cu, Zn e Mn em vinhedos com altos teores desses metais no bioma Pampa.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Flávio Morsch pela ajuda no planejamento e construção dos rhizobox. Ao Grupo Miolo pela estrutura e por permitir a realização do trabalho. Aos componentes do grupo GEPACES por toda a ajuda, aprendizado, e troca de experiências. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education) - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) – CNPq (Process number 408318/2018-0; 302023/2019-4), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul) – FAPERGS (Term of grant 17/2551-0000925-8)

pelas bolsas de estudo concedidas e pelos recursos financeiros disponibilizados para este estudo.

Referências

ALEJANDRO, Santiago et al. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 300, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00300>.

ALSAFRAN, Mohammed et al. An overview of heavy metals toxicity in plants, tolerance mechanism, and alleviation through lysine-chelation with micro-nutrients—A novel approach. **Plant Growth Regulation**, v. 100, n. 2, p. 337-354, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00940-8>.

ANDRADE, Bianca O. et al. 12,500+ and counting: biodiversity of the Brazilian Pampa. **Frontiers of Biogeography**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21425/F5FBG59288>.

BAKER, Alen JM; BROOKS, RR1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v. 1, n. 2, p. 81-126, 1989.

BALAFREJ, Habiba et al. Zinc hyperaccumulation in plants: A review. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 562, 2020.

BASHIR, Khurram et al. Roles of subcellular metal homeostasis in crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 6, p. 2083-2098, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erab018>.

BEAUCHAMP, Charles; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BERNI, Roberto et al. Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 161, p. 98-106, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.017>.

BEYGI, Mohsen; JALALI, Mohsen. Assessment of trace elements (Cd, Cu, Ni, Zn) fractionation and bioavailability in vineyard soils from the Hamedan, Iran. **Geoderma**, v. 337, p. 1009-1020, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.11.009>.

BRUNETTO, Gustavo et al. Copper and zinc fractions in the profile of an Inceptisol cultivated with apple in southern Brazil. **Bragantia**, v. 77, p. 333-347, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017033>.

CAMPILLO-CORA, C. et al. Copper and zinc in rhizospheric soil of wild plants growing in long-term acid vineyard soils. Insights on availability and metal remediation. **Science of The Total Environment**, v. 672, p. 389-399, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.301>.

CHOMENKO, Luiza; BENCKE, Glayson A.; BECKER, Adriano Nygaard. Nosso pampa desconhecido. **Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul**, 2016.

COUTO, Rafael da Rosa et al. Accumulation and distribution of copper and zinc in soils following the application of pig slurry for three to thirty years in a microwatershed of southern Brazil. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 5, p. 593-616, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2015.1074183>.

CQFS RS/SC- **Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. SBRS/Núcleo Regional Sul, Porto Alegre. 2016.

DAO, Ly HT; BEARDALL, John. Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. **Chemosphere**, v. 147, p. 420-429, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.117>.

DE CONTI, Lessandro et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.134>.

DE CONTI, Lessandro et al. Tolerance and phytoremediation potential of grass species native to South American grasslands to copper-contaminated soils. **International Journal of Phytoremediation**, v. 23, n. 7, p. 726-735, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1852528>.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2. ed. rev. ampl. **Embrapa Informação Tecnológica: Brasília**. 627p. 2009.

FU, Xiaoping et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 103-107, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.122>.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. **ejmp & ep (European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection)**, v. 3, n. 1, p. 58-66, 2003.

GIANNOPOLITIS, Constantine N.; RIES, Stanley K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.

GUPTA, Neha et al. Trace elements in soil-vegetables interface: translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration-a review. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 2927-2942, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.047>.

HAMMERSCHMITT, Rodrigo K. et al. Copper and zinc distribution and toxicity in 'Jade'/'Genovesa' young peach tree. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108763, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108763>.

HASANUZZAMAN, Mirza et al. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: a review of recent experimental evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8695, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>.

HE, Langjun et al. Integration of manganese accumulation, subcellular distribution, chemical forms, and physiological responses to understand manganese tolerance in *Macleaya cordata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 39017-39026, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19562-8>.

HOAGLAND, Dennis Robert et al. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

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.

HUANG, Guoyong et al. Accumulation and distribution of copper in castor bean (*Ricinus communis* L.) callus cultures: in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, p. 177-186, 2017.

HUANG, Jingxin et al. Phosphorus is more effective than nitrogen in restoring plant communities of heavy metals polluted soils. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115259, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115259>.

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. 4th ed. 2011.

KOMÁREK, Michael et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environment international**, v. 36, n. 1, p. 138-151, 2010.

KUHN, Max. Caret: **Classification and Regression Training**. R package version 6.0-73, 2016. URL <https://CRAN.R-project.org/package=caret>.

KUMAR, Vinod et al. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, p. 127810, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>.

KÜPPER, Hendrik; ANDRESEN, Elisa. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5mt00244c>.

LICHTENTHALER, Hartmut K. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1987. p. 350-382.

LORETO, Francesco; VELIKOVA, Violeta. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.

MARASTONI, Laura et al. Synergism and antagonisms between nutrients induced by copper toxicity in grapevine rootstocks: Monocropping vs. intercropping. **Chemosphere**, v. 214, p. 563-578, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.127>.

MARQUES, Anderson Cesar Ramos et al. Growth strategies as determinants of CO₂ sequestration and response to nitrogen fertilisation in C₄ grasses in South American natural grasslands. **Crop and Pasture Science**, v. 71, n. 8, p. 776-784, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP19301>.

MARQUES, Anderson Cesar Ramos et al. Physiological and biochemical characterization of copper-toxicity tolerance mechanism in grass species native to Pampa Biome and Atlantic Forest for use in phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 2, p. 5076-5088, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22570-3>.

Marschner, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press. 2012.

MATANZAS, N. et al. Phytoremediation potential of native herbaceous plant species growing on a paradigmatic brownfield site. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, p. 1-14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05234-9>.

MURPHY, JAMES; RILEY, John P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

MWAMBA, Theodore M. et al. Differential subcellular distribution and chemical forms of cadmium and copper in *Brassica napus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 239-249, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.021>.

ORTEGA, Paula et al. Use of cover crops in vineyards to prevent groundwater pollution by copper and organic fungicides. Soil column studies. **Chemosphere**, v. 303, p. 134975, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134975>.

OSÓRIO, Júlio et al. Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to understand the impact of iron deficiency and resupply on photosynthetic performance of strawberry plants. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 148-155, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.042>.

PINTO, A. P. et al. Biological approaches for remediation of metal-contaminated sites. **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants**, Volume 3, p. 65-112, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40148-5_3.

R CORE TEAM. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

SARMENTO, Marcelo Benevenga. Diagnóstico da Vitivinicultura na Campanha Gaúcha. **Revista Científica Agropampa**, v. 1, n. 1, 2016.

SCHWALBERT, Raissa et al. How do native grasses from South America handle zinc excess in the soil? A physiological approach. **Environmental and Experimental Botany**, v. 195, p. 104779, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104779>.

SCOTT, Andrew Jhon; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SHAO, Ji Feng et al. The key to Mn homeostasis in plants: regulation of Mn transporters. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 215-224, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.005>.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da et al. Potential phytoremediation of Pampa biome native and invasive grass species cohabiting vineyards contaminated with Cu in Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 56, p. 85376-85388, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21738-1>.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da et al. Spatial variation of herbaceous cover species community in Cu-contaminated vineyards in Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13348-13359, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07851-z>.

SOIL SURVEY STAFF. 2006. Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys, 2nd ed. **US Government Printing Office**, Washington DC.

SONODA, Kent et al. Copper and zinc in vineyard and orchard soils at millimeter vertical resolution. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 958-962, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.486>.

SUMAN, Jachym et al. Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1476, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01476>.

TEODORO, Manuel et al. Seasonal fluctuations of Zn, Pb, As and Cd contents in the biomass of selected grass species growing on contaminated soils: Implications for in situ phytostabilization. **Science of The Total Environment**, v. 703, p. 134710, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134710>.

KUMAR TEWARI, Rajesh; KUMAR, Praveen; NAND SHARMA, Parma. Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 171, n. 2, p. 286-294, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.200700222>.

THIESEN, Leonardo Antonio et al. Subcellular distribution and physiological responses of native and exotic grasses from the Pampa biome subjected to excess manganese. **Chemosphere**, v. 310, p. 136801, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136801>.

TIECHER, Tadeu L. et al. Effects of zinc addition to a copper-contaminated vineyard soil on sorption of Zn by soil and plant physiological responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 109-119, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.016>.

TIECHER, Tadeu L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.026>.

TRENTIN, Edicarla et al. Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. **Chemosphere**, v. 226, p. 421-430, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.141>.

FU, Xiaoping et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 186, n. 1, p. 103–107, 2011.

WANG, Quan-Ying; LIU, Jing-Shuang; HU, Bo. Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees. **Environmental and Experimental Botany**, v. 123, p. 125-131, 2016.

WEI, Zihan et al. A review on phytoremediation of contaminants in air, water and soil. **Journal of hazardous materials**, v. 403, p. 123658, 2021.

WEIDENHAMER, Jeffrey D.; CALLAWAY, Ragan M. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of chemical ecology**, v. 36, p. 59-69, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9735-0>.

XIAO, Zehua et al. Effects of exogenous manganese on its plant growth, subcellular distribution, chemical forms, physiological and biochemical traits in *Cleome viscosa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p. 110696, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110696>.

YADAV, Vaishali et al. Structural modifications of plant organs and tissues by metals and metalloids in the environment: A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 159, p. 100-112, 2021.

YAN, An et al. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 359, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>.

YANG, Lan Peng et al. Effect of Cd on growth, physiological response, Cd subcellular distribution and chemical forms of *Koeleruteria paniculata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 160, p. 10-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.026>.

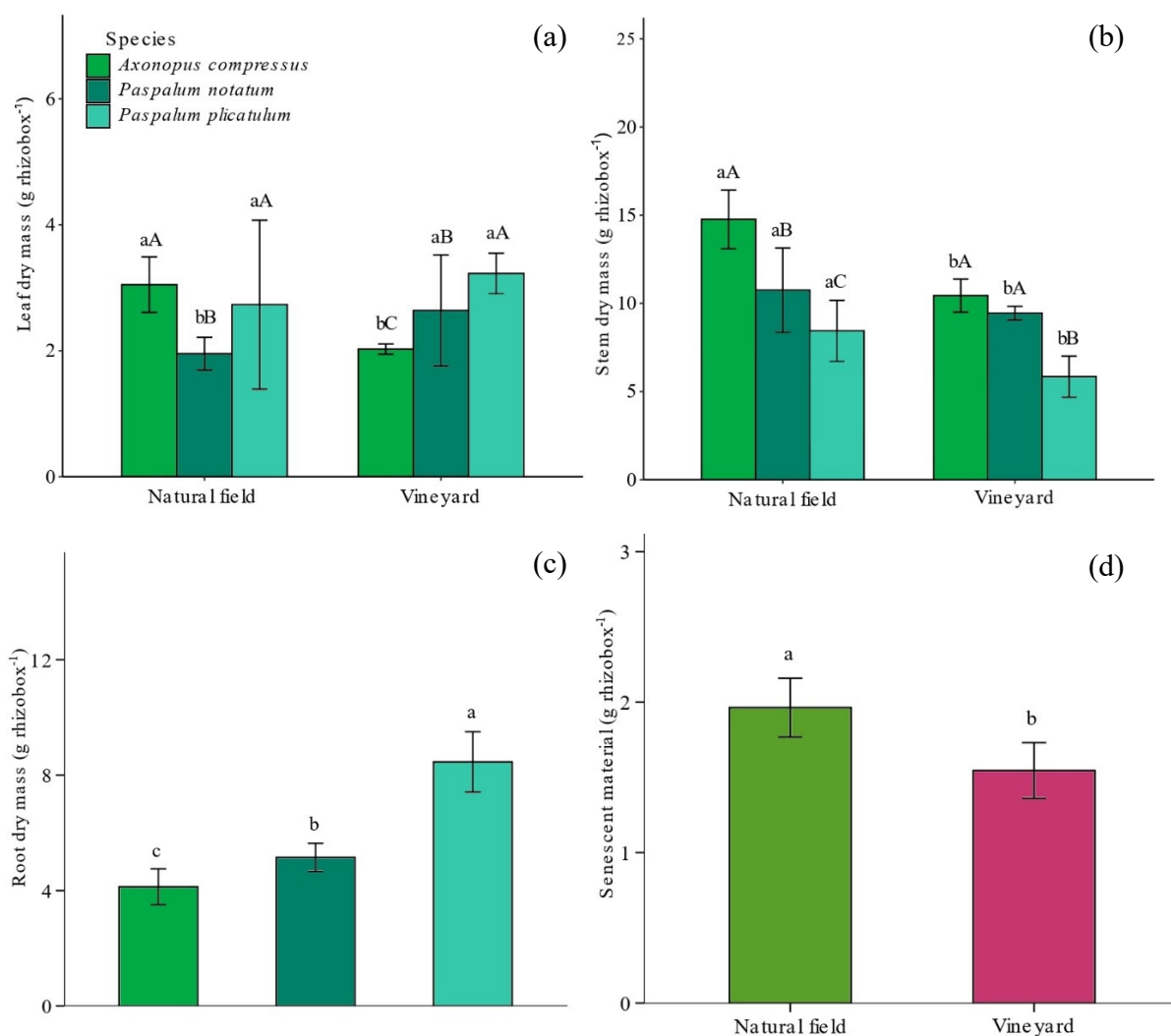
ZENG, Fanrong et al. Subcellular distribution and chemical forms of chromium in rice plants suffering from different levels of chromium toxicity. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, n. 2, p. 249-256, 2011.

ZERAIK, Ana Eliza et al. Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure. **Química Nova**, v. 31, p. 731-734, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000400003>.

ZHANG, Qianni et al. Accumulation and subcellular distribution of heavy metal in *Paulownia fortunei* cultivated in lead-zinc slag amended with peat. **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 11, p. 1153-1160, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1612844>.

Figuras

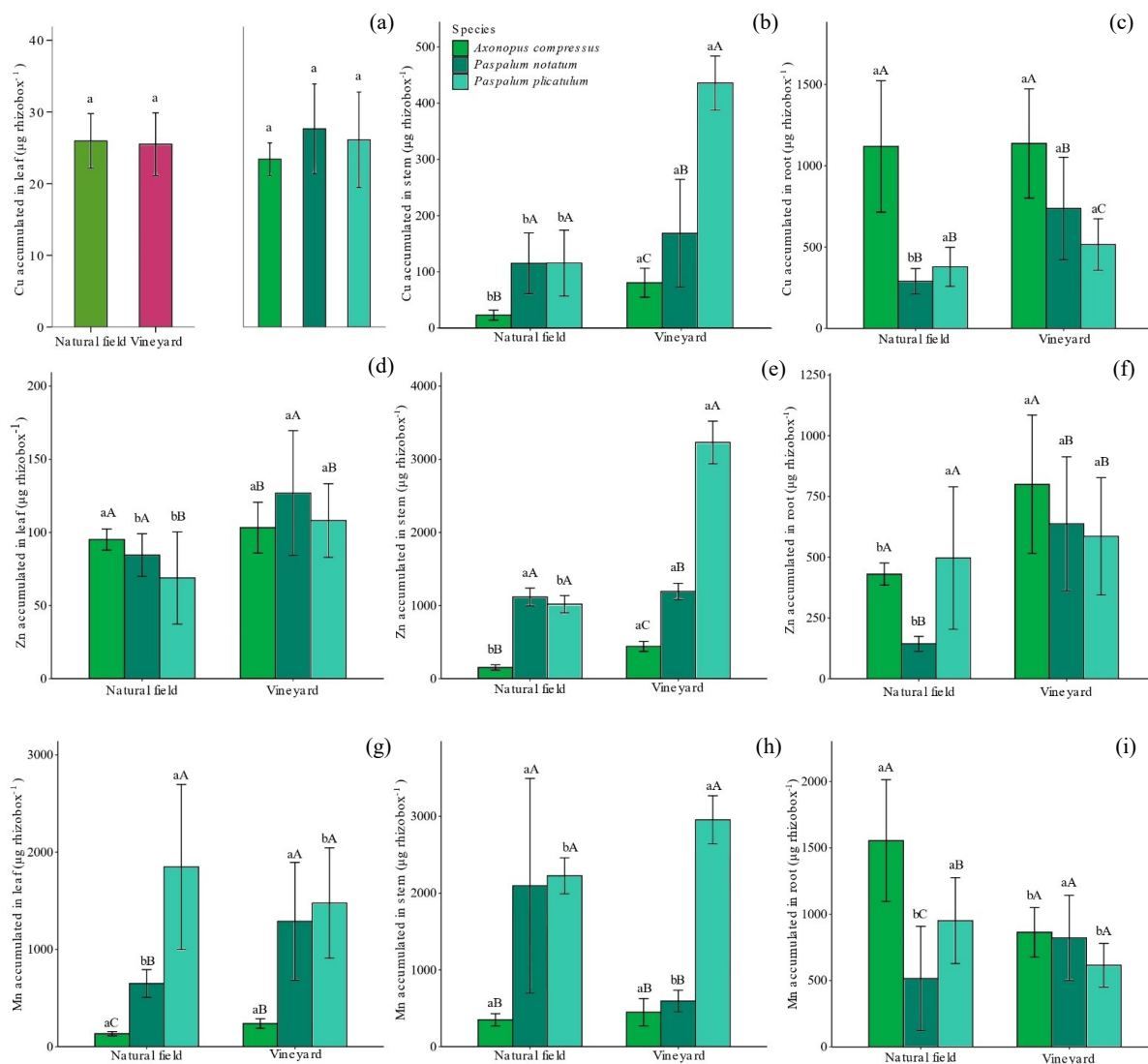
Figura 1. Produção de massa seca de folhas (a), caule (b), raízes (c) e material senescente (d) de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, cultivadas em solo de campo nativo e de vinhedo.



Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: Nas figuras (a) e (b), as letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e as letras minúsculas comparam as espécies entre as áreas. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$).

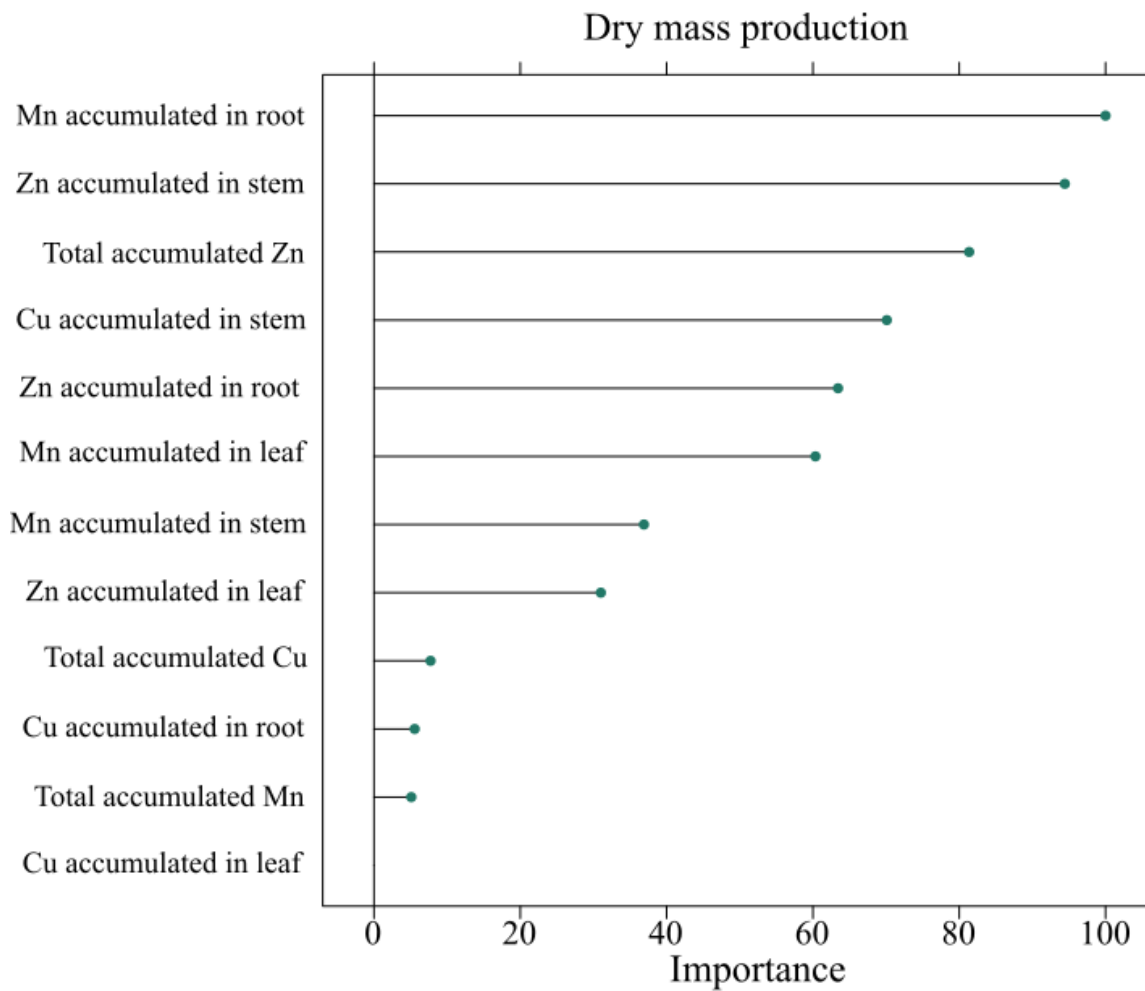
Figura 2. Cu acumulado em folhas (a), caule (b) e raízes (c); Zn acumulado em folhas (d), caule (e) e raízes (f); e Mn acumulado em folhas (g), caule (h) e raízes (i) de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, cultivadas em solo de campo nativo e de vinhedo.



Fonte: elaborado pelos autores

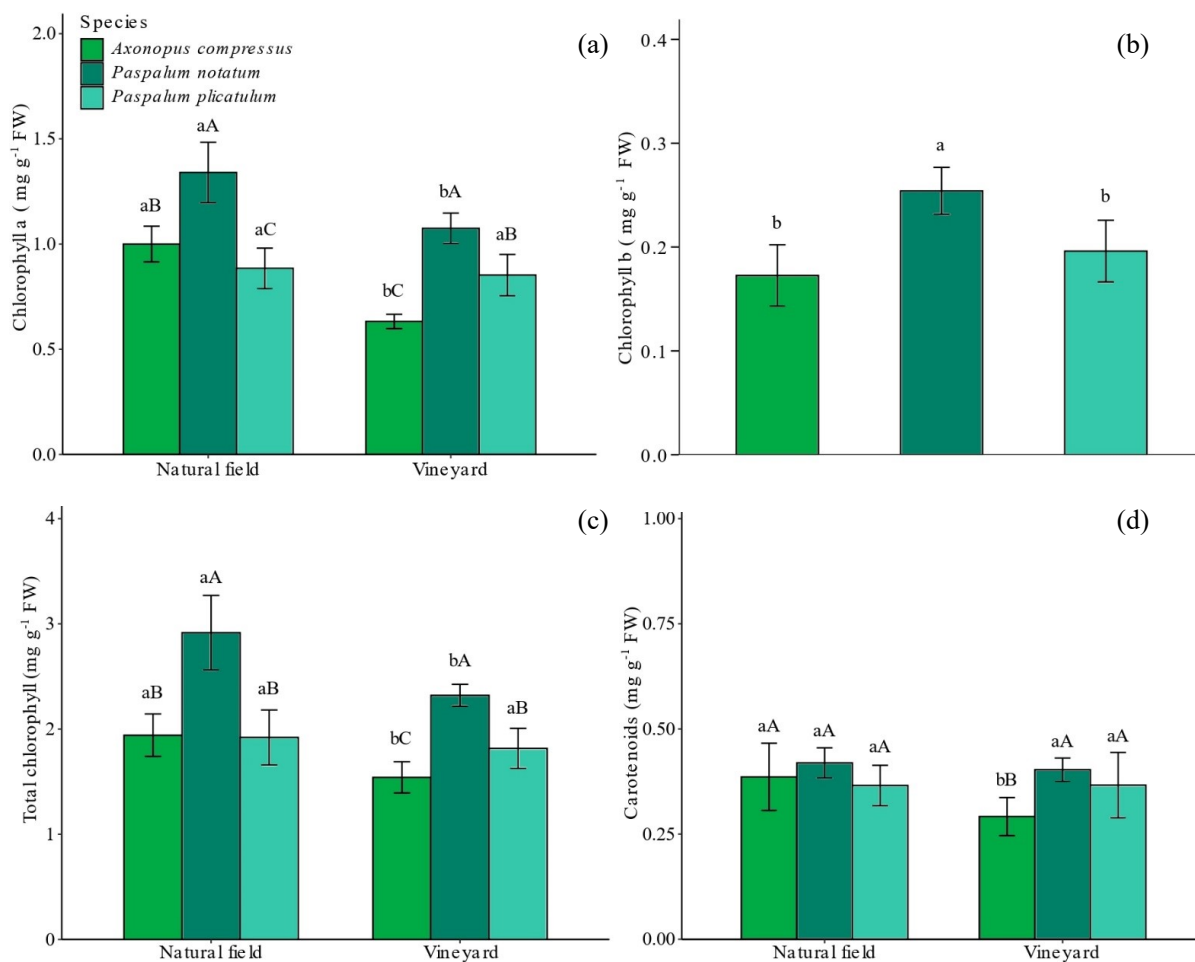
Legenda: Nas figuras (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) as letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e as letras minúsculas comparam as espécies entre as áreas. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$).

Figura 3. Importância (% relativa) de cada variável na explicação da variação da produção de massa seca em *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, cultivadas em solo de campo nativo e de vinhedo.



Fonte: elaborado pelos autores

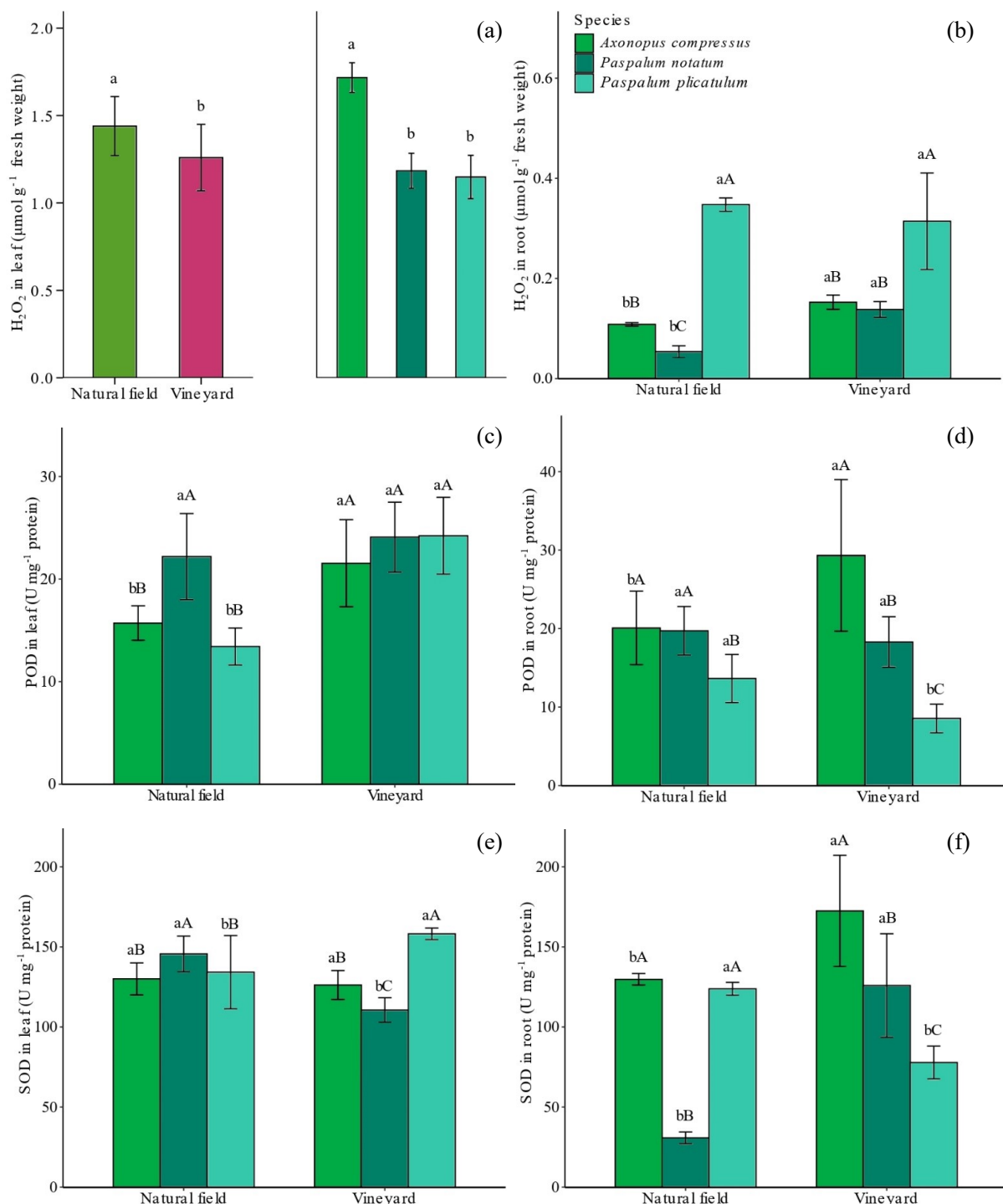
Figura 4. Concentrações de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c) e carotenoides (d) em *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, cultivadas em solo de campo nativo e de vinhedo.



Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: Nas figuras (a), (c) e (d), as letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e as letras minúsculas comparam as espécies entre as áreas. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$).

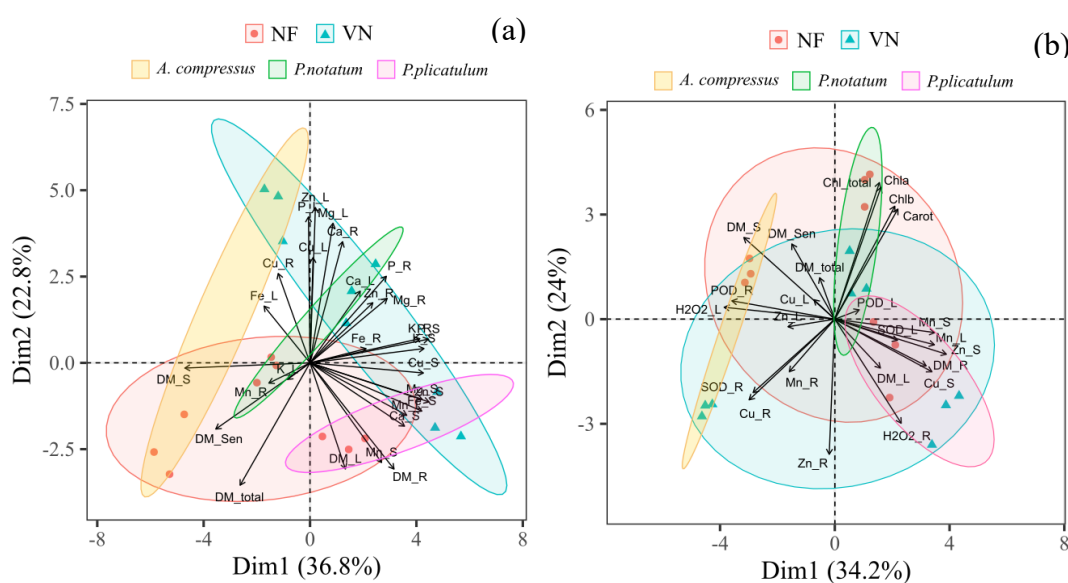
Figura 5. Valores de H_2O_2 em folhas (a) e raízes (b); atividade das enzimas guaiacol peroxidase (POD) em folhas (c) e raízes (d); e superóxido dismutase (SOD) em folhas (e) e raízes (f) de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, cultivadas em solo de campo nativo e de vinhedo.



Fonte: elaborado pelos autores

Nas figuras (b), (c), (d), (e) e (f), as letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e as letras minúsculas comparam as espécies entre as áreas. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$).

Figura 6. Massa seca em folhas (DM_L), caule (DM_S), raízes (DM_R), material senescente (DM_Sen) e total (DM_total); concentrações de Cu, Zn, Mn, Fe, P, Ca, Mg e K em folhas (Cu_L, Zn_L, Mn_L, Fe_L, P_L, Ca_L, Mg_L e K_L), caule (Cu_S, Zn_S, Mn_S, Fe_S, P_S, Ca_S, Mg_S e K_S) e raízes (Cu_R, Zn_R, Mn_R, Fe_R, P_R, Ca_R, Mg_R e K_R); concentração de clorofila a (Chla), b (Chlb), total (Chl_total) e carotenoides (Carot); concentração de H₂O₂ em folhas (H₂O₂_L) e raízes (H₂O₂_R); atividade da enzima SOD em folhas (SOD_L) e raízes (SOD_R); atividade da enzima POD em folhas (POD_L) e raízes (POD_R), nas espécies *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatum*.



Fonte: elaborado pelos autores

Tabelas

Tabela 1. Caracterização inicial do solo coletado na camada de 0-0.2 m.

	Natural field	Vineyard
Clay (g kg ⁻¹)	63.55	65.41
Sand (g kg ⁻¹)	868.74	855.68
Soil organic matter (%)	1.30	0.82
pH in H ₂ O (relation 1:1)	5.12	5.67
Available P by Mehlich-1 (mg dm ³)	10.17	25.21
Available K by Mehlich-1 (mg dm ³)	403	448.00
Exchangeable Ca (mg/dm ³)	245.36	440.32
Exchangeable Mg (mg/dm ³)	27.09	54.10
Fe (extracted by EDTA) (mg/dm ³)	124.57	90.06
Cu (extracted by Mehlich-1) (mg dm ³)	3.29	42.60
Cu (extracted by EDTA) (mg dm ³)	2.82	39.20
Zn (extracted by Mehlich-1) (mg dm ³)	3.12	17.37
Zn (extracted by EDTA) (mg dm ³)	2.19	13.51
Mn (extracted by Mehlich-1) (mg dm ³)	55.29	162.54
Mn (extracted by EDTA) (mg dm ³)	25.97	91.38
CEC (pH _{7.0}) (cmol _c kg ⁻¹)	6.75	5.42
Base saturation (%)	36.89	70.11
Al ³⁺ saturation (%)	10.7	0.0

Fonte: elaborado pelos autores

Tabela 2. Frações subcelulares do Cu em folhas e raízes de *P. plicatulum*, *P. notatum* e *A. compressus*, cultivadas em solo de campo nativo e vinhedo.

Fractions	Leaf Cu concentration (mg kg ⁻¹)					
	NF			VN		
	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>
Cell wall	0.79 bBα ⁽¹⁾	1.84 bAα	1.42 bAα	1.54 aCα	4.19 aAα	2.73 aBα
Plastids and nucleus	0.05 aAβ	0.14 aAγ	0.13 aAγ	0.21 aAβ	0.52 aAγ	0.14 aAγ
Mitochondria	0.03 aAβ	0.09 aAγ	0.04 aAγ	0.03 aAβ	0.07 aAδ	0.07 aAγ
Soluble	0.50 aBα	1.15 aAβ	0.72 aBβ	0.55 aBβ	1.18 aAβ	0.96 aAβ

Fractions	Root Cu concentration (mg kg ⁻¹)					
	NF			VN		
	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>
Cell wall	6.72 bAα	4.11 bBα	3.66 bBα	22.57 aAα	8.77 aCα	13.78 aBα
Plastids and nucleus	0.75 aAβ	0.34 aAγ	0.35 aAβ	1.21 aAγ	0.51 aAγ	1.21 aAγ
Mitochondria	0.47 aAβ	0.13 aAγ	0.25 aAβ	0.48 aAγ	0.18 aAγ	0.37 aAγ
Soluble	7.11 bAα	2.96 bBβ	2.69 bBα	13.89 aAβ	5.09 aCβ	7.80 aBβ

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ⁽¹⁾Letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e fração, letras minúsculas comparam as áreas dentro de cada fração e espécie e as letras gregas comparam a fração dentro de cada área e espécie. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% (P < 0,05).

Tabela 3. Frações subcelulares do Zn em folhas e raízes de *P. plicatulum*, *P. notatum* e *A. compressus*, cultivadas em solo de campo nativo e vinhedo.

Fractions	Leaf Zn concentration (mg kg ⁻¹)					
	NF			VN		
	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>
Cell wall	3.23 bCβ ⁽¹⁾	6.45 bAα	4.04 bBα	5.67 aBα	7.85 aAα	8.17 aAα
Plastids and nucleus	0.24 aAγ	0.40 aAβ	0.37 aAγ	0.35 aAβ	0.50 aAγ	0.79 aAγ
Mitochondria	0.24 aAγ	0.35 aAβ	0.13 aAγ	0.32 aAβ	0.36 aAγ	0.29 aAγ
Soluble	4.82 bBα	6.12 aAα	2.71 bCβ	6.21 aAα	5.94 aAβ	6.12 aAβ

Fractions	Root Zn concentration (mg kg ⁻¹)					
	NF			VN		
	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatulum</i>
Cell wall	8.15 bAα	6.12 aBα	5.53 bBα	14.82 aAα	5.05 aBα	15.77 aAα
Plastids and nucleus	1.34 aAγ	0.64 aAγ	0.68 bAγ	1.69 aAγ	0.37 aBβ	2.08 aAγ
Mitochondria	0.52 aAγ	0.15 aAγ	0.26 aAγ	0.53 aAδ	0.28 aAβ	0.51 aAδ

Soluble 3.04 bAβ 2.03 bAβ 2.37 bAβ 7.50 aAβ 5.04 aBα 8.25 aAβ

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ⁽¹⁾Letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e fração, letras minúsculas comparam as áreas dentro de cada fração e espécie e as letras gregas comparam a fração dentro de cada área e espécie. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% (P <0,05).

Tabela 4. Frações subcelulares do Mn em folhas e raízes de *P. plicatum*, *P. notatum* e *A. compressus*, cultivadas em solo de campo nativo e vinhedo.

Fractions	Leaf Mn concentration (mg kg ⁻¹)					
	NF			VN		
	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatum</i>	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatum</i>
Cell wall	7.76 aCα ⁽¹⁾	40.77 aBα	76.41 aAα	7.31 aBα	10.39 bBα	67.66 bAα
Plastids and nucleus	0.81 aAα	4.59 aAγ	10.16 aAγ	0.39 aBα	1.09 aBα	10.69 aAγ
Mitochondria	0.26 aAα	1.49 aAγ	3.89 aAγ	0.13 aAα	0.31 aAα	3.72 aAγ
Soluble	6.18 aCα	23.99 aBβ	54.71 aAβ	4.45 aBα	5.23 bBα	42.92 bAβ

Fractions	Root Mn concentration (mg kg ⁻¹)					
	NF			VN		
	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatum</i>	<i>A. compressus</i>	<i>P. notatum</i>	<i>P. plicatum</i>
Cell wall	43.51 aAα	29.23 aBα	28.97 aBα	33.08 bAα	11.71 bCα	14.38 bBα
Plastids and nucleus	2.45 aAγ	1.52 aAγ	1.40 aAγ	1.53 aAγ	0.51 aAγ	0.87 aAγ
Mitochondria	0.43 aAγ	0.07 aAγ	0.19 aAγ	0.33 aAγ	0.20 aAγ	0.28 aAγ
Soluble	12.62 aAβ	5.20 aBβ	7.27 aBβ	9.70 bAβ	4.41 aBβ	5.68 aBβ

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ⁽¹⁾Letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e fração, letras minúsculas comparam as áreas dentro de cada fração e espécie e as letras gregas comparam a fração dentro de cada área e espécie. Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% (P <0,05).

Material suplementar

Figura S1. Esquema da realização de coleta de solo para a condução do experimento.



Fonte: elaborado pelos autores

Tabela S1. Teores totais de Cu, Zn e Mn acumulado no tecido de *P. plicatulum*, *P. notatum* e *A. compressus*.

	Cu ($\mu\text{g rhizobox}^{-1}$)		Zn ($\mu\text{g rhizobox}^{-1}$)		Mn ($\mu\text{g rhizobox}^{-1}$) (¹)ns
	NF	VN	NF	VN	
<i>A. compressus</i>	1164.09aA ⁽²⁾	1242.42aA	679.44bC	1345.03aC	1794.85C
<i>P. notatum</i>	429.45bB	935.55aB	1344.97bB	1957.13aB	2982.39B
<i>P. plicatulum</i>	523.86bB	973.03aB	1583.41bA	3924.31aA	5036.71A

Fonte: elaborado pelos autores

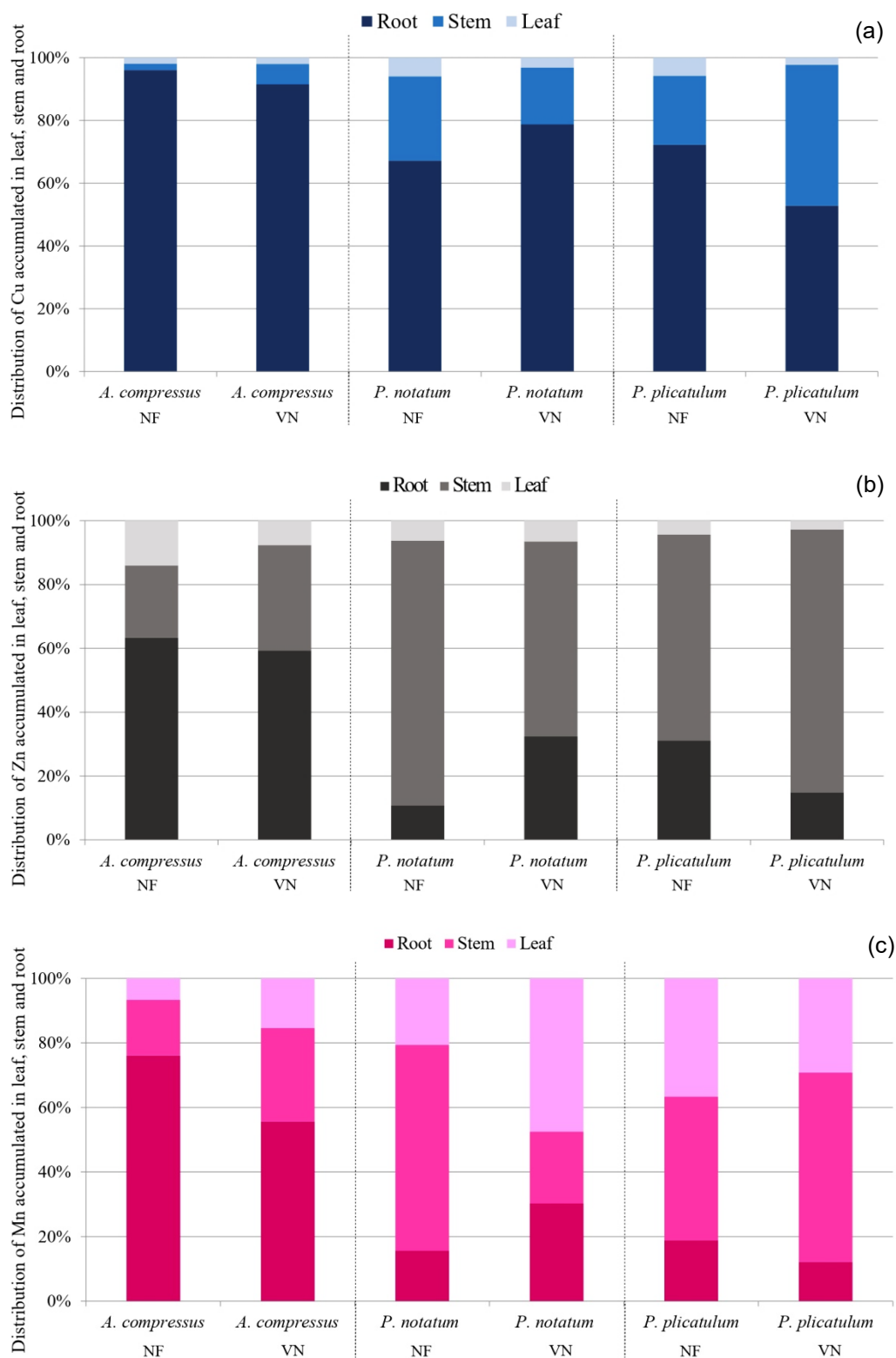
Legenda: (¹)ns interação não significativa; (²)Letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e as letras minúsculas comparam as espécies entre as áreas. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$).

Tabela S2. Fator de translocação (FT), fator de bioconcentração (BCF) de Cu, Zn e Mn, e índice de tolerância (TI) para as plantas que cresceram no solo do vinhedo.

	FT			BCF			TI
	Cu	Zn	Mn	Cu	Zn	Mn	
<i>A. compressus</i>	0.05	0.31	0.49	12.46	26.50	2.31	0.73
<i>P. notatum</i>	0.21	1.39	2.86	4.62	12.05	1.26	0.95
<i>P. plicatulum</i>	0.16	0.97	2.51	6.65	23.20	1.83	0.85

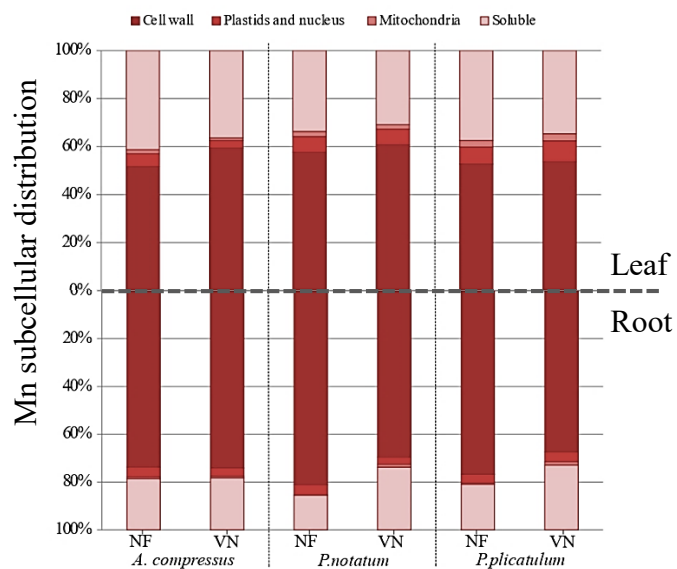
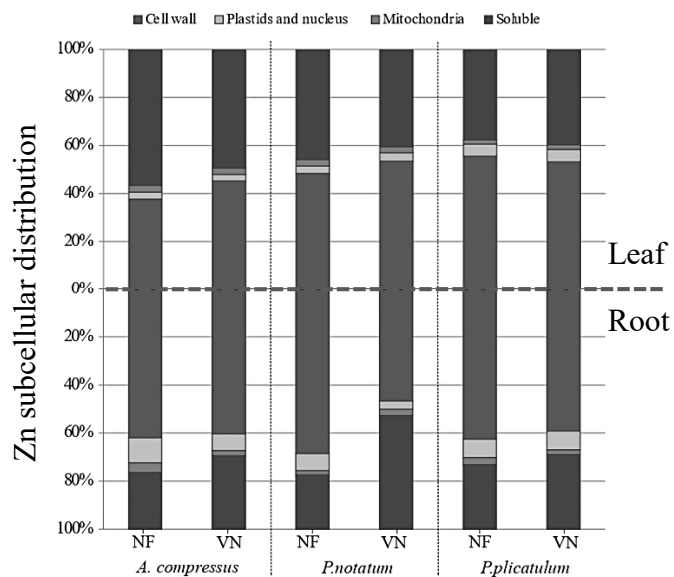
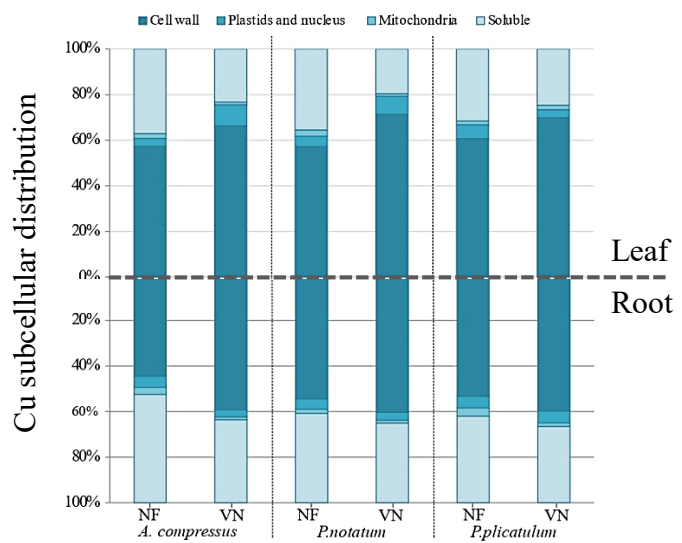
Fonte: elaborado pelos autores

Figura S2. Distribuição (%) de Cu (a), Zn (b) e Mn (c) acumulado em folhas, caules e raízes nas espécies *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*, cultivadas no solo de vinhedo (VN) e campo nativo (NF).



Fonte: elaborado pelos autores

Figura S3. Distribuição (%) de Cu (a), Zn (b) e Mn (c) nas frações subcelulares, parede celular, nucleos e plastídeos, mitocondria e fração solúvel em folhas e raízes das espécies *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatum*, cultivadas no solo de vinhedo (VN) e campo nativo (NF).



Fonte: elaborado pelos autores

Tabela S3. Teores de nutrientes em órgãos de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*.

Species	Treatments	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Mn	Fe
		Leaf (g kg ⁻¹)							
<i>A. compressus</i>	NF	1.22bB ⁽²⁾	9.30aB	2.74bC	2.18bB	6.75bB	29.75bB	42.19bC	159.37aA
	VN	1.79aA	9.11aA	4.78aB	5.30aA	12.50aA	52.91aA	121.05aB	188.18aA
<i>P. notatum</i>	NF	1.51aA	11.39aA	3.92bB	2.86bB	12.01aA	41.03bA	315.36bB	191.03aA
	VN	1.49aB	7.19bB	8.50aA	5.29aA	11.36aA	47.92aB	461.21aA	145.39bB
<i>P. plicatulum</i>	NF	1.20aB	8.18bB	5.72aA	3.54aA	11.22aA	25.41bB	688.84aA	173.23aA
	VN	1.39aB	10.02aA	3.60bC	2.55bB	7.13bB	35.33aC	474.54bA	145.07aB
		Stem (g kg ⁻¹)							
<i>A. compressus</i>	NF	ns ¹	4.43bC	1.04bB	ns	3.95aB	26.40bB	59.71aC	35.37aB
	VN	ns	6.86aB	1.41aB	ns	7.58aC	41.92aC	43.61aB	47.09aC
<i>P. notatum</i>	NF	ns	8.18bB	1.05aB	ns	11.35bA	105.93bA	185.38aB	65.01aA
	VN	ns	10.17aA	0.97aC	ns	20.62aB	140.81aB	72.06bB	90.21aB
<i>P. plicatulum</i>	NF	ns	9.61aA	2.04bA	ns	11.58bA	108.50bA	233.13aA	92.90bA
	VN	ns	9.96aA	2.74aA	ns	29.76aA	219.67aA	201.33aA	237.18aA
		Root (g kg ⁻¹)							
<i>A. compressus</i>	NF	ns	ns	1.70bA	1.14bA	134.48bA	52.54bB	ns	498.18bB
	VN	ns	ns	2.80aA	2.91aB	217.81aA	153.19aA	ns	773.81aA
<i>P. notatum</i>	NF	ns	ns	1.55bA	1.05bA	76.14aB	39.95bB	ns	466.42aB
	VN	ns	ns	2.26aB	1.99aC	80.86aC	69.64aB	ns	634.61aA
<i>P. plicatulum</i>	NF	ns	ns	1.88aA	1.32bA	72.78bB	90.10bA	ns	989.32aA
	VN	ns	ns	2.06aB	3.33aA	116.22aB	134.12aA	ns	672.09bA

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ¹ns= Interação não significativa. ⁽²⁾Letras maiúsculas comparam as espécies dentro de cada área e as letras minúsculas comparam as espécies entre as áreas. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% (P <0,05).

Tabela S4. Efeito simples de nutrientes no caule e raízes de *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum*.

Species	Mg		P		Mn	
	Stem (g kg ⁻¹)	Root (g kg ⁻¹)	Stem (g kg ⁻¹)	Root (g kg ⁻¹)		
<i>A. compressus</i>	0.93b ⁽¹⁾	1.45b	0.75a	4.98b	177.60a	
<i>P. notatum</i>	1.35a	1.68b	0.77a	7.90a	110.36b	
<i>P. plicatulum</i>	1.40a	2.55a	0.77a	8.44a	158.74a	
Treatments	NF	1.06b	1.57b	0.73b	6.30b	165.35a
	VN	1.40a	2.22a	0.79a	7.92a	132.45a

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: ⁽¹⁾Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5%

(P <0,05).

2.4 DISCUSSÃO GERAL

O aumento nos teores de Cu, Zn e Mn em vinhedos na Campanha Gaúcha ocorrem principalmente pelo uso de fungicidas, utilizados para o controle de doenças em videiras, que contém esses metais na composição. O aumento nos teores de Cu, Zn e Mn disponíveis em solos de vinhedos com mais de 40 anos de cultivo causaram toxidez às plantas nativas do bioma Pampa. A toxidez, provavelmente foi potencializada pelo aumento simultâneo nos teores do Cu, Zn e Mn, associado a um solo com baixos teores de argila, matéria orgânica e capacidade de troca de cátions (CTC). Além disso, o revolvimento do solo, após a erradicação do vinhedo, aumentou os teores de Cu e Zn em maiores profundidades e diminuiu o teor de matéria orgânica na camada de 0-0,2 m. Isso porque, com o revolvimento do solo há o aumento da mineralização da matéria orgânica e, por consequência, aumento da disponibilidade e mobilidade de metais, que estavam complexados (TRENTIN et al., 2019).

Em condições e teores de campo, o impacto do aumento dos teores do Cu, Zn e Mn sobre a vegetação nativa do bioma Pampa preservada na entrelinha dos vinhedos foram avaliados. O aumento nos teores de Cu, Zn e Mn contribuíram para a menor produção de massa seca da parte aérea das plantas nativas do bioma Pampa (Estudo I e II). No entanto, a massa seca de raízes não alterou em *A. compressus*, *P. notatum* e *P. plicatulum* quando cultivadas no solo do NF e VN (Estudo II). O aumento nos teores dos metais no solo também contribuíram para a menor riqueza e diversidade de espécies nos vinhedos (Estudo I). Isso porque, os metais podem diminuir a concentração de clorofila como observado em *A. compressus* e *P. notatum* no Estudo II, causar variação no estado nutricional (Estudo I e II) e estresse oxidativo como observado principalmente em raízes do *A. compressus* e *P. notatum* (Estudo II). Isso demonstra o efeito tóxico causado pelo excesso e interação entre os metais Cu, Zn e Mn. Além disso, o Zn e o Mn apresentaram relações antagônicas e os teores

disponíveis desses metais no solo são as variáveis mais importantes para explicar a diferença de biomassa, riqueza de espécies e biodiversidade em áreas de vinhedos. Porém, além dos metais, o teor de outros nutrientes como P, K, Ca e Mg também são maiores em vinhedos. Isso por causa de adubações realizadas nos vinhedos para incrementar os teores em solos e, por consequência, potencializar o aumento da produtividade de uva. Dessa forma, no Estudo I observamos que essa maior fertilidade do solo, principalmente o aumento de P, também contribui para a menor diversidade de espécies, principalmente no inverno.

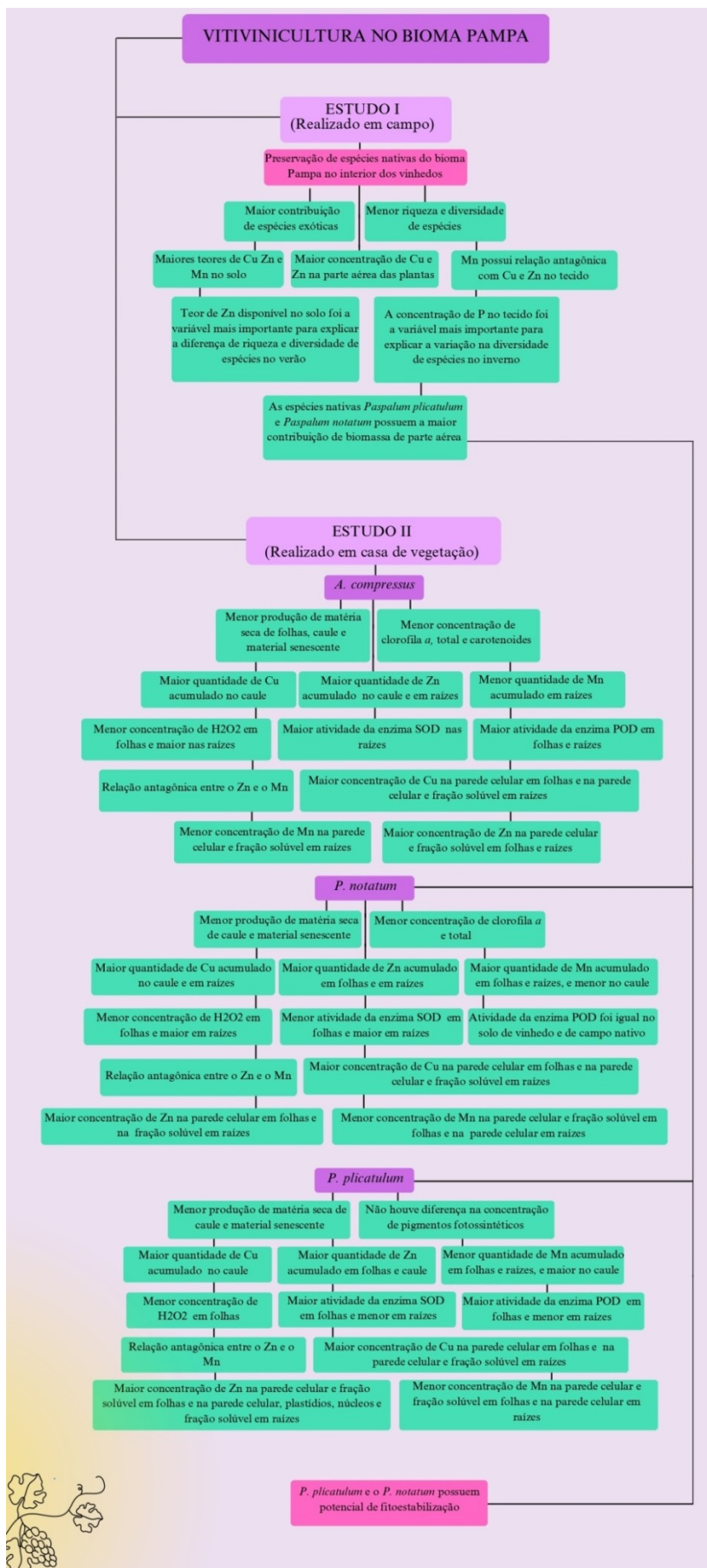
As espécies nativas do bioma Pampa, *P. plicatulum* e *P. notatum* possuem a maior contribuição de biomassa da parte aérea nos vinhedos (Estudo I). Devido essa maior contribuição de biomassa nos vinhedos, essas espécies acumularam as maiores quantidades de Cu, Zn e Mn na parte aérea (Estudo I), mas também apresentaram alto fator de bioconcentração para os três metais (Estudo I e II). Além disso, no estudo 2 ficou mais claro que o *P. plicatulum* e *P. notatum* utilizam mecanismos de tolerância eficientes em diminuir a toxidez dos metais. Os mecanismos de tolerância utilizados por essas espécies neste estudo foram, evitar o acúmulo de Cu, Zn e Mn em folhas, o que foi feito pela compartimentalização dos metais em áreas metabolicamente menos ativas, como parede celular e vacúolo, o que diminui a atividade dos íons livres. Essas espécies também aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e POD para combater o estresse oxidativo em folhas e raízes. Assim, o *P. plicatulum* e *P. notatum* são as espécies mais indicadas para a fitoestabilização de Cu, Zn e Mn em áreas de vinhedos no bioma Pampa. Mas também, podem ser espécies chaves para futuras restaurações nessas áreas. Por outro lado, a espécie nativa do bioma Pampa *A. compressus* apresentou o menor índice de tolerância, o que indica ser a espécie mais sensível ao aumento nos teores de Cu, Zn e Mn no solo.

Com nossos resultados fica claro a necessidade de reduzir ou até mesmo suspender a entrada de Cu, Zn e Mn em vinhedos, para não agravar o problema. Por outro lado, a manutenção das espécies nativas e enriquecimento das entrelinhas dos vinhedos do bioma Pampa, com as espécies nativas *P. plicatulum* e *P. notatum* pode amenizar de forma eficaz a toxidez causada pelo excesso de Cu, Zn e Mn em áreas já contaminadas. Além disso, a manutenção de plantas em vinhedos é uma forma de aumentar o acúmulo de carbono, ciclagem de nutrientes e proteção de solos, que fisicamente são arenosos e, portanto, frágeis. Dessa forma, o manejo nas áreas de vinhedos devem priorizar a manutenção das espécies nativas na entrelinha de vinhedos e o revolvimento deve ser evitado em áreas do bioma Pampa. Também, conhecer os mecanismos de tolerância/adaptação é importante, para que possam ser incorporados futuramente em programas de melhoramento genético de plantas.

Dessa forma, conhecer o impacto dos altos teores de Cu, Zn e Mn sobre a vegetação nativa do bioma Pampa, os mecanismos de tolerância e o potencial para fitorremediar os solos contaminados dessas espécies é importante para realizar futuras intervenções nessas áreas.

Também é importante destacar que a manutenção da vegetação nativa do bioma Pampa pode ser uma estratégia para agregar valor aos sucos, vinhos e espumantes, pois as uvas estarão sendo produzidas em vinhedos que preservam o bioma e geram menores impactos ambientais que outras culturas e suas práticas agrícolas promovem. Como exemplo, o sistema plantio direto, onde todas as espécies nativas são dessecadas e mortas. Além disso, dificilmente, por causa da pressão da expansão da agricultura, será possível manter apenas o bioma Pampa da Campanha Gaúcha, mas cada vez mais é necessário estimularmos sistemas de cultivos, como a viticultura e fruticultura, que possibilitam a preservação de várias espécies nativas e assim o patrimônio genético brasileiro. O resumo dos resultados e informações desenvolvidas e discutidas nesse estudo estão organizadas na figura 1.

Figura 1. Resumo dos resultados obtido nos estudos I e II da dissertação.



Fonte: elaborado pelos autores

3. CONCLUSÕES

3.1 CONCLUSÕES

Os tratamentos fitossanitários na vitivinicultura aumentam os teores de Cu, Zn e Mn em solos, e também na parte aérea e raízes das espécies que coabitam as entrelinhas dos vinhedos. Isso promove maior contribuição de espécies exóticas, menor riqueza e diversidade das espécies nos vinhedos.

As espécies nativas expressaram mecanismos de tolerância, quando cultivadas com altos teores de Cu, Zn e Mn, (i) acumular os metais no caule e/ou raízes, para evitar que cheguem as folhas onde os efeitos dos metais são mais nocivos; (ii) compartimentalizar o excesso dos metais em áreas metabolicamente menos ativa como parede celular e vacúolo; (iii) aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes SOD e POD em condições de estresse oxidativo.

As espécies nativas do bioma Pampa, *P. plicatulum* e *P. notatum* possuem a maior distribuição e contribuição de biomassa nos vinhedos, acumulam as maiores concentrações de Cu, Zn e Mn no tecido e são mais tolerantes aos metais. Dessa forma, são as espécies mais indicadas para a fitoestabilização de Cu, Zn e Mn em áreas de vinhedos no bioma Pampa.

3.2 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

I- Acompanhar a dinâmica da vegetação nativa do bioma Pampa preservada no interior de vinhedos de diferentes idades e ao longo dos anos.

II-Determinar níveis críticos e faixas de suficiência de Cu, Zn e Mn para as espécies nativas do bioma Pampa;

III- Avaliar em condições de campo, se o enriquecimento dos vinhedos com as espécies recomendadas nesse estudo diminuem a disponibilidade de Cu, Zn e Mn no solo ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

ALEJANDRO, Santiago et al. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 300, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00300>.

ANDRADE, Bianca O. et al. 12,500+ and counting: biodiversity of the Brazilian Pampa. **Frontiers of Biogeography**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21425/F5FBG59288>.

BAKER, Alen JM; BROOKS, RR1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery.**, v. 1, n. 2, p. 81-126, 1989.

BALAFREJ, Habiba et al. Zinc hyperaccumulation in plants: A review. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 562, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9050562>.

BASHIR, Khurram et al. Roles of subcellular metal homeostasis in crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 6, p. 2083-2098, 2021.

BORTOLUZZI, Edson Campanhola et al. Accumulation and precipitation of Cu and Zn in a Centenarian Vineyard. **Soil Science Society of America Journal**, v. 83, n. 2, p. 492-502, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2018.09.0328>.

BRUNETTO, Gustavo et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.104>.

BRUNETTO, Gustavo et al. Copper and zinc fractions in the profile of an Inceptisol cultivated with apple in southern Brazil. **Bragantia**, v. 77, p. 333-347, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017033>.

CAMPILLO-CORA, C. et al. Copper and zinc in rhizospheric soil of wild plants growing in long-term acid vineyard soils. Insights on availability and metal remediation. **Science of The Total Environment**, v. 672, p. 389-399, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.301>.

CASALI, Carlos Alberto 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, p. 1479-1487, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000400012>.

CESCO, Stefano et al. A smart and sustainable future for viticulture is rooted in soil: How to face Cu toxicity. **Applied Sciences**, v. 11, n. 3, p. 907, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/app11030907>.

CHOMENKO, Luiza; BENCKE, Glayson A.; BECKER, Adriano Nygaard. Nosso pampa desconhecido. **Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul**, 2016.

COUTO, Rafael da Rosa et al. Accumulation and distribution of copper and zinc in soils following the application of pig slurry for three to thirty years in a microwatershed of southern Brazil. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 5, p. 593-616, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2015.1074183>.

CQFS RS/SC- **Comissão de Química e Fertilidade do Solo. Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. SBRS/Núcleo Regional Sul, Porto Alegre. 2016.

DA MOTA, Fernando Silveira. Identificação da região com condições climáticas para produção de vinhos finos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 687-694, 1992.

DA SILVA MENEZES, Luciana et al. Plant species richness record in Brazilian Pampa grasslands and implications. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, p. 817-823, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-018-0492-6>.

DE CONTI, L. et al. Photosynthesis and growth of young grapevines intercropped with native grasses in soils contaminated with copper. **In: VIII International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops 1217**. 2017. p. 179-184. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1217.23.

DE CONTI, Lessandro et al. Growth and chemical changes in the rhizosphere of black oat (*Avena strigosa*) grown in soils contaminated with copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 19-27, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.045>.

DE CONTI, Lessandro et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.134>.

DE CONTI, Lessandro. **Plantas de cobertura do solo e videiras: toxidez, fitorremediação e mecanismos de tolerância ao excesso de cobre**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

De Mello, L. M. R., Machado, C. A. E. Vitivinicultura brasileira: panorama 2020. Comunicado Técnico, 2021.

DE OLIVEIRA, Tamara Esteves et al. Agricultural land use change in the Brazilian Pampa Biome: The reduction of natural grasslands. **Land use policy**, v. 63, p. 394-400, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.02.010>.

DRESCHER, Gerson Laerson et al. Copper and Zinc fractions and adsorption in sandy soil with long-term pig manure application. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 68, n. 14, p. 1930-1946, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2021.1941904>.

DRESSENO, André LP et al. Negative effects of an invasive grass, but not of native grasses, on plant species richness along a cover gradient. **Austral Ecology**, v. 43, n. 8, p. 949-954, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/aec.12644>.

FACCO, Daniela Basso et al. Chemical speciation of copper and manganese in soil solution and young grapevine growth in copper contaminated soil with amendment application. **Pedosphere**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.06.060>.

FERREIRA, Guilherme Wilbert et al. Effect of organic and mineral fertilizers applications in pasture and no-tillage system on crop yield, fractions and contaminant potential of Cu and Zn. **Soil and Tillage Research**, v. 225, p. 105523, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105523>.

FLOGEAC, Karine; GUILLON, Emmanuel; APLINCOURT, Michel. Adsorption of several metal ions onto a model soil sample: Equilibrium and EPR studies. **Journal of colloid and interface science**, v. 286, n. 2, p. 596-601, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.01.027>.

FLORES, Shana Sabbado. A Região dos" Vinhos da Campanha" e suas Perspectivas de Sustentabilidade. **Territoires du vin**, n. 9, 2018.

FU, Xiaoping et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 103-107, 2011.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *ejmp & ep (European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection)*, v. 3, n. 1, p. 58-66, 2003.

GHAZARYAN, Karen et al. Copper phytoremediation potential of wild plant species growing in the mine polluted areas of Armenia. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 491-501, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.070>.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.

GIROTTTO, Eduardo. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas cultivadas em solos com acúmulo de cobre e zinco**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

GUPTA, Neha et al. Trace elements in soil-vegetables interface: translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration-a review. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 2927-2942, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.047>.

GUPTA, Neha; RAM, Hari; KUMAR, Balwinder. Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, p. 89-109, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9390-1>.

HAMMERSCHMITT, Rodrigo K. et al. Copper and zinc distribution and toxicity in 'Jade'/'Genovesa' young peach tree. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108763, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108763>.

HASANUZZAMAN, Mirza et al. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: a review of recent experimental evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8695, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>.

HE, Langjun et al. Integration of manganese accumulation, subcellular distribution, chemical forms, and physiological responses to understand manganese tolerance in *Macleaya cordata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 39017-39026, 2022.

HUANG, Jingxin et al. Phosphorus is more effective than nitrogen in restoring plant communities of heavy metals polluted soils. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115259, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115259>.

HUMMES, Ana Paula et al. Transfer of copper and zinc from soil to grapevine-derived products in young and centenarian vineyards. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4198-6>.

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. 4th ed. 2011.

KAUR, Harmanjit; GARG, Neera. Zinc toxicity in plants: a review. **Planta**, v. 253, n. 6, p. 129, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03642-z>.

KENNEDY, Theodore A. et al. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. **Nature**, v. 417, n. 6889, p. 636-638, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature00776>.

KOMÁREK, Michael et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environment international**, v. 36, n. 1, p. 138-151, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.005>.

KUMAR, Vinod et al. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, p. 127810, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>.

KUMPIENE, Jurate; LAGERKVIST, Anders; MAURICE, Christian. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments—a review. **Waste management**, v. 28, n. 1, p. 215-225, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>.

KÜPPER, Hendrik; ANDRESEN, Elisa. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metalomics**, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016.

LAMBERS, Hans et al. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. **Trends in plant science**, v. 20, n. 2, p. 83-90, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.007>.

LAMBERS, Hans et al. Phosphorus nutrition of phosphorus-sensitive Australian native plants: threats to plant communities in a global biodiversity hotspot. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. cot010, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/cot010>.

LAURENT, Céline et al. Increased soil pH and dissolved organic matter after a decade of organic fertilizer application mitigates copper and zinc availability despite contamination. **Science of the Total Environment**, v. 709, p. 135927, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135927>.

MALEKI, Mahmood; GHORBANPOUR, Mansour; KARIMAN, Khalil. Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. **Plant Gene**, v. 11, p. 247-254, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.006>.

MARASTONI, Laura et al. Synergism and antagonisms between nutrients induced by copper toxicity in grapevine rootstocks: Monocropping vs. intercropping. **Chemosphere**, v. 214, p. 563-578, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.127>.

MARQUES, Anderson Cesar Ramos et al. Physiological and biochemical characterization of copper-toxicity tolerance mechanism in grass species native to Pampa Biome and Atlantic Forest for use in phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 2, p. 5076-5088, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22570-3>.

MARSCHNER, H. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press. 2012.

MATANZAS, N. et al. Phytoremediation potential of native herbaceous plant species growing on a paradigmatic brownfield site. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, p. 1-14, 2021.

MENGUE, Vagner Paz et al. LAND-USE and land-cover change processes in Pampa biome and relation with environmental and socioeconomic data. **Applied Geography**, v. 125, p. 102342, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2020.102342>.

MIOTTO, Alcione et al. Copper accumulation and availability in sandy, acid, vineyard soils. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 48, n. 10, p. 1167-1183, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1341908>.

MIOTTO, Alcione. **Cobre em solos arenosos sob vinhedos e resposta bioquímica-fisiológica de videiras em produção**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. **Pampa**. [s. 1.], 2020. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biomas/pampa.html>. Acesso em: 05 Nov. 2021.

MORAIS, Gildean Portela. **Fracionamento e quantificação de limites críticos de transferência de cobre e zinco para a solução de solos com diferentes teores de argila e matéria orgânica**. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

MORSCH, Letícia et al. Root system structure as a criterion for the selection of grapevine genotypes that are tolerant to excess copper and the ability of phosphorus to mitigate toxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 171, p. 147-156, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.034>.

MUSCAS, Enrico et al. Effects of vineyard floor cover crops on grapevine vigor, yield, and fruit quality, and the development of the vine mealybug under a Mediterranean climate. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 237, p. 203-212, 2017.

NOOR, Iqra et al. Phosphorus confers tolerance against manganese toxicity in *Prunus persica* by reducing oxidative stress and improving chloroplast ultrastructure. **Chemosphere**, v. 291, p. 132999, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132999>.

OVERBECK, Gerhard E. et al. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 9, n. 2, p. 101-116, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2007.07.005>.

OVERBECK, Gerhard E. et al. Conservation in Brazil needs to include non-forest ecosystems. **Diversity and distributions**, v. 21, n. 12, p. 1455-1460, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ddi.12380>.

PINTO, A. P. et al. Biological approaches for remediation of metal-contaminated sites. **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants**, Volume 3, p. 65-112, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40148-5_3.

ROESCH, Luiz Fernando Wurdig et al. The Brazilian Pampa: a fragile biome. **Diversity**, v. 1, n. 2, p. 182-198, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/d1020182>.

ROVIELLO, Valentina et al. Assessment of Copper and Heavy Metals in Family-Run Vineyard Soils and Wines of Campania Region, South Italy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, p. 8465, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18168465>.

SANTOS, Elcio Ferreira et al. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant physiology and biochemistry**, v. 113, p. 6-19, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.022>.

SARMENTO, Marcelo Benevenga. Diagnóstico da Vitivinicultura na Campanha Gaúcha. **Revista Científica Agropampa**, v. 1, n. 1, 2016.

SCHWALBERT, Raissa et al. How do native grasses from South America handle zinc excess in the soil? A physiological approach. **Environmental and Experimental Botany**, v. 195, p. 104779, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104779>.

SCHWALBERT, Raíssa et al. Soil tillage affects soybean growth and promotes heavy metal accumulation in seeds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 216, p. 112191, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112191>.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da et al. Potential phytoremediation of Pampa biome native and invasive grass species cohabiting vineyards contaminated with Cu in Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 56, p. 85376-85388, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21738-1>.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da et al. Spatial variation of herbaceous cover species community in Cu-contaminated vineyards in Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13348-13359, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07851-z>.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da. **Variabilidade espacial da comunidade vegetal e mecanismos de tolerância de espécies de plantas de cobertura do solo presentes em vinhedos com altos teores de cobre**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

SONODA, Kent et al. Copper and zinc in vineyard and orchard soils at millimeter vertical resolution. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 958-962, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.486>.

TEODORO, Manuel et al. Seasonal fluctuations of Zn, Pb, As and Cd contents in the biomass of selected grass species growing on contaminated soils: Implications for in situ phytostabilization. **Science of The Total Environment**, v. 703, p. 134710, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134710>.

THIESEN, Leonardo Antonio et al. Subcellular distribution and physiological responses of native and exotic grasses from the Pampa biome subjected to excess manganese. **Chemosphere**, v. 310, p. 136801, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136801>.

TIECHER, Tadeu L. et al. Effects of zinc addition to a copper-contaminated vineyard soil on sorption of Zn by soil and plant physiological responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 109-119, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.016>.

TIECHER, Tadeu L. et al. The interaction of high copper and zinc doses in acid soil changes the physiological state and development of the root system in young grapevines (*Vitis vinifera*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 985-994, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.074>.

TIECHER, Tadeu L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.026>.

TIECHER, Tadeu Luis. **Alterações fisiológicas em milho cultivado em solo com alto teor de cobre e submetido à aplicação de zinco**. 2014. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria.

TIECHER, Tadeu Luis. **Cobre e zinco no solo: crescimento e parâmetros fisiológicos em videiras jovens e aveia preta**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

TRENTIN, Edicarla et al. Plant species and pH dependent responses to copper toxicity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 196, p. 104791, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104791>.

TRENTIN, Edicarla et al. Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. **Chemosphere**, v. 226, p. 421-430, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.141>.

TRENTIN, Edicarla. **Seleção de porta-enxertos de videiras e amenizantes como estratégias para reduzir a fitotoxidez por cobre**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

TROIAN, Alessandra; FERREIRA, Rosimari Simas; HOFF, Débora Nayar. A vitivinicultura em Santana do Livramento/RS. **Revista Científica Agropampa**, v. 1, n. 1, p. 4-21, 2021.

WEIDENHAMER, Jeffrey D.; CALLAWAY, Ragan M. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of chemical ecology**, v. 36, p. 59-69, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9735-0>.

WOCH, Marcin W.; KAPUSTA, Paweł; STEFANOWICZ, Anna M. Variation in dry grassland communities along a heavy metals gradient. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 80-90, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1569-7>.

XIAO, Zehua et al. Effects of exogenous manganese on its plant growth, subcellular distribution, chemical forms, physiological and biochemical traits in *Cleome viscosa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p. 110696, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110696>.

YADAV, Krishna Kumar et al. Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: a review on application and future prospects. **Ecological engineering**, v. 120, p. 274-298, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.039>.

YADAV, Vaishali et al. Structural modifications of plant organs and tissues by metals and metalloids in the environment: A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 159, p. 100-112, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.047>.

YAN, An et al. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 359, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>.

YANG, Lan Peng et al. Effect of Cd on growth, physiological response, Cd subcellular distribution and chemical forms of *Koeleria paniculata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 160, p. 10-18, 2018.

YOTOVA, Galina et al. Phytoavailability of potentially toxic elements from industrially contaminated soils to wild grass. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 317-324, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.077>.

YRUELA, Inmaculada. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1071/FP08288>.

ANEXO A- PROTOCOLO DO FRACIONAMENTO SUBCELULAR DE METAIS PESADOS EM TECIDO VEGETAL

Metodologia de fracionamento de metais pesados a nível subcelular através da técnica de centrifugação diferencial (ZENG et al., 2011; FU et al., 2013; WANG et al., 2016; HUANG et al., 2017; SILVA et al., 2021).

Na técnica da centrifugação diferencial, o sobrenadante é girado a velocidades sucessivamente superiores, o que permite a separação dos componentes celulares conforme as suas densidades e tamanho. Assim, essa técnica permite isolar/purificar diferentes componentes celulares para poder analisá-las por métodos físicos e químicos, separadamente. Podendo-se obter estruturas subcelulares como parede celular, núcleo, plastídeos e mitocôndrias.

Inicialmente de forma delicada, deve-se fracionar a célula. Para isso, as células são suspensas em uma solução de pH e concentração de sais semelhantes as encontradas no interior das células. Após esse processo, a suspensão de células é submetida à centrifugação para provocar a lise (rompimento das membranas e/ou das paredes das células) das células. A mistura resultante é denominada de extrato celular e é submetida à força centrífuga por rotação.

A força centrífuga separa o extrato em duas frações:

- a) o *pellet*;
- b) e o sobrenadante.

No fundo do tubo se forma o *pellet*, que contém materiais mais pesados, como, por exemplo, os núcleos. Enquanto que, o líquido que envolve o *pellet* (sobrenadante) contém partículas mais leves, moléculas dissolvidas e íons. O sobrenadante pode ser centrifugado novamente a uma velocidade superior para obter um *pellet* com componentes celulares mais pesados como, por exemplo, as mitocôndrias e os cloroplastos. Além disso, os componentes celulares nos *pellets* ressuspendidos podem ser mais purificados pela centrifugação em gradiente de densidade. Dessa forma, a sacarose é utilizada para fazer a separação das organelas. De forma que, como a densidade das diferentes organelas é diferente, em cada centrifugação a densidade da organela se iguala a da sacarose e fica no fundo do tubo. Durante o processo, se utiliza TrisHCl e ditioneitol (DTT), que são inibidores das proteases, o que evita quebra de proteínas e mantém sua conformação.

Materiais e Equipamentos

1. Tubos Falcon;
2. Tubos de digestão;
3. Balança analítica ou balança de precisão;
4. Centrífuga com refrigeração (4°C), com capacidade de até 15000 rcf;
5. Solução tampão/extratora;
6. Becker;
7. Água ultrapura;
8. Nitrogênio líquido;
9. Almofariz e pistilo;
10. Seringas de 5 ml, aferidas ou micropipetas.

Lavar muito bem todas as vidrarias em solução limpeza de ácido nítrico.

Cálculos

Tampão de extração:

TRIS HCl 50mM (pH 7,5) - $C_4H_{11}NO_3.HCl$, PM= 157,60

1mM.....157,6mg/l

50mM..... x

X= 7.880 mg/l ou 7,88g/L pesar isso de tris e diluir em 1 litro de água

Fazer essa solução sempre no gelo. Ajustar o pH com HCl ou NaOH, somente nesta solução.

DTT 1mM - DITHIOTHREITOL - $C_4H_{10}O_2S_2$, PM= 154,25

1mM.....154,25 mg/l ou **0,154 g/l**

SACAROSE 250mM - $C_{12}H_{22}O_{11}$, PM= 342,3

1mM.....342,3 mg/l

250mM.....85.575 mg/l ou **85,57g/l**

Preparar o tampão sempre no dia que será feito o fracionamento, não guardar para uso posterior.

Procedimento

1. Coletar e imediatamente congelar o material vegetal fresco em nitrogênio líquido e, posteriormente armazená-los a temperaturas negativas;
2. Macerar o material fresco armazenado a temperaturas negativas utilizando almofariz e pistilo, mantendo sempre a amostra congelada;
3. Pesar 1,0 g de material macerado e armazenado a temperaturas negativas em tubo Falcon apropriado para a centrifuga a ser utilizada (Utilizar nitrogênio líquido para manter o material congelado durante o processo);
4. Preparar a solução tampão/extratora e demais materiais;
5. Utilizando almofariz e pistilo, homogeneizar a amostra macerada e pesada com 10 ml de solução tampão/extratora (homogenato);
6. Colocar novamente o homogenato no tubo Falcon e centrifugar por 5 min a 300 xg, a 4°C.
7. Transferir o sobrenadante resultante do item 6 para um novo tubo Falcon e o *pellet* no fundo do tubo corresponde a fração da parede celular (F1). Com auxílio de água ultrapura transferi-lo para os tubos de digestão e secar em estufa;
8. Centrifugar o sobrenadante por 20 min a 5000 xg, a 4°C;
9. Transferir o sobrenadante do item 8 para um novo tubo Falcon e o *pellet* no fundo do tubo corresponde a fração que contém núcleo e plastídeos (F2). Com auxílio de água ultrapura transferi-lo para os tubos de digestão e secar em estufa;
10. Centrifugar o sobrenadante por 30 min a 15000 xg, a 4°C;
11. O sobrenadante do item 10 deve ser transferido para um tubo de digestão e corresponde à fração solúvel (F4) (citoplasma, vacúolos ...), posteriormente secar em estufa e o *pellet* no fundo do tubo corresponde a fração mitocondrial (F3). Com auxílio de água ultrapura transferi-lo para os tubos de digestão e secar em estufa;
12. Esperar até que as quatro frações sequem na estufa a 70°C, até peso constante;
13. Submeter as frações à digestão nitroperclórica, na proporção de 3:1 (v/m);
14. Analisar as concentrações dos metais em cada fração por espectrofotometria de absorção atômica ou espectrofotometria de emissão atômica.

Referências

FU, Xiaoping et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 186, n. 1, p. 103–107, 2011.

HUANG, Guoyong et al. Accumulation and distribution of copper in castor bean (*Ricinus communis* L.) callus cultures: in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, p. 177-186, 2017.

SILVA, Isley Cristiellem Bicalho da. Variabilidade espacial da comunidade vegetal e mecanismos de tolerância de espécies de plantas de cobertura do solo presentes em vinhedos com altos teores de cobre. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Área de Concentração em Processos Químicos e Ciclagem de Elementos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo. Ano de obtenção: 2021. 150p. Dados não publicados.

WANG, Quan-Ying; LIU, Jing-Shuang; HU, Bo. Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees. **Environmental and Experimental Botany**, v. 123, p. 125-131, 2016.

ZENG, Fanrong et al. Subcellular distribution and chemical forms of chromium in rice plants suffering from different levels of chromium toxicity. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, n. 2, p. 249-256, 2011.