

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
Faculdade de Engenharia- Câmpus de Ilha Solteira

NAYANE CRISTINA PIRES BOMFIM

**DE MICRONUTRIENTES A ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS:
CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Canavalia ensiformis* E *Leucaena
leucocephala* EM RESPOSTA AO EXCESSO DE Cu E Fe NO SOLO**

Ilha Solteira

2024

NAYANE CRISTINA PIRES BOMFIM

**DE MICRONUTRIENTES A ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS:
CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Canavalia ensiformis* E *Leucaena
leucocephala* EM RESPOSTA AO EXCESSO DE Cu E Fe NO SOLO**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia- Câmpus de Ilha Solteira, para obtenção do título de doutora em Agronomia.

Linha de Pesquisa: Ecofisiologia, técnicas especiais e manejo cultural em sistemas de produção agrícola e florestal.

Liliane Santos de Camargos
Orientadora

Lucas Anjos de Souza
Coorientador

Ilha Solteira
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvida pela Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Bomfim, Nayane Cristina Pires.
B695m De micronutrientes a elementos potencialmente tóxicos: crescimento e produção de biomassa de *Canavalia ensiformis* e *Leucaena leucocephala* em resposta ao excesso de Cu e Fe no solo / Nayane Cristina Pires Bomfim. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024
121 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Especialidade: Sistemas de Produção, 2024

Orientador: Liliane Santos de Camargos
Coorientador: Lucas Anjos de Souza
Inclui bibliografia

1. Tolerância. 2. Biomassa. 3. Toxicidade. 4. Leguminosa. 5. Acúmulo. 6. Translocação.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A contaminação do solo por metais pesados ou elementos potencialmente tóxicos (EPTs), proveniente de resíduos industriais e agroindustriais, rejeitos de mineração, entre outros, é uma realidade global e de grande preocupação socioambiental. Estratégias, técnicas e tecnologias de remediação estão sendo estudadas ou atualizadas para diminuir, conter, remover ou remediar os focos de contaminação do solo por EPTs, como por exemplo, o cobre e o ferro.

Dentre várias tecnologias, a fitorremediação se destaca nesse cenário global por ser uma tecnologia verde (utiliza plantas) e sustentável, de baixo impacto ambiental, que pode ajudar na recuperação de áreas degradadas e estimular a cobertura vegetal por meio de plantas com alta produção de biomassa, possibilitando além da remoção de EPTs, também a melhoria de outros atributos do solo. Afim de alcançar sucesso através da fitorremediação, é necessário pesquisar plantas que não apenas tolerem as altas concentrações destes elementos, mas que se desenvolvem nestas condições e apresentem capacidade de estabilizar ou extrair os contaminantes do solo.

Nesse sentido, os dados aqui apresentados contribuem grandemente para a comunidade técnico – científica e socioambiental, por apresentar respostas fisiológicas de duas espécies de leguminosas sob estresse por EPTs: a tolerância dessas plantas, também, pode ser avaliada através da concentração de pigmentos fotossintetizantes e trocas gasosas; concentração de cobre e ferro biodisponível no solo para as plantas que excedam o limite tolerável de ambas as espécies e que podem ser utilizados como referência para estudos futuros (local e mundialmente) ou para servirem de referência a valores orientadores no Brasil.

Uma reflexão importante a respeito do tempo de cultivo ou tempo de condução experimental de espécies arbóreas submetidas a estresse por esses elementos em condições controladas ou em campo; conhecimento interdisciplinar, compreendendo a relação entre solo, EPT e espécie; abrindo caminho para outros eixos temáticos como (a) microbiologia, (b) produção de biomassa para geração de energia, produção de adubo verde e forragem; (c) estudos da expressão das metaloproteínas, proteínas de ligação a íons pela engenharia genética, por exemplo.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Soil contamination by heavy metals or potentially toxic elements (PTEs) from industrial and agro-industrial waste, mining tailings, among others, is a global reality and a major socio-environmental concern. Remediation strategies, techniques and technologies are being studied or updated to reduce, contain, remove or remedy sources of soil contamination by PTEs, such as copper and iron.

Among several technologies, phytoremediation stands out in this global scenario because it is a green (uses plants) and sustainable technology, with low environmental impact, which can help in the recovery of degraded areas and stimulate vegetation cover through plants with high biomass production, enabling, in addition to the removal of PTEs, the improvement of other soil attributes. In order to achieve success through phytoremediation, it is necessary to research plants that not only tolerate high concentrations of these elements, but that develop under these conditions and have the capacity to stabilize or extract contaminants from the soil.

In this sense, the data presented here contribute greatly to the technical-scientific and socio-environmental community, by presenting physiological responses of two species of legumes under stress by PTEs: the tolerance of these plants can also be assessed through the concentration of photosynthetic pigments and gas exchanges; concentration of copper and bioavailable iron in the soil for plants that exceed the tolerable limit of both species and that can be used as a reference for future studies (locally and worldwide) or to serve as a reference for guiding values in Brazil.

An important reflection regarding the cultivation time or experimental time of tree species subjected to stress by these elements in controlled conditions or in the field; interdisciplinary knowledge, understanding the relationship between soil, PTE and species; paving the way for other thematic axes such as (a) microbiology, (b) biomass production for energy generation, production of green manure and forage; (c) studies of the expression of metalloproteins, ion-binding proteins through genetic engineering, for example.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE:

DE MICRONUTRIENTES A ELEMENTOS
POTENCIALMENTE TÓXICOS: crescimento
e produção de biomassa de *Canavalia ensiformis*
e *Leucena leucocephala* em resposta ao excesso
de Cu e Fe no solo

AUTORA: NAYANE CRISTINA PIRES BOMFIM

ORIENTADORA: LILIANE SANTOS DE CAMARGOS

COORDENADOR: LUCAS ANJOS DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia,
área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LILIANE SANTOS DE CAMARGOS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Profa. Dra. SARA ADRIAN LOPEZ DE ANDRADE (Participação Virtual)
Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Profa. Dra. ELISA MONTEZE BICALHO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade Federal de Lavras
- UFLA



Documento assinado digitalmente
THAIS SOTO BONI
CPF: 24.046.2014-12-2832-0188
Verifique em: <https://validar.dig.br>



Documento assinado digitalmente
ELISA MONTEZE BICALHO
CPF: 23.741.0204-13-0120-0180
Verifique em: <https://validar.dig.br>

Profa. Dra. THAIS SOTO BONI (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha
Solteira - UNESP



Documento assinado digitalmente
THAIS SOTO BONI
CPF: 24.046.2014-12-2832-0188
Verifique em: <https://validar.dig.br>



Documento assinado digitalmente
MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO
CPF: 24.046.2014-12-0830-0188
Verifique em: <https://validar.dig.br>

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha
Solteira - UNESP

Ilha Solteira, 23 de abril de 2024

**Dedico este trabalho a minha família, e a todos
que acreditam que a ciência e a educação
transformam o indivíduo, a sociedade e o meio
ambiente.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita e Carlos Bomfim, a minha irmã, Nayelle Bomfim, ao meu parceiro e esposo, Eduardo Golfeto, agradeço por todo amor, afeto, respeito, admiração, torcida e apoio para que eu realizasse o doutorado e superasse as minhas próprias dificuldades.

A Prof.^a. Dra. Liliane Santos de Camargos, pela parceria de tantos anos, orientação, confiança e amizade.

Ao Laboratório de Fisiologia do Metabolismo Vegetal (LFMV) e Laboratório de Estudos em Morfologia e Anatomia Vegetal (LEMAV) e suas respectivas equipes (professoras e alunos), agradeço pela oportunidade de trabalho, aprendizado, apoio e colaboração para que a execução deste trabalho fosse possível.

Aos meus amigos, Tássia Ferreira, Jailson Aguilar e Patrícia Rosalem, agradeço pela amizade, apoio, cuidado, afeto, torcida, e colaboração crítica e intelectual dos meus (nossos) trabalhos.

Aos meus colegas de trabalho, Beatriz Silvério, Isabela Carvalho, Maiara Olívio, Maycon Araujo, Thalita Fisher e Mariana da Silva, agradeço pelo apoio, parceria e colaboração para que a realização deste fosse possível.

A Prof.^a. Dra. Aline Redondo Martins, agradeço pela colaboração, apoio, contribuição intelectual e confiança.

Ao Prof^o. Dr. Lucas Anjos de Souza, agradeço pela colaboração crítica e intelectual ao longo da Pós-Graduação.

A Dra Aline R. Coscione, agradeço pela colaboração, apoio técnico e revisão intelectual para a realização deste.

Aos Laboratórios de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas e aos respectivos técnicos, agradeço o apoio técnico e conhecimento compartilhado.

Aos servidores da UNESP – Campus de Ilha Solteira, Sílvia, Júnior, Luíz, Alvino, Marcelinho, Sidival, Adnilson, Diego, agradeço por sempre atenderem as demandas requisitadas e até mesmo as mais inesperadas.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela excelência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo (APR 2020/ 12421 -4 - LSC).

RESUMO

O aumento de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) no solo é preocupante, principalmente em solos agrícolas devido ao fator de bioacumulação. Cobre (Cu) e ferro (Fe) são micronutrientes, responsáveis por importantes funções no corpo vegetal, mas a alta disponibilidade desses elementos no solo podem causar contaminação do solo e toxicidade nas plantas. *Canavalia ensiformis* e *Leucaena leucocephala* tem sido alvo de estudos que exploram seu potencial de tolerância e fitorremediação a alguns EPTs, e o foco deste estudo é compreender as respostas fisiológicas (trocas gasosas, crescimento, tolerância, biomassa, acúmulo, translocação) destas espécies a elevados teores de Cu e Fe no solo, separadamente, e avaliar o crescimento de *L. leucocephala* ao excesso destes elementos no solo por 12 e 24 meses de cultivo (cultivo a longo prazo) em casa de vegetação. Os tratamentos 50, 150, 250 e 350 mg dm⁻³ de cada elemento (CuSO₄*5H₂O e FeSO₄*7H₂O), separadamente, foi incorporado ao solo (Oxisol) de cada unidade experimental (seis repetições por tratamento), além do controle. Sementes de *C. ensiformis* e *L. leucocephala* foram semeadas no solo enriquecido com os tratamentos em vasos de 4 e 10 dm³ de solo, respectivamente e após a emergência foram cultivadas em casa de vegetação por 90 dias (*C. ensiformis*); 12 e 24 meses (*L. leucocephala*) em delineamento inteiramente casualizado. Foram feitas avaliações biométricas (comprimento, diâmetro) trocas gasosas; peso fresco e seco dos órgãos (raiz, folhas e caules), quantificação de Cu e Fe nos órgãos das plantas e quantificação da biodisponibilidade dos elementos no solo, a partir desses dados os cálculos de tolerância, acúmulo e translocação foram realizados. *C. ensiformis* foi tolerante aos tratamentos de Fe e quanto ao Cu, apresentou tolerância até o tratamento 150 mg dm⁻³. A tolerância da espécie é dependente aos teores de clorofilas e trocas gasosas. Houve acúmulo de ambos os EPTs nas raízes e translocação para a parte aérea. *L. leucocephala* apresentou tolerância ao Cu e ao Fe até o tratamento 50 e 250 mg dm⁻³, respectivamente, em ambos os tempos de cultivo. O tempo de exposição ao EPT influenciou negativamente a biomassa de *L. leucocephala* submetidas ao Cu, diferentemente do Fe. *L. leucocephala* acumulou mais Cu ao longo do tempo, já o mesmo não aconteceu para as plantas submetidas ao Fe.

Palavras-chave: Tolerância, biomassa, toxicidade, leguminosa, acúmulo, translocação.

ABSTRACT

The increase in potentially toxic elements (PTEs) in the soil is worrying, especially in agricultural soils due to the bioaccumulation factor. Copper (Cu) and iron (Fe) are micronutrients, responsible for important functions in the plant body, but the high availability of these elements in the soil can cause soil contamination and toxicity in plants. *Canavalia ensiformis* and *Leucaena leucocephala* have been the target of studies that explore their tolerance and phytoremediation potential to some PTEs, and the focus of this study is to understand the physiological responses (gas exchange, growth, tolerance, biomass, accumulation, translocation) of these species to high Cu and Fe contents in the soil, separately, and evaluate the growth of *L. leucocephala* in excess of these elements in the soil for 12 and 24 months of cultivation (long-term cultivation) in a greenhouse. Treatments 50, 150, 250 and 350 mg dm⁻³ of each element (CuSO₄*5H₂O and FeSO₄*7H₂O), separately, were incorporated into the soil (Oxisol) of each experimental unit (six replications per treatment), in addition to the control. Seeds of *C. ensiformis* and *L. leucocephala* were sown in the soil enriched with the treatments in pots of 4 and 10 dm³ of soil, respectively and after emergence they were cultivated in a greenhouse for 90 days (*C. ensiformis*); 12 and 24 months (*L. leucocephala*) in a completely randomized design. Biometric assessments (length, diameter) gas exchange was performed; fresh and dry weight of the organs (roots, leaves and stems), quantification of Cu and Fe in plant organs and quantification of the bioavailability of the elements in the soil. Based on these data, calculations of tolerance, accumulation and translocation were carried out. *C. ensiformis* was tolerant to Fe treatments and as for Cu, it showed tolerance up to treatment 150 mg dm⁻³. The tolerance of the species is dependent on chlorophyll levels and gas exchange. There was accumulation of both PTEs in the roots and translocation to the shoot. *L. leucocephala* showed tolerance to Cu and Fe up to treatment 50 and 250 mg dm⁻³, respectively, at both cultivation times. The time of exposure to PTE negatively influenced the biomass of *L. leucocephala* subjected to Cu, unlike Fe. *L. leucocephala* accumulated more Cu over time, the same did not happen for plants subjected to Fe.

Keywords: Tolerance, biomass, toxicity, legume, accumulation, translocation.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);

CAC: concentração disponível de TE no solo depois do cultivo da espécie (mg Kg^{-1});

CBC: concentração disponível de TE no solo antes do cultivo da espécie (mg Kg^{-1});

CEC: concentração disponível de TE no solo depois do enriquecimento do solo (tratamentos) (mg Kg^{-1});

Ci: carbono interno ($\mu\text{mol mol}^{-1}$);

CiCa: razão entre carbono interno e externo ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);

Cu: cobre;

CUE: eficiência no uso de carbono ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);

D%: diferença da proporção (aumento ou diminuição) da disponibilidade de TE no solo em relação a proporção do tratamento controle (%);

D_{CAC}: D% do CAC (%);

D_{CBC}: D% do CBC (%);

DIC: delineamento inteiramente casualizado;

D_{soil}: densidade do solo (kg dm^{-3});

E: taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);

EIUA: eficiência intrínseca do uso da água ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$);

Fe: ferro;

Fig: figura;

gs: condutância estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);

ITR: índice de translocação;

LAC: acúmulo de TE na folha (μg ou mg órgão^{-1});

LDW: peso seco (biomassa) das folhas (g);

NL: número de folhas;

PCA: análises de componentes principais;

PRL: comprimento da raiz pivotante (cm);

PTEs: elemento potencialmente tóxico (s);

RAC: acúmulo de TE nas raízes (μg ou mg órgão^{-1});

RAP%: porcentagem de acúmulo de TE radicular (%);

RDW: peso seco da raiz (g);

RFW: peso fresco da raiz (g);

SAC: acúmulo de TE na parte aérea (folhas + caule) (μg ou mg órgão^{-1});

SAP%: porcentagem de acúmulo de TE na parte aérea (%);

SD: diâmetro do caule (cm^2);

SDW: peso seco da parte aérea (folhas + caule) (g);

SFW: peso fresco da parte aérea (folhas + caule) (g);

SL: comprimento do caule (cm);

StAC: acúmulo de TE no caule (μg ou mg órgão^{-1});

StDW: peso seco do caule(g);

T0: tratamento controle;

T150: tratamento 150 mg dm^{-3} de solo;

T250: tratamento 250 mg dm^{-3} de solo;

T350: tratamento 350 mg dm^{-3} de solo;

T50: tratamento 50 mg dm^{-3} de solo;

TAC: acúmulo de TE por toda planta (μg ou mg planta^{-1});

TDW: peso seco total da planta (g);

TE: elemento traço;

$\text{TEC}_{\text{leaves/stem/root}}$: concentração disponível de TE nas folhas, caule ou na raiz (mg Kg^{-1});

TEC_{soil} : concentração disponível de TE no solo (mg Kg^{-1});

TI: índice de tolerância;

TRL: comprimento total da raiz (cm);

V_{soil} : volume do solo utilizado (dm^3);

WUE: eficiência no uso da água ($\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$).

LISTA DE SÍMBOLOS:

$\approx$: aproximadamente;

$\pm$: mais ou menos;

μ : microgramas;

%: porcentagem

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO I:	
De micronutrientes a elementos potencialmente tóxicos: respostas fisiológicas de <i>Canavalia ensiformis</i> ao cobre e ao ferro	17
1. Introdução	18
2. Material e Métodos	19
2.1 Caracterização do solo	19
2.2 Tratamentos de Cobre e Ferro	20
2.3 Design experimental	21
2.4 Escolha do material vegetal	22
2.5 Análise de trocas gasosas	22
2.6 Coleta e determinação de pigmentos fotossintéticos	23
2.7. Biomassa e estimativa do teor de Cu e Fe na planta	23
2.8 Análise estatística	25
3. Resultados	26
3.1. Disponibilidade de Cu e Fe no solo	26
3.2. Pigmentos fotossintetizantes	27
3.3. Trocas gasosas	30
3.4. Parâmetros de crescimento	32
3.5. Biomassa seca e índices de fitorremediação	35
3.6. Acúmulo de Cu e Fe	39
3.7. Análise multivariada	41
4. Discussão	43
4.1. Cobre	43
4.2. Ferro	45
4.3. Respostas comuns ao Cu e ao Fe	46
4.4. Respostas diferentes	46
5. Conclusão	47
Referências	48
CAPÍTULO II:	
Respostas de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit, cultivada durante dois anos sob concentrações isoladas de cobre e ferro no solo: tolerância ou toxicidade?	57
1. Introdução	58
2. Material e Métodos	60
2.1 Caracterização do solo	60
2.2 Tratamentos de Cobre e Ferro	61
2.3 Design experimental	62
2.4 Escolha do material vegetal	63
2.5 Análise de trocas gasosas	63
2.6 Medidas de crescimento e coleta	64
2.7. Biomassa e estimativa do teor de Cu e Fe na planta	64
2.8 Análise estatística	66
3. Resultados	68
3.1 Cobre	68
3.1.1 Trocas gasosas	68
3.1.2 Parâmetros de crescimento	71
3.1.3 Biomassa e acúmulo de cobre	75
3.1.4 Índices de fitorremediação e disponibilidade de cobre no solo	78
3.1.5 Análises multivariadas	81
3.2 Ferro	83
3.2.1 Trocas gasosas	83
3.2.2 Parâmetros de crescimento	86
3.2.3 Biomassa e acúmulo de ferro	89
3.2.4 Índices de fitorremediação e disponibilidade de ferro no solo	91
3.2.5 Análises multivariadas	94
4. Discussão	96
5. Conclusão	104
Referências	105

CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
APÊNDICE A	116
APÊNDICE B	117
APÊNDICE C	118
APÊNDICE D	119
APÊNDICE E	120
APÊNDICE F	121

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas requerem elementos essenciais ao longo do seu ciclo para se desenvolverem, desde a germinação até a reprodução. Esses elementos são requeridos em baixas concentrações, chamados de micronutrientes, como: manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), e boro (B), entre outros. O Cu e o Fe participam e compartilham importantes funções dentro do corpo das plantas, devido a sua facilidade de aceitar e doar elétrons (propriedades redox), necessários para a catálise de reações biológicas como fotossíntese, respiração, e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ravet e Pilon 2013; Zhang, 2015; Garcia-Molina et al., 2020; Chia et al., 2023).

Com o aumento populacional; alta demanda por alimentos; avanço da urbanização, industrialização e da mineração tem aumentado a geração de diversos resíduos e rejeitos e consequentemente a acumulação de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) no solo é alarmante (Ahamad et al., 2021; Yadav et al., 2023). Os EPTs incluem os metais pesados ou elementos, os quais apresentam riscos à saúde de ecossistemas inteiros, devido a sua capacidade de bioacumulação na cadeia trófica, principalmente em solos agrícolas (Fasani et al., 2022).

As maiores fontes de contaminação por Cu e Fe no Brasil são a partir de rejeitos e subprodutos de mineração de Cu e Fe, além disso, o uso prolongado de fungicidas à base de Cu aplicados em cultivos de vinhedos e pomares, e há outras fontes como resíduos orgânicos e sólidos (Preston et al., 2016; Carmo et al., 2017; Santana et al., 2020; Cruz et al., 2022; Poggere et al., 2023).

Em concentrações ideais o Cu e o Fe são essenciais para o desenvolvimento normal em quase todos os organismos, mas, em concentrações elevadas podem ser considerados EPTs (Garcia-Molina et al., 2020). A alta disponibilidade de Cu e Fe no meio de cultivo ou acumulado em concentrações elevadas no corpo vegetal (células) ou em determinadas organelas podem ser tóxicos e causar danos nas plantas como redução de biomassa e produtividade (Connorton et al., 2017; Yang et al., 2018).

Kabata-Pendias (2000), apresentou concentrações aproximadas de Cu em tecido foliar maduro generalizado: concentrações suficientes ou normais de 5-30 mg kg⁻¹; excessivo ou tóxico de 20 a 100 mg kg⁻¹; tolerável em culturas agronômicas de 5-20 mg kg⁻¹. Foi sugerido um valor permissível de 20 mg kg⁻¹ de Cu no solo (Kumar et al., 2019), e 30 mg kg⁻¹ nas culturas alimentares (Sharma et al., 2018; Kumar et al., 2021), sendo

que de 25 a 40 mg kg⁻¹ de Cu no solo, com pH abaixo de 5,5, pode causar toxicidade nas plantas (Kabata-Pendias e Szteke, 2015).

A concentração comum de Fe na solução do solo varia de 30–550 µg L⁻¹, e pode estar acima de 2.000 µg L⁻¹ em solos muito ácidos (Kabata-Pendias e Szteke, 2015). O teor de Fe natural em grãos de cereais; plantas forrageiras e em alimentos varia de 30 a 100; 18 a 1000; e <1 a 70 mg kg⁻¹, respectivamente (Kabata-Pendias e Szteke, 2015). Outros autores relatam que concentrações acima de 500 mg kg⁻¹ de massa seca em tecidos foliares causam fitotoxicidade (Broadley et al., 2012; Siqueira-Silva et al., 2019). Altas concentrações de Fe podem ser tóxicas, dependendo da espécie, mas raramente esses teores nas plantas e nos diversos tipos de solos são citados.

O estresse por íons metálicos pode apresentar sinais aparentes de fitotoxicidade, já que esses elementos estão associados a alterações metabólicas e ultraestruturais nas plantas como: respiração, fotossíntese e abertura estomática (Smical et al., 2008). As respostas ao estresse metálico podem se manifestar a qualquer momento do ciclo de vida da planta e se agravarem após exposição prolongada (Bonanno e Giudice, 2010. Lai, 2014; Yadav et al., 2023). Essas e outras respostas dependem da tolerância de cada espécie a cada EPT, e além disso, dependem da concentração disponível de EPTs no solo e das propriedades físico-químicas desse solo. É importante estudar caso a caso (espécies) para identificar a tolerância e o impacto de cada EPT na dinâmica solo-planta.

A presente proposta consistiu em: (1) avaliar o potencial de tolerância e compreender as respostas fisiológicas (trocas gasosas, crescimento, biomassa, acúmulo, translocação) de duas leguminosas de hábitos diferentes, uma herbácea, usada como cobertura vegetal e adubo verde (*Canavalia ensiformis*) e a outra, arbórea, usada para recuperação de áreas degradadas por ser pioneira heliófila (*Leucaena leucocephala*), ambas com alta produção de biomassa, a elevados teores de Cu e Fe no solo, separadamente; (2) avaliar o crescimento de *L. leucocephala* ao excesso destes elementos no solo por 12 e 24 meses de cultivo (cultivo a longo prazo) em casa de vegetação; (3) avaliar se as espécies apresentam capacidade de acúmulo de ambos os EPTs em sua biomassa e potencial fitorremediador para Cu e Fe.

Compreender essas respostas entre espécies, elementos potencialmente tóxicos e solo apresenta grande relevância para a comunidade técnico – científica e socioambiental a nível nacional e global, devido a atual problemática de contaminação do solo por elementos potencialmente tóxicos, proveniente de resíduos industriais, agroindustriais, rejeitos de mineração, entre outros.

CAPÍTULO I:

De micronutrientes a elementos potencialmente tóxicos: respostas fisiológicas de *Canavalia ensiformis* ao cobre e ao ferro

Resumo

O aumento de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) no solo é preocupante, principalmente em solos agrícolas devido ao fator de bioacumulação. Cobre (Cu) e ferro (Fe) são micronutrientes, responsáveis por importantes funções no corpo vegetal, mas a alta disponibilidade desses elementos no solo podem causar contaminação do solo e toxicidade nas plantas, consequentemente podem ser considerados EPTs. A *Canavalia ensiformis* tem sido alvo de estudos que exploram seu potencial de tolerância e fitorremediação a EPTs e o foco deste estudo é compreender as respostas fisiológicas (pigmentos, trocas gasosas, crescimento, biomassa, acúmulo, translocação) desta espécie a elevados teores de Cu e Fe no solo, isoladamente e identificar qual EPT é mais prejudicial ao seu desenvolvimento. Dois experimentos (Cu e Fe) em delineamento inteiramente casualizado foram conduzidos concomitantemente em casa de vegetação. Os tratamentos 50, 150, 250 e 350 mg dm⁻³ de cada elemento (CuSO₄*5H₂O e FeSO₄*7H₂O) foi incorporado ao solo (Oxisol) de cada unidade experimental (vaso de 4 dm³), além do controle. Sementes de *C. ensiformis* foram semeadas e após a emergência foram cultivadas por 90 dias. Alteração nos teores de clorofilas ocasionaram efeitos diretos nas trocas gasosas, biomassa da parte aérea, desenvolvimento de raiz, nodulação e biomassa total da planta. A tolerância da espécie é dependente aos teores de clorofilas e trocas gasosas. Houve acúmulo de ambos os EPTs nas raízes e translocação para a parte aérea e um deles foi mais prejudicial ao desenvolvimento das plantas que o outro.

Palavras-chave: elemento potencialmente tóxico; tolerância; clorofilas; trocas gasosas; biomassa; toxicidade; análise multivariada; acúmulo; translocação.

^a O artigo segue as normas do periódico *Environmental and Experimental Botany (EEB)*

Abstract

The increase in potentially toxic elements (PTEs) in the soil is worrying, especially in agricultural soils due to the bioaccumulation factor. Copper (Cu) and iron (Fe) are micronutrients, responsible for important functions in the plant body, but the high availability of these elements in the soil can cause soil contamination and toxicity in plants, consequently they can be considered PTEs. *Canavalia ensiformis* has been the target of studies that explore its potential for tolerance and phytoremediation to PTEs and the focus of this study is to understand the physiological responses (pigments, gas exchange, growth, biomass, accumulation, translocation) of this species to high levels of Cu and Fe in the soil, in isolation and identify which PTE is most harmful to its development. Two experiments (Cu and Fe) in a completely randomized design were conducted simultaneously in a greenhouse. Treatments 50, 150, 250 and 350 mg dm⁻³ of each element (CuSO₄*5H₂O and FeSO₄*7H₂O) were incorporated into the soil (Oxisol) of each experimental unit (4 dm³ pot), in addition to the control. *C. ensiformis* seeds were sown and after emergence they were cultivated for 90 days. Changes in chlorophyll levels caused direct effects on gas exchange, shoot biomass, root development, nodulation and total plant biomass. The tolerance of the species is dependent on chlorophyll levels and gas exchange. There was accumulation of both PTEs in the roots and translocation to the shoot, and one of them was more harmful to plant development than the other.

Keywords: potentially toxic element; tolerance; chlorophylls; gas exchange; biomass; toxicity; multivariate analysis; accumulation; translocation.

1. Introdução

As leguminosas compreendem um grupo de espécies muito importantes para alimentação e tem sido alvo de estudos de remediação de EPTs por melhoram a fertilidade do solo, e promover a descontaminação e revegetação do solo (Ribeiro de Souza et al., 2012; da Silva et al., 2018). A *Canavalia ensiformis* (L.) DC é uma leguminosa herbácea anual, de rápido crescimento, rústica, pertencente à família Fabaceae, nativa da América Central e amplamente distribuída e cultivada em países tropicais e subtropicais como América do Sul, Ásia, Pacífico Sul, África Ocidental e outros (Sharasia et al., 2017).

A ampla distribuição se deve, em parte, a adaptabilidade da espécie a ambientes de diversos tipos de solo com baixo teor nutricional; não é exigente quanto a disponibilidade hídrica; é capaz de tolerar: altas temperaturas, seca, solos ácidos, salinidade, herbivoria, estresse metálico, ou seja, é uma espécie resistente a diversas condições ambientais (Andrade et al., 2005; Sílvia-Lopez, 2012; Santana et al., 2020; Diakostefani et al., 2024). A espécie apresenta alta capacidade de produção de biomassa (4 a 8 t ha⁻¹ de massa seca em um ciclo de 120 dias) (Cavalcante et al., 2012; Maia et al., 2013). Além dessas características, essa leguminosa realiza a fixação biológica de nitrogênio- FBN por meio

da simbiose com rizóbios e também é capaz de se associar com fungos micorrízicos (Andrade et al., 2010).

A *Canavalia ensiformis* tem sido foco de estudos em muitas pesquisas sobre: plantas de cobertura (Santos et al., 2021; Soares et al., 2022); adubo verde (Andrade et al., 2022); cultivo consorciado (dos Santos et al., 2023; Meirelles et al., 2023); fonte de proteínas e amido na alimentação (Purwandari et al., 2023; Yusuf et al., 2023; Zhafira et al., 2023; Ariyantoro et al., 2024); estudo de lectinas como a concanavalina-A (ConA) (de Oliveira dos Santos et al., 2022); urease (Casali et al., 2022; Moro et al., 2023); potencial de tolerância e fitorremediação de sulfentrazone (Ferraço et al., 2019), hidrocarbonetos (Lancheros et al., 2024), zinco (Andrade et al., 2009), e com múltiplos elementos no solo (da Silva et al., 2018; Akib et al., 2020).

Além desses elementos, muitas pesquisas têm explorado o potencial fitorremediador de *Canavalia ensiformis* assistida com a interação simbiótica de micorrizas e/ou rizóbios ou com fertilização orgânica aos elementos potencialmente tóxicos (Rangel et al., 2023; Ramírez-Zamora et al., 2022; Carnier et al., 2022; Akib et al., 2020; Santana et al., 2019). A fitorremediação assistida pode aumentar o potencial da espécie em remediar o solo, mas avaliar a tolerância e o desenvolvimento da espécie cultivada por outros elementos potencialmente tóxicos sem a tecnologia assistida é importante e crucial para identificar o potencial dessa espécie sem a adição de fatores estimuladores de crescimento.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, comparativamente, os parâmetros fisiológicos de *Canavalia ensiformis* em resposta ao cobre e ao ferro: (a) Avaliar o crescimento, a tolerância e as respostas fotossintéticas de *Canavalia ensiformis* a concentrações altas de Cu e Fe no solo, respectivamente; (b) Identificar possíveis efeitos de toxicidade de ambos os EPTs no desenvolvimento de *Canavalia ensiformis*; (c) Avaliar qual elemento é mais prejudicial ao desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* ao Cu e ao Fe; (d) Avaliar se há absorção, translocação e acúmulo de ambos os elementos em *Canavalia ensiformis*. Estudos como esse fornecerá informações importantes para preencher essas lacunas e subsidiar o desenvolvimento de futuras pesquisas.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização do solo

O solo utilizado neste estudo, Latossolo Vermelho Distrófico típico de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação (Demattê, 1980; Santos et al., 2018) ou Typic

Haplustox (Oxisol) pela classificação da USDA Soil Survey Staff (2014), foi coletado (camada de 0–40 cm profundidade) na área experimental da fazenda de ensino, pesquisa e extensão (FEPE), setor de produção animal, Selvíria- MS (20° 20' 24,9" S 51° 24' 19,7" W). Duas amostras de solo, compostas por 10 subamostras cada, foram removidas para caracterização química (Raij, 1991) e classificação textural (Teixeira et al., 2017) de acordo com Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização química e física do solo, camada de 0- 40 cm de profundidade de um Latossolo Vermelho Distrófico típico (Oxisol).

Caracterização química do solo	camada de 0 – 40 cm
pH	5,30
Saturação por bases -V%	50,00
Soma de bases- SB	1,31 cmol _c .dm ⁻³
Cálcio- Ca ²⁺	0,7 cmol _c .dm ⁻³
Potássio- K ⁺	0,01 cmol _c .dm ⁻³
Magnésio- Mg ²⁺	0,06 cmol _c .dm ⁻³
Acidez potencial- H ⁺ +Al ³⁺	1,3 cmol _c .dm ⁻³
Alumínio- Al ³⁺	0,00 cmol _c .dm ⁻³
P- Resina	1,00 mg dm ⁻³
Matéria orgânica- MO	16,00 g dm ⁻³
capacidade de troca catiônica- CTC	2,61 cmol _c .dm ⁻³
Análise de micronutrientes	
Manganês- Mn	5,50 mg dm ⁻³
Ferro-Fe	16,00 mg dm ⁻³
Cobre- Cu	0,50 mg dm ⁻³
Zinco- Zn	0,20 mg dm ⁻³
Boro- B	0,06 mg dm ⁻³
Caracterização física do solo	
Argila	134 g kg ⁻¹
Areia	855 g kg ⁻¹
Silte	12 g kg ⁻¹
Densidade	1,47 kg dm ⁻³

O solo foi utilizado nas condições apresentadas acima, não foi realizado correção de acidez, sem adição de fertilizantes (orgânicos ou inorgânicos) ou inoculação de rizóbios e micorrizas.

2.2 Tratamentos de Cobre e Ferro

Os elementos traços avaliados neste estudo foram o Cu e o Fe. As concentrações (tratamentos) de Cu e Fe testadas foram: 0 (controle), 50, 150, 250 e 350 mg dm⁻³ de solo, as quais foram nomeadas de T0, T50, T150, T250 e T350 respectivamente. Foram preparadas soluções estoques de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄*5H₂O) e sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄*7H₂O). Os volumes 0, 20, 60, 100 e 140 ml da solução

estoque de cada elemento foram diluídos em água destilada até completar o volume final de 400 ml para realizar a contaminação artificial (tratamentos) de 4 dm³ de solo.

As soluções descritas acima foram adicionadas (aplicação única) em cada unidade de solo (4 dm³) e em seguida o solo foi homogeneizado mecanicamente em betoneira. Posteriormente, foram acondicionados em sacos plásticos transparentes, identificados pelo número de tratamentos e repetições, correspondentes às unidades experimentais e incubados por 30 dias, em casa de vegetação, para estabilização dos TE no solo.

Após o período de incubação, amostras compostas de solo foram retiradas e submetidas à análise química de pH e concentração de Cu e Fe biodisponível no solo (disponível para a planta) (Raij et al. 2001; Silva, 2009). A extração dos micronutrientes no solo (5 g) foi feita com a solução extratora (25 ml), duplo-ácida, de Mehlich 1 (HCl 0,05 M + H₂SO₄ 0,0125 M), na relação solo:extrator 1:5, a amostra foi agitada, em velocidade de 40 rpm, em agitador horizontal circular durante cinco minutos. A determinação foi feita por ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. O limite de quantificação para Cu e Fe, no solo, foi estimado em 1,5 e 18 mg kg⁻¹, respectivamente (Silva, 2009). A marca e modelo do ICP-OES foi: Varian, modelo ES710A. O espectrômetro de ICP foi ajustado para as linhas espectrais de Cu e Fe: a 327,395 e 238,204 nm, respectivamente. Esses resultados de concentração biodisponível de Cu e Fe no solo foram chamados de TEC_{soil} (mg Kg⁻¹) e usados para o cálculo da concentração (mg) de Cu e Fe disponível no solo após (CEC) o enriquecimento (tratamentos) de Cu e Fe no solo (Eq.1).

$$CEC = (TEC_{soil} * V_{soil}) * D_{soil} \text{ (Eq. 1)}$$

Onde: V_{soil}: volume do solo utilizado (dm³) e D_{soil}: densidade do solo (kg dm⁻³).

2.3 Design experimental

Dois experimentos, um para Cu e um para Fe, foram realizados concomitantemente em casa de vegetação por 96 dias desde a semeadura até a coleta das plantas. Para cada elemento, cinco concentrações/tratamentos (fator tratamento) foram testadas, cada tratamento foi composto por seis repetições, compostas por um indivíduo em cada unidade experimental, totalizando 30 unidades experimentais em delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo por elemento (dois DICs de 30 unidades).

O experimento foi realizado em casa de vegetação, sob condições naturais de luz e temperatura, com irrigação automática por aspersão, na área experimental do Laboratório de Fisiologia do Metabolismo Vegetal da Universidade do Estado de São Paulo (Unesp), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira- SP (20° 25' 06,0" S e 51° 20' 29,7" W), Brasil, entre março a junho de 2021. As condições de temperatura e umidade relativa foram temperatura média de 24,80 °C; temperatura máxima de 32,40 °C; temperatura mínima de 18,50 °C e umidade relativa média de 69,20%.

2.4 Escolha do material vegetal

O grupo de pesquisa tem explorado o potencial de espécies de leguminosas herbáceas, fixadoras de nitrogênio, e de ampla cobertura vegetal como *Calopogonium mucunoides* (da Silva et al., 2023; Ferreira et al., 2023); *Crotalaria juncea* (de Mendonça et al., 2023) e *Cajanus cajan* (da Silva et al., 2022) em resposta a diferentes concentrações de elementos potencialmente tóxicos no solo como ao boro e ao cobre, além de outras pesquisas ainda não publicadas.

Foram utilizadas sementes comerciais de *Canavalia ensiformis*, cultivar comum, pureza 99,3% e germinação 91%, lote 01/2017 (BRSEEDS®). As sementes foram selecionadas manual e visualmente de acordo com seu tamanho e forma e não foi realizado nenhum tratamento nas sementes, seja fitossanitário ou inoculação de rizóbios ou fungos micorrízicos. Três sementes foram semeadas em cada unidade experimental na profundidade de 2,00 cm, e após a emergência das plântulas foram desbastadas e o experimento foi realizado com uma planta por vaso.

2.5 Análise de trocas gasosas

Para determinar a resposta fotossintética das plantas, as trocas gasosas foram medidas em cada repetição aos 12 e 24 meses após a germinação, utilizando um analisador portátil de trocas gasosas, CIRAS-3 (Portable Photosynthesis System – PP Systems), de acordo com as condições ambientais. As medições foram realizadas em folíolos totalmente desenvolvidos e aparentemente saudáveis, na região do 2º ou 3º trifólio abaixo do meristema apical, entre 09h00 e 12h00 da manhã, com temperatura média diária na casa de vegetação de 22,05 °C para todos os tratamentos.

As seguintes configurações foram ajustadas para troca gasosa: um folíolo dentro da cubeta universal de folhas PLC3 (janela 18 × 25 mm), 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ de referência, 60% de água de referência (umidade), fluxo da cubeta a 300 ml min⁻¹, fluxo do analisador a 100 ml min⁻¹, fonte de luz ambiente, sensor de radiação infravermelha

(IR) para medição de temperatura foliar ($36,01^{\circ}\text{C}$), com uma média de radiação externa de $1238,73\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, área foliar $4,50\text{ cm}^2$, resistência da camada limite $0,40\text{ m}^2\text{ s mol}^{-1}$, proporção estomática 50%, com auto-zero calibração do sistema (Melkonian et al., 2005; Zhang et al., 2018).

Os seguintes parâmetros foram analisados e calculados com base nas equações de Parkinson et al. (1980); Nijs et al. (1997); Cannel e Thornley (2000) e Zhang et al. (2018): taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$); transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$); condutância estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$); eficiência no uso da água (WUE , $\text{mmol CO}_2\text{ mol}^{-1}\text{ H}_2\text{O}$); eficiência intrínseca do uso da água ($EIUA$, $\mu\text{mol CO}_2\text{ mmol}^{-1}\text{ H}_2\text{O}$); concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$); razão entre carbono interno e externo (C_iCa : C_i/C_a , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e eficiência de uso de carbono (CUE : A/C_i , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

2.6 Coleta e determinação de pigmentos fotossintéticos

Ao final dos 96 dias de cultivo, o material vegetal foi coletado, separado em parte aérea (folhas e caule) e raízes, lavado em água destilada e seco com papel toalha. O comprimento do caule (SL , cm) foi medido com fita métrica; o número de folhas (NL) totalmente desenvolvidas (trifólio) e nódulos (NN) foram contados. A área foliar (LA , cm^2) do folíolo central foi mensurada com o medidor portátil (Portable Leaf Area Meter, LI-3000C). Foi determinado o peso fresco (g) da parte aérea (SFW), das raízes (RFW), das vagens (LFW) e dos nódulos (NFW). Todas as medidas de crescimento das plantas foram realizadas de acordo com Benincasa (2003). O volume radicular (RL , cm^3) foi mensurado, adicionando a raiz em uma proveta graduada, com água destilada de valor conhecido, a partir do deslocamento da água e pela equivalência de unidades ($1\text{ mL} = 1\text{ cm}^3$), tem-se o volume radicular (Scheffer-Basso, 1999).

Folhas frescas foram utilizadas para quantificar clorofilas ($Chla$, $Chlb$ e $TChl$) e carotenóides totais (CAR) (mg g^{-1} de peso fresco). Para a extração de clorofila e carotenóides foi utilizado dimetilsulfóxido ($DMSO$) e as leituras foram feitas em 645 e 663 nm para clorofilas e em 480 nm para carotenóides, conforme Hiscox e Israelstam (1979) e Wellburn (1994), respectivamente.

2.7. Biomassa e estimativa do teor de Cu e Fe na planta

O restante das folhas, caules e raízes foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada a 60°C por 72 horas (Malavolta, 1997). Foi obtido o peso seco (biomassa, g) de folhas (LDW), caules ($StDW$), raízes (RDW) e biomassa

total (soma dos órgãos, TDW) e, em seguida, esse material foi moído em moinho tipo Wiley (peneira de 10 mesh), devidamente separado e identificado quanto a repetição, tratamento e órgão.

A determinação de Cu e Fe nas plantas foi realizada por meio da digestão nitro perclórica ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$, 2:1) por espectrofotometria de absorção atômica: 250 mg de extrato seca e moído (raiz, caule e folha separadamente) com 3 ml da solução de ácido nítrico + ácido perclórico em bloco digestor, onde a temperatura foi elevada gradativamente de 80, 160 a 210 °C. O extrato resultante foi ajustado para 25 ml com água deionizada. Posteriormente as leituras foram realizadas por absorção atômica AAS (Malavolta, 1997; Silva, 2009). Esses resultados de concentração disponíveis (mg Kg^{-1}) dos EPTs nos órgãos ($\text{TEC}_{\text{leaves/stem/root}}$) das plantas foram utilizados para os cálculos de fitorremediação.

Foram realizados cálculos para determinar o potencial de fitorremediação: índice de tolerância (TI) e índice de translocação (ITR) (Rahman et al. 2013); fator de transferência (TF) (Kabata-Pendias e Pendias 2001); acúmulo dos TEs nos órgãos das plantas (Bomfim et al 2021 e 2023) e porcentagem de acúmulo dos TEs, no sistema radicular (RAP%) e na parte aérea (SAP%), baseado no cálculo do índice de translocação de Rahman et al. 2013.

Foi utilizado os dados de concentração disponíveis (TEC) de cada elemento e a biomassa de cada órgão (RDW, LDW e StDW) para o cálculo de acúmulo: raiz (RAC - Eq.3), folhas (LAC-Eq.4), caule (StAC-Eq.5) e biomassa total (TAC-Eq.6).

$$RAC = (RDW * \text{TEC}_{\text{roots}})/1000 \text{ (Eq. 3);}$$

$$LAC = (LDW * \text{TEC}_{\text{leaves}})/1000 \text{ (Eq. 4);}$$

$$\text{StAC} = (\text{StDW} * \text{TEC}_{\text{stem}})/1000 \text{ (Eq. 5);}$$

$$TAC = RAC + \text{StAC} + LAC \text{ (Eq. 6).}$$

Para os cálculos de acúmulo de ferro dividiu por 1000 e o resultado foi demonstrado em mg órgão^{-1} e mg planta^{-1} (TAC). Para cobre não se realizou a divisão e o resultado foi demonstrado em $\mu\text{g órgão}^{-1}$ e $\mu\text{g planta}^{-1}$ (TAC).

Índice de tolerância:

$$TI = TDW/TDWT0 \text{ (Eq. 7)}$$

Para o cálculo de TI: entre T50 a T350 foi utilizado a média do tratamento controle de TDW.

Índice de translocação:

$$ITR = (LAC + StAC)/TAC (Eq. 8);$$

Fator de transferência:

$$TF = (RAC + LAC + StAC/CBC)(Eq. 9);$$

Porcentagem de acúmulo na parte aérea:

$$SAP (\%) = ((LAC + StAC)/TAC) * 100 (Eq. 10);$$

Porcentagem de acúmulo na raiz:

$$RAP (\%) = (RAC/TAC) * 100 (Eq. 11).$$

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variância pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, a 5% de probabilidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade: (a) a partir da significância no teste F, a tendência foi demonstrada por regressão para a variável de concentração dos elementos no solo; (b) anova de uma via e com significância no teste F, a comparação de médias foi realizada por Scott-Knott para a variável acúmulo (Scott e Knott, 1974); (c) anova de duas vias e com significância no teste F, a comparação de médias foi realizada por Scott-Knott para as demais variáveis, os fatores analisados foram: TRATAMENTOS (0, 50, 150, 250 e 350) X ELEMENTOS TRAÇO (Cu e Fe) e para a partição entre parte aérea e raiz também foi utilizado TRATAMENTOS x ÓRGÃOS (parte aérea e raiz). Foram realizados dois gráficos de correlação: (d) correlação de Pearson (r) e (e) correlação em rede, entre as variáveis: trocas gasosas; pigmentos; biomassa; acúmulo; e os índices de tolerância e translocação. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada entre as variáveis de crescimento, biomassa, acúmulo, índice de tolerância e translocação.

O software R, versão 4.2.2, foi utilizado para a análise de dados e para a confecção dos gráficos (R Core Team, 2021). Os pacotes utilizados no R foram: “car” (Fox e Weisberg, 2019); “cowplot” (Wilke, 2020); “dgoF” (Arnold e Emerson, 2011); “dplyr” (Wickham et al., 2023); “ExpDes.pt” (Ferreira et al., 2021); “factoextra” (Kassambara e Mundt, 2020); “FactoMineR” (Lê et al., 2008); “GGally” (Schloerke et al., 2021); “ggbreak” (Xu et al., 2021); “ggfortify” (Horikoshi e Tang, 2016); “ggh4x” (van den

Brand, 2023); “ggplot2” (Wickham, 2016); “ggpubr” (Kassambara, 2023); “ggthemes” (Arnold et al., 2021); “GOplot” (Walter et al., 2015); “multcompView” (Graves et al., 2023); “plyr” (Wickham, 2011); “psych” (Revelle, 2023); “qgraph” (Epskamp et al., 2012); “readxl” (Wickham e Bryan, 2023) e “rstatix” (Kassambara, 2023).

Os resultados do índice de tolerância são dados qualitativos, ou seja, não foi realizada análise de variância sobre estes dados.

3. Resultados

3.1. Disponibilidade de Cu e Fe no solo

A biodisponibilidade de Cu no solo foi de: 0,58; 28,28; 87,80; 141,97 e 220,36 mg Kg⁻¹; e a biodisponibilidade de Fe foi de 40,91; 56,26; 83,74; 113,19 e 141,80 mg Kg⁻¹ em T0, T50, T150, T250 e T350, respectivamente (mais informações estão descritas no apêndice A e B). O CEC foi calculado e a disponibilidade dos elementos no vaso (mg) estão representadas na (Fig. 1), o CEC de Cu no solo foi de: 3,43; 166,31; 516,27; 834,77 e 1295,70 mg; e a disponibilidade de Fe foi de 240,54; 330,80; 492,40; 665,56 e 855,31 mg em T0, T50, T150, T250 e T350, respectivamente. Com a análise de regressão, observa-se uma tendência de aumento da disponibilidade de ambos os elementos no solo (4 dm³), a partir do tratamento T50 (Fig. 1).

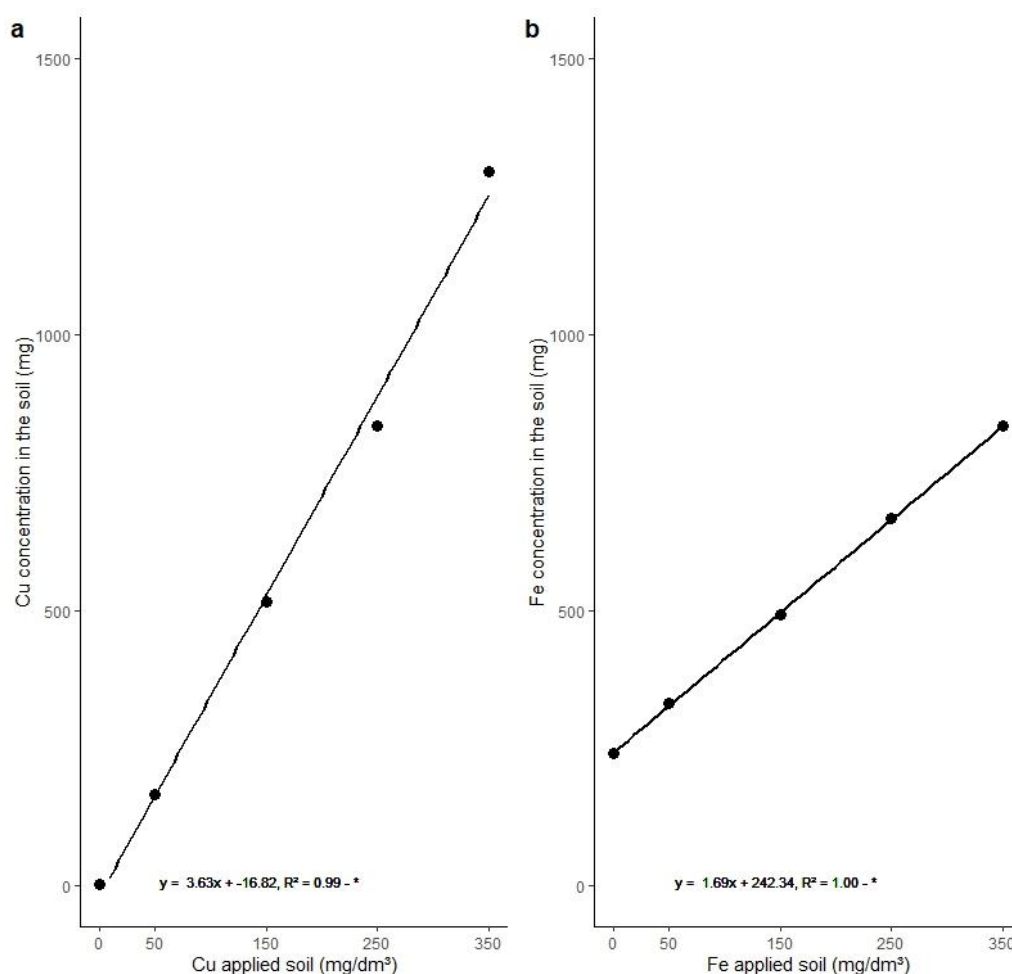


Fig. 1: Trace element concentration available (CEC) in 4 dm³ of soil at pH 4.7, thirty days after application of the treatments. a) Cu concentration in the soil (mg); b) Fe concentration in the soil (mg). Number of observations: 30. The present line corresponds to the linear adjustment of the significant regression at 5%.

3.2. Pigmentos fotossintetizantes

Os tratamentos com Cu não afetaram o teor de Chla (Fig. 2a) das plantas. Os tratamentos de T50 a T250 de Fe apresentaram maiores teores de Chla que T0 e T350. Comparando os tratamentos de Cu e Fe, observou-se que a partir do T150 os teores de Chla foram maiores nas plantas cultivadas com Fe.

Observou-se uma redução do teor de Chlb (Fig. 2b) a partir do T150, principalmente em T250 e T350 de Cu. Os teores de Chlb não foram diferentes entre os tratamentos com Fe. Em T50 houve maior teor de Chlb nas plantas cultivadas com Cu do que com Fe, ocorrendo inversão nesta tendência em T250 e T350.

A razão entre Chla e Chlb (Chlab) (Fig. 2c) não foi diferente entre os tratamentos de ambos os elementos traço, nos tratamentos T50 e T150 com Fe a razão de clorofilas Chlab foi maior em comparação ao cultivo com Cu.

O teor total de clorofilas TChl foi maior em T50 e T150 de Cu (Fig. 2d), para Fe, o teor foi maior entre T50 e T250. Comparando os teores entre os dois elementos, os tratamentos T250 e T350, obtiveram os teores mais altos de TChl no cultivo com Fe.

Os teores de carotenoides totais (Fig. 2e) não diferiram entre os tratamentos de ambos os elementos, e também não houve interação entre tratamentos e elementos. As plantas cultivadas com Cu, apresentaram aproximadamente 0.28 mg g^{-1} de carotenoides totais, e as plantas cultivadas com Fe apresentaram 0.41 mg g^{-1} (T0, T50, T150, T250 e T350).

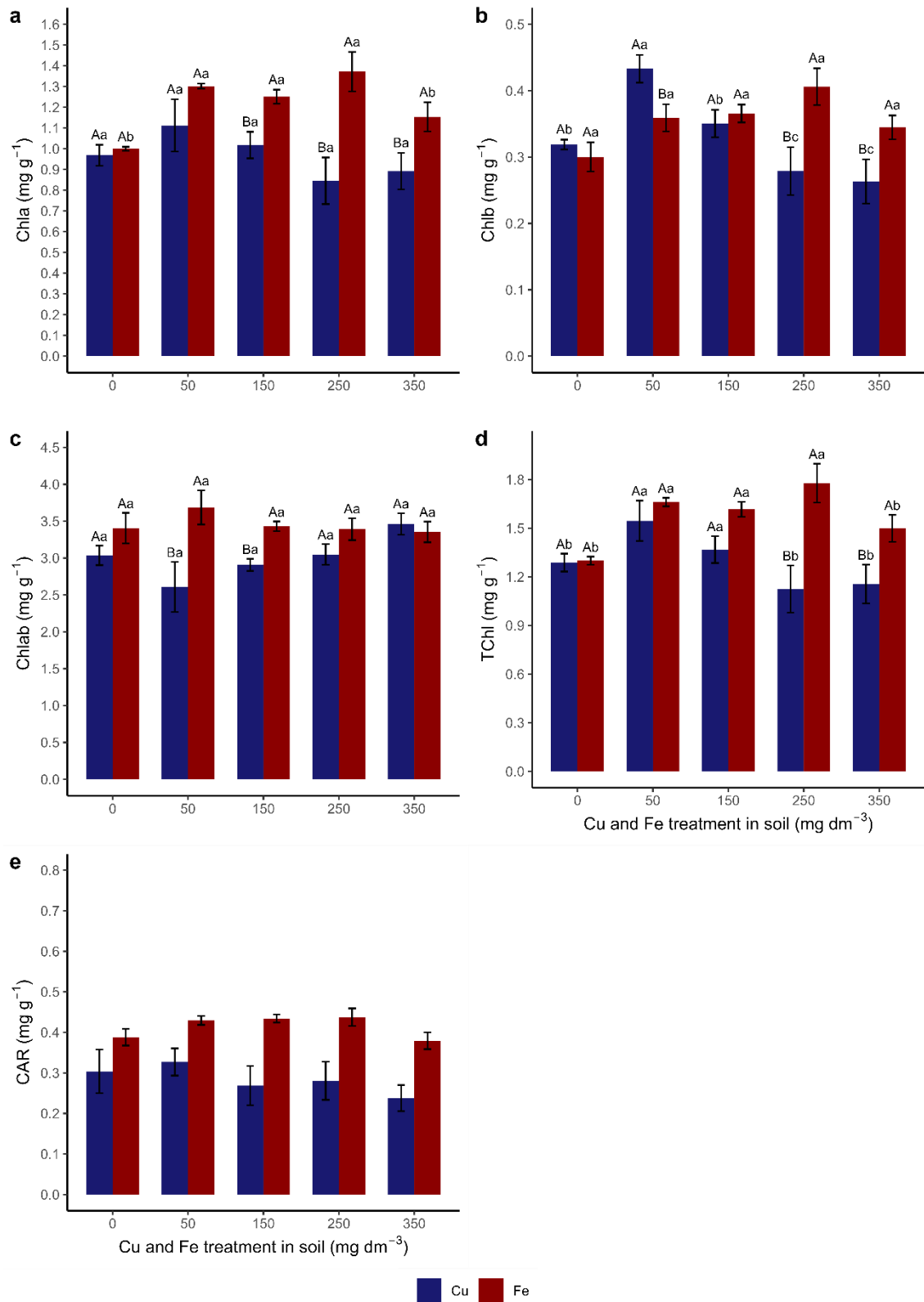


Fig. 2: Quantification of photosynthetic pigments in *Canavalia ensiformis* leaves subjected to Cu and Fe treatments in the soil. a) chlorophyll a (Chla); b) chlorophyll b (Chlb); c) chlorophyll a/b ratio (Chlab); d) total chlorophylls (TChl); e) carotenoids (CAR). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between trace elements in the same treatment, and lower-case letters indicate a comparison between treatments of the same element. No letters indicate no significant difference.

3.3. Trocas gasosas

Em T50 e T350 a taxa fotossintética (A) (Fig. 3a) foi maior, entre os demais tratamentos com Cu, enquanto para Fe, apenas em T0 A foi maior. Em comparação a ambos os elementos, a maior A em T0, T150 e T250 foram em plantas submetidas ao Fe, e em T50 ao Cu.

As maiores taxas de transpiração (E) (Fig. 3b), e condutância estomática (gs) (Fig. 3c), nas plantas cultivadas com Cu ocorreram em T50, seguido de T350, e dos demais tratamentos. Em plantas cultivadas com Fe, T0 teve as taxas E e gs mais altas, em comparação aos demais tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, o E mais alto, em T0, T150 e T250, ocorreram em plantas submetidas ao Fe, e nas plantas submetidas ao Cu apenas em T50. Em T0 e T150 foi registrada maior gs nas plantas cultivadas com Fe; em T50 as plantas cultivadas com Cu apresentaram maior gs.

Para a eficiência do uso da água (WUE) (Fig. 3d), não houve diferença significativa entre os tratamentos de ambos os elementos. Em T0 e T150 as plantas cultivadas com Fe tiveram maior WUE que com Cu. Em plantas cultivadas com Cu, não houve diferença na eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) (Fig. 3e) entre os tratamentos. As plantas cultivadas com Fe tiveram maior EIUA em T0 e T250 comparado com os demais tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, em T0 e T250 as plantas cultivadas com Fe tiveram maior EIUA.

O T50 de Cu, obteve alta eficiência do uso do carbono (CUE) (Fig. 3f), entre os demais tratamentos, enquanto para Fe, o maior CUE foi em T0, seguido de baixa CUE nos demais tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, apenas em T50 o CUE foi mais alto no cultivo das plantas com Cu, enquanto, nos demais tratamentos, as plantas cultivadas com Fe tiveram o CUE maior.

O carbono interno (Ci) (Fig. 3g), foi mais alto em T0, T150 e T250 em plantas cultivadas com Cu. Não houve diferença entre os tratamentos de plantas cultivadas com Fe. Em comparação a ambos os elementos traço, em T0, T150 e T250, as plantas cultivadas com Cu, tiveram Ci mais alto, enquanto em T50, o Ci mais alto foi em plantas cultivadas com Fe.

A razão entre carbono interno e externo (CiCa) (Fig. 3h), foi superior nas plantas cultivadas com Cu, em T0, T150 e T250. A razão CiCa não foi diferente entre os tratamentos com Fe. Em comparação a ambos os elementos, em T0, T150 e T250, as plantas cultivadas com Cu, tiveram maior razão CiCa, enquanto em T50, o maior valor foi registrado em plantas cultivadas com Fe.

Pode-se observar, também, que em T350 de todas as variáveis de trocas gasosas analisadas, não houve diferença entre Cu e Fe, isto é, a espécie responde de forma semelhante à concentração de ambos os elementos em T350.

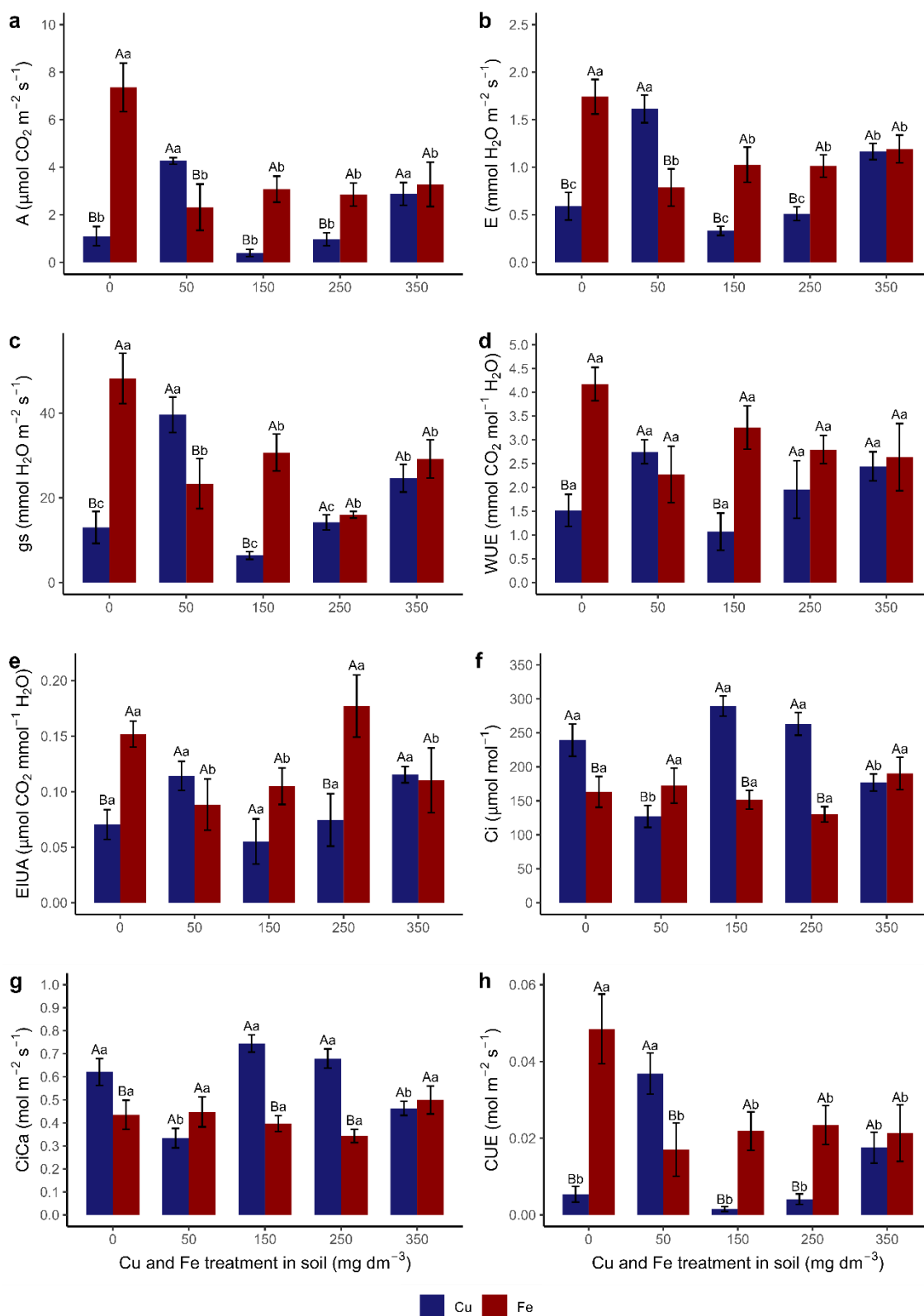


Fig. 3: Gas exchange parameters of *Canavalia ensiformis* subjected to Cu and Fe treatments in the soil. a) photosynthetic rate (A); b) transpiration rate (E); c) stomatal conductance (gs); d) water use efficiency

(WUE); e) intrinsic water use efficiency (EIUA); f) carbon use efficiency (CUE); g) internal carbon concentration (Ci) and h) internal and external CO₂ ratio (Ci/Ca). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between trace elements in the same treatment, and lower-case letters indicate a comparison between treatments of the same element.

3.4. *Parâmetros de crescimento*

O número de folhas (Fig. 4a e Fig. 5) entre os tratamentos de plantas cultivadas com Cu diminuiu a partir do T150, enquanto, em plantas cultivadas com Fe, não houve diferença entre os tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, a partir do T150 as plantas cultivadas com Fe apresentaram mais folhas/plantas que as cultivadas com Cu.

A área foliar (Fig. 4b e Fig. 5) das plantas cultivadas com Cu diminuiu a partir do T150, enquanto para Fe, em T350 apresentou a área foliar mais alta entre os demais tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, houve diferença apenas em T350, onde as plantas cultivadas com Fe obtiveram maior área foliar que plantas tratadas com Cu.

O comprimento do caule (Fig. 4c e Fig. 5) das plantas cultivadas com Cu foi menor a partir do T150, enquanto para Fe não houve diferença significativa entre os tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, o T0 foi semelhante e a partir do T50 o comprimento do caule foi maior nas plantas cultivadas com Fe do que com Cu.

O volume das raízes (Fig. 4d e Fig. 5) das plantas cultivadas com Cu entre T50 e T350 foi inferior que T0, enquanto o volume das raízes das plantas cultivadas com Fe não foi diferente entre os tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, as plantas cultivadas em T0 de Cu tiveram maior volume de raiz que as cultivadas com Fe, enquanto ocorreu o inverso em T150. Os demais tratamentos não diferiram entre Cu e Fe.

O número de nódulos (Fig. 4 e Fig. 5) diminuiu em T250 e T350 para ambos os elementos. Entre T50 e T350 de plantas cultivadas com Fe apresentaram mais nódulos que as plantas com Cu. O peso fresco de nódulos (Fig. 4 f) foi maior em T50, seguido do T0 e dos demais tratamentos com Cu. Em T350 as plantas cultivadas com Fe tiveram o maior peso de nódulos, seguido dos demais tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, a partir do T150 as plantas cultivadas com Fe apresentaram maior peso fresco de nódulos que as cultivadas com Cu.

As plantas cultivadas com Cu tiveram maior peso fresco de vagem em T0 (21 g); T50 (12 g) e nos demais tratamentos a massa fresca foi menor a 1,5 g (Fig. 4 g). Para as plantas cultivadas com Fe, ocorreu o inverso, em T0 e T50 as plantas não produziram vagens, mas em T150, T250 e T350 houve produção de vagens, sendo que em T350

encontrou-se o maior peso fresco de vagem. Em comparação a ambos os elementos, em T0 e T50 as plantas cultivadas com Cu tiveram peso fresco de vagem maior que as plantas cultivadas com Fe, e entre T150 e T350 o peso fresco das vagens foi maior em plantas cultivadas com Fe.

Foi analisada a partição de peso fresco entre parte aérea (folhas + caule) e sistema radicular (Fig. 4h e Fig. 5). O peso fresco de parte aérea das plantas cultivadas com Cu foi maior em T0 e T50, seguido de diminuição da massa nos demais tratamentos. As plantas cultivadas com Fe não apresentaram diferença de peso fresco na parte aérea entre os tratamentos. Em T0 e T50, as plantas cultivadas com Cu apresentaram maior peso de parte aérea, enquanto, ocorreu o inverso com as plantas cultivadas com Fe, em T150, T250 e T350, apresentaram, aproximadamente, 50% a mais de peso fresco de parte aérea. A massa fresca da raiz (Fig. 4g e Fig. 5) de plantas cultivadas com Cu diminuiu a partir do T150, enquanto, houve aumento de massa para as plantas cultivadas com Fe. Em T0 e T50 houve maior massa fresca de raiz em plantas cultivadas com Cu, em T150 as plantas cultivadas com Fe apresentaram maior massa de raiz. Em T250 e T350 não houve diferença entre os elementos traço.

Na comparação de partição de peso fresco (parte aérea e raiz) (Fig.4 g), observa-se maior biomassa de parte aérea (representada no gráfico por “*”) que raiz nas plantas cultivadas com Cu. Em plantas cultivadas com Fe não houve diferença de partição de peso fresco.

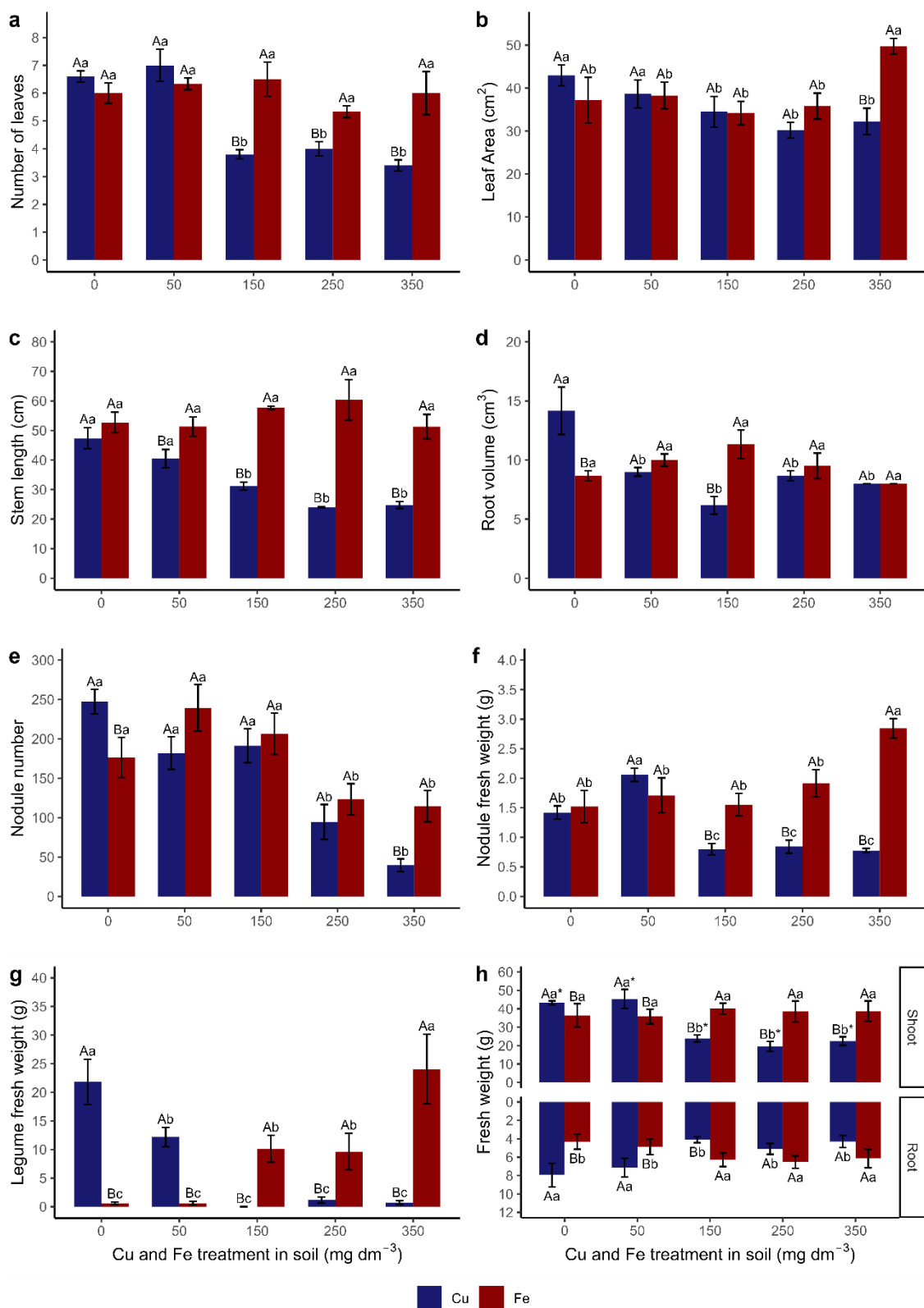


Fig. 4: Growth parameters of *Canavalia ensiformis* submitted to Cu and Fe treatments in the soil. a) number of leaves; b) leaf area (cm²); c) stem length (cm); d) root volume (cm³); e) nodule number; f) nodule fresh weight (g); g) legume fresh weight (g); h) fresh weight partitioning between the shoot and the root (g). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between trace elements in the same treatment, and lower-case letters indicate a comparison

between treatments of the same element. *: indicates that the respective organ has the largest partition difference.



Fig. 5: Shoot, root system and nodules of *Canavalia ensiformis* subjected to concentrations of Cu (a) and Fe (b). The treatments added, in addition to the control, were: 50; 150; 250 and 350 mg dm⁻³ of soil in a greenhouse for 90 days.

3.5. Biomassa seca e índices de fitorremediação

As plantas cultivadas com Cu produziram maior biomassa (peso seco) de folhas (Fig. 5 e Fig. 6a) em T50 e T0, seguidos de diminuição de mais de 50 % nos demais tratamentos. As plantas cultivadas com Fe não apresentaram diferenças na biomassa de folhas entre os tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, em T50 a biomassa de folhas foi maior nas plantas cultivadas com Cu que em Fe, e entre T150 e T350 a biomassa de folhas foi maior nas plantas cultivadas com Fe.

A biomassa de caule (Fig. 6b) das plantas cultivadas com Cu foi maior entre T0 e T50; com redução de biomassa a partir de T150. Não foram detectadas diferenças na biomassa de caule entre os tratamentos com Fe. Em comparação a ambos os elementos, em T0 e T50 não houve diferença, enquanto, entre T150 e T350 a biomassa de caule nas plantas cultivadas com Fe foi maior que em Cu.

A biomassa de raiz (Fig. 5 e Fig. 6c) das plantas cultivadas com Cu foi maior no T0 seguido do T50, os demais tratamentos tiveram uma diminuição da biomassa em 150%. As plantas cultivadas com Fe não apresentaram diferenças na biomassa de raiz entre os tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, em T0 e T50 não houve diferença,

enquanto, entre T150 e T350 a biomassa de raiz nas plantas cultivadas com Fe foi maior que em Cu.

As plantas cultivadas com Cu produziram maior biomassa total (folhas, caule e raiz) (Fig. 6d) em T0 e T50, seguidos de uma diminuição de mais de 50 % nos demais tratamentos. As plantas cultivadas com Fe não apresentaram diferenças na biomassa total entre os tratamentos. Em comparação a ambos os elementos, não houve diferença em T0, em T50 a biomassa total foi maior nas plantas cultivadas com Cu que em Fe, e entre T150 e T350 a biomassa total foi maior nas plantas cultivadas com Fe.

Foi analisada a partição de biomassa entre parte aérea (folhas + caule) e sistema radicular (Fig. 6e). A biomassa de parte aérea foi maior em T0 e T50 das plantas cultivadas com Cu, seguido de diminuição da biomassa nos demais tratamentos. As plantas cultivadas com Fe tiveram maior biomassa de parte aérea entre os T150 e T350, os demais tratamentos tiveram biomassa menor. Em comparação a ambos os elementos, em T0 e T50 a biomassa de parte aérea foi maior nas plantas cultivadas com Cu que em Fe, enquanto nos demais tratamentos, as plantas cultivadas com Fe tiveram maior biomassa de parte aérea. A partição de biomassa do sistema radicular já foi descrita anteriormente (Fig. 6c).

Na comparação de partição de biomassa seca (parte aérea e raiz) entre os órgãos (Fig. 6e), as plantas cultivadas com Cu apresentaram maior biomassa de parte aérea (representada no gráfico por “*”) que raiz. Em plantas cultivadas com Fe não houve diferença de partição de biomassa seca entre os órgãos.

A *Canavalia ensiformis* é tolerante ao Cu e ao Fe, visto que em todos os tratamentos, o índice de tolerância foi maior ou igual a 0,5 (Fig. 6f).

Foi realizado um cálculo para estimar quanto (%) do elemento foi translocado e acumulado, ou não, para a parte aérea, chamado de porcentagem de acúmulo na parte aérea (SAP), e quanto (%) foi absorvido e acumulado na raiz, o que chamamos de porcentagem de acúmulo na raiz (RAP) (Fig. 6g). As plantas de T0 e T50 translocaram mais Cu para a parte aérea que nos demais tratamentos: o SAP foi de 73,32 e 59,79% respectivamente, isto é, uma média de 66,56%. Não houve diferença significativa de SAP entre os tratamentos de Fe (em média, 25,99%). Entre os dois elementos, a porcentagem de acúmulo de Cu na parte aérea foi 46,24; 25,28 e 15,27% maior que o Fe nos tratamentos T0, T50 e T350 respectivamente, ou seja, as plantas translocaram mais Cu (55,84%) para a parte aérea do que Fe (26,91%).

As plantas dos tratamentos T150, T250 e T350 apresentaram a maior porcentagem de acúmulo de Cu na raiz que os demais tratamentos, o RAP foi de 58,40; 75,19 e 65,60% de Cu acumulado na raiz. Não houve diferença significativa de RAP entre os tratamentos de Fe. Entre os dois elementos, a porcentagem de acúmulo de Fe na raiz foi 46,24; 25,28 e 15,67% maior que o Cu nos tratamentos TO, T50 e T350 respectivamente (Fig. 6g).

Calculando a média de SAP e RAP de todos os tratamentos, observamos que 46,79% de Cu e 25,99% de Fe foi translocado e acumulado pela parte aérea das plantas; e os outros 53,21% de Cu e 74,01% de Fe foi acumulado nas raízes. Sendo assim, ambos os elementos foram absorvidos e acumulados, em maior porcentagem, na raiz (RAP) e o Cu foi o elemento mais translocado e acumulado na parte aérea das plantas (SAP) (Fig. 6g).

O fator de transferência (Fig. 6h), se refere a transferência/transporte (%) de um elemento do solo para a planta. O fator de transferência entre T50 e T350 para Cu foi menor que 1%. Para Fe, o fator de transferência em T50 foi de aproximadamente 6% e a partir de T150 menor que 3%. Em geral, a transferência de Fe foi maior que a de Cu.

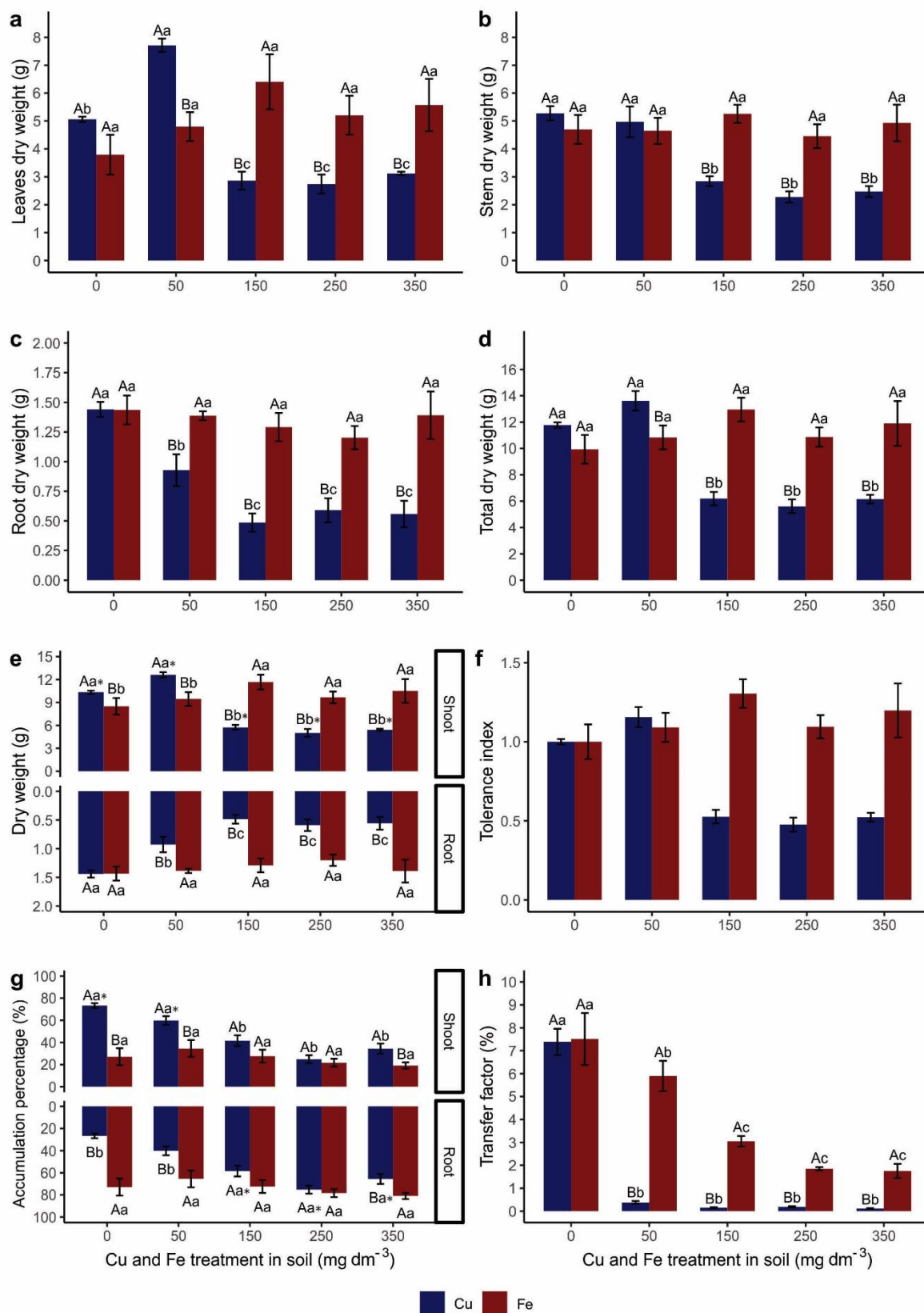


Fig. 6: Dry weight and phytoremediation indexes of *Canavalia ensiformis* subjected to Cu and Fe treatments in the soil. a) leaves dry weight (g); b) stem dry weight (g); c) root dry weight (g); d) total plant dry weight (g); e) partitioning of dry weight between the shoot and the root (g); f) tolerance index (qualitative data); g) percentage of PTEs accumulation between the root (RAP) and shoot (SAP) organs (%); h) transfer factor. Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different

letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between trace elements in the same treatment, and lower-case letters indicate a comparison between treatments of the same element. *: indicates that the respective organ has the largest partition difference.

3.6. Acúmulo de Cu e Fe

O Acúmulo de Cu nas folhas (Fig. 7a), de T50 a T350 foi maior ($\pm 74,84 \mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$) que em T0 ($\pm 24,39 \mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$). O acúmulo de Cu no caule (Fig. 7b) não diferiu entre os tratamentos ($\pm 49,33 \mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$). O acúmulo de Cu na raiz (Fig. 7c) foi maior em T250 e T350 ($\pm 368,63 \mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$); seguido de baixo acúmulo nos demais tratamentos ($\pm 90,23 \mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$). O acúmulo total (folha, caule e raiz) (Fig. 7d) de Cu foi maior em T250 e T350 ($\pm 86,8 \mu\text{g } \text{planta}^{-1}$); seguido de T150 ($\pm 41,95 \mu\text{g } \text{planta}^{-1}$) e T0 ($\pm 7,31 \mu\text{g } \text{planta}^{-1}$).

O acúmulo de Fe nas folhas (Fig. 7e) não diferiu entre os tratamentos ($\pm 1,25 \text{ mg } \text{órgão}^{-1}$). O acúmulo de Fe no caule (Fig. 7f) foi maior em T0 e T50 ($\pm 0,42 \text{ mg } \text{órgão}^{-1}$) que nos demais tratamentos ($\pm 0,24 \text{ mg } \text{órgão}^{-1}$). O acúmulo de Fe no sistema radicular (Fig. 7g) não diferiu entre os tratamentos ($\pm 3,82 \text{ mg } \text{órgão}^{-1}$). O acúmulo total de Fe (Fig. 7h) foi maior em T0 e T50 ($\pm 0,61 \text{ mg } \text{planta}^{-1}$), seguido dos demais tratamentos ($\pm 0,40 \text{ mg } \text{planta}^{-1}$).

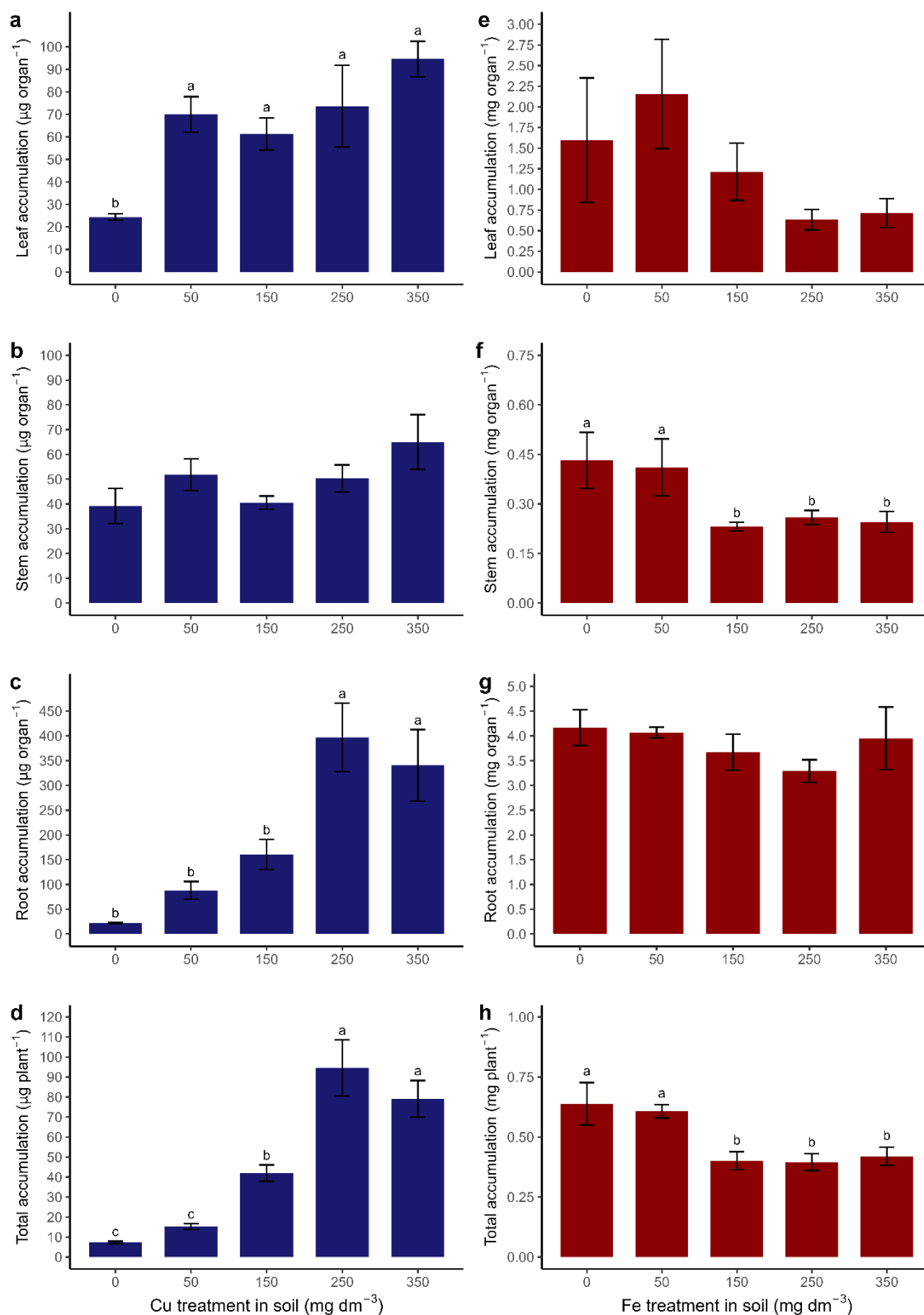


Fig. 7: PTEs accumulation in the organs of *Canavalia ensiformis* submitted to Cu and Fe treatments in the soil. a) and e) PTE accumulation in the leaf; b) and f) PTE accumulation in the stem; c) and g) PTE accumulation in the roots; d) and h) PTE accumulation in the total plant. From a) to d) Cu accumulation ($\mu\text{g organ}^{-1}$ and $\mu\text{g plant}^{-1}$); from e) to h) Fe accumulation (mg organ^{-1} and mg plant^{-1}). Number of observations: 30. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test. Absence of letters indicates no differences.

3.7. Análise multivariada

A matriz de correlação (Pearson e rede) (Fig. 8) permitiu identificar associações e relações entre as variáveis: trocas gasosas; pigmentos; crescimento; biomassa; acúmulo; tolerância; porcentagem de acúmulo e os tratamentos dos elementos, separadamente. Em *C. ensiformis* cultivada sob os tratamentos de Cu (Fig. 8a, c) as relações observadas entre A, E, gs, WUE e CUE; Chla, Chlb e TChl; LDW, StDW, TDW e TI; LAC e StAC; TI e RAP; SAP, StDW e TDW; TAC, RAC e RAP: são correlações positivas. As relações entre Ci + A, E, gs, WUE, CUE e LDW; RAC + Chla, TChl, StDW, TDW, SAP% e TI; RDW + LAC, RAP; RAP + SAP, StDW e TDW; TI + TAC; TAC + TDW, StDW, Chla, TChl e SAP: são correlações negativas.

Em *C. ensiformis* cultivada sob os tratamentos de Fe (Fig. 8b, d), as relações observadas entre A, E, gs, WUE e CUE; Chla, Chlb e TChl; Ci, RDW e RAC; StDW, TDW e TI; LDW, TDW e TI; TAC, StAC, LAC, RAC; SAP e LAC: são correlações positivas. As relações entre Chla + CUE, A, E e gs; Chlb + gs, RDW, RAC, E e A; TChl + RDW e RAC; TDW + TAC e StAC; RAP + SAP e LAC; TI + TAC, StAC: são correlações negativas.

A análise de componentes principais das variáveis de crescimento; biomassa; acúmulo índice de tolerância e translocação foi realizada com o intuito de agrupar essas variáveis, segundo o comportamento da variação de suas características, em um determinado conjunto de dados: Cu ou Fe, o resultado indicou 66,4% de variância (Fig. 8e). De acordo com os resultados, as inter-relações, dentre todas as variáveis, para o elemento Cu são compostas por: RAC; TAC; LAC; StAC; SAP; LDW; NFW; LFW; NN e RL. Para o Fe, as inter-relações são compostas por: RAP; TI; RDW; StDW; TDW; NL; SL; LA e TI.

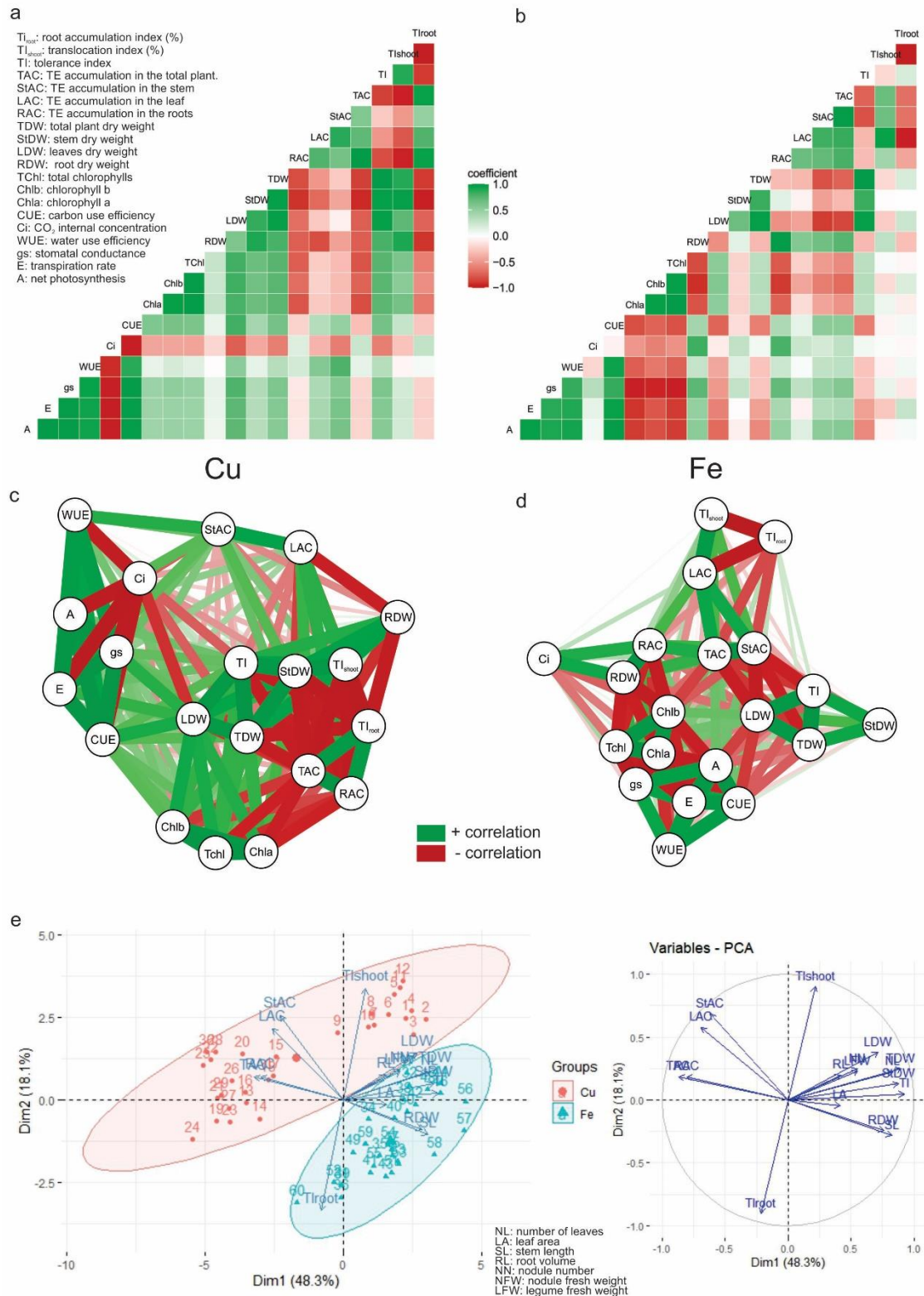


Fig. 8: Multivariate analysis: correlation and principal component analysis (PCA). Correlation analysis was performed with the variables pigments, gas exchange, biomass, accumulation, tolerance index and percentage of accumulation: (a) and (b): Pearson correlation (r); (c) and (d) network correlation. Left and right side are the correlations of *Canavalia ensiformis* to Cu and Fe respectively; (e) principal component analysis - PCA (PCA-biplot and PCA-variables). Pearson correlation (r): coefficient = 1, indicates a positive correlation between the variables; coefficient = -1, indicates negative correlation; coefficient = ± 0.5 , indicates a moderate correlation; coefficient = 0, indicates that the variables do not depend linearly on each

other. Network correlation: each variable is a node and each correlation is a connecting edge/line. Closer, correlated relationships have a thicker edge/connection, and the more intense the color, the stronger the relationship between them ($R \geq 0.7$ and the significance level is $p < 0.05$). In both correlations: intense green indicates a strong positive correlation (as the value of one variable increases, so does the value of the other variable); Deep red means a strong negative correlation (as the value of one variable increases, the value of the other decreases). The principal component analysis Biplot was performed with the growth variables; biomass; index of tolerance and percentage of accumulation. The acronyms of the variables analyzed were: A: photosynthetic rate; E: transpiration rate; gs: stomatal conductance; WUE: water use efficiency; Ci: CO₂ internal concentration; CUE: carbon use efficiency; Chla: chlorophyll a; Chlb: chlorophyll b; TChl: total chlorophylls; RDW: root dry weight; LDW: dry weight of leaves; StDW: stem dry weight; TDW: total biomass; RAC: root accumulation; LAC: accumulation in leaves; StAC: stem accumulation; TAC: accumulation in total biomass; TI: tolerance index; SAP: shoot accumulation percentage; RAP: root accumulation percentage; NL: number of leaves; LA: leaf area; SL: stem length; RL: root volume; NN: number of nodules; NFW: nodule fresh weight; LFW: fresh pod weight. Number of observations: 30.

4. Discussão

Os íons Cu e Fe, inicialmente são absorvidos, de maneira semelhante entre as dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas (Wang et al., 2024), e acumulados pelas raízes e são posteriormente translocados para outras partes da planta. Ambos os EPTs foram acumulados em sua maioria pelas raízes, salvo as características de disponibilidade de cada elemento na rizosfera, e esse acúmulo foi responsável pelas diferentes respostas fisiológicas e de crescimento que a espécie apresentou a cada elemento, visto que as raízes são órgãos sensíveis à percepção e à sinalização de estresse (Zhang et al., 2023).

A partir dos resultados apresentados, foi demonstrado que os tratamentos de Cu nas concentrações variando entre 150 a 350 mg dm⁻³ foram mais prejudiciais ao crescimento de *C. ensiformis* quando comparado com os mesmos tratamentos de ferro.

4.1. Cobre

Os tratamentos de cobre (> T150) afetaram, negativamente, o volume e a biomassa do sistema radicular, além disso, a relação número e peso fresco de nódulos também foi afetada (Fig. 4, Fig. 5 e Fig. 6). O excesso de Cu impede o crescimento radicular e as plantas apresentam as seguintes características: diminuição do alongamento da raiz principal; raízes laterais; e da proliferação dos pêlos radiculares, consequentemente prejudicando o crescimento e a produção de biomassa aérea (Shabbir et al., 2020; Wang et al., 2024). Nossos dados demonstram que o sistema radicular das plantas cultivadas com Cu apresentou a maior porcentagem de acúmulo (RAP) de Cu e consequentemente afetou o acúmulo de biomassa radicular que por sua vez influenciou diretamente o comprimento, peso seco do caule e a biomassa total da planta (correlação -) (Fig. 8) como

nas plantas de *Medicago sativa* (Duan et al., 2019) e em plantas de *C. ensiformis* tratadas e não tratadas com fungos micorrízicos arbusculares (Andrade et al., 2010).

O excesso de Cu prejudicou tanto a biomassa radicular quanto a aérea e há uma relação entre a biomassa da parte aérea com o número de nódulos que pode explicar essa redução: a aérea influencia a atividade metabólica dos nódulos e interfere na FBN das leguminosas (Carvalho et al., 2019). A área foliar determina a eficiência do organismo fotossintético e a capacidade de transformar a energia luminosa em energia química para a produção de fotoassimilados/carboidratos, que são transportados aos nódulos e utilizados como fonte de energia para o crescimento e respiração das bactérias simbióticas que realizam a FBN, e também para fungos micorrízicos (Hiiesalu et al., 2017; Carvalho et al., 2019; Zhang et al., 2020; Zhang et al., 2022).

O acúmulo de biomassa da planta (TDW) está diretamente relacionado com o índice de tolerância (TI) da espécie ao Cu, nestas condições, a *C. ensiformis* demonstrou não ser tolerante ao cobre, visto que a partir de 150 o índice de tolerância é menor que de 0,5. Além disso, não há alocação de carbono para parte aérea ou radicular (Fig. 6 e Fig. 8). Quanto maior a porcentagem de acúmulo de Cu na raiz, e com isso evitar a translocação e acúmulo para a parte aérea (SAP), mais pode interferir no acúmulo de biomassa total da planta e alterar o grau de tolerância da espécie (Fig.8). Quanto maior a porcentagem de acúmulo de Cu na raiz, menor foi a porcentagem de acúmulo na parte aérea (correlação -) e mais recursos foram investidos em biomassa da parte aérea (partição) (Fig. 6 e Fig. 8).

Em geral, o acúmulo de Cu afetou de forma moderada os teores de clorofilas (a, b e totais), apenas em T250 e T350 houve diminuição de Chlb e TChl (Fig. 2). Considerando que o Cu faz parte da composição da plastocianina, proteína de membranas presentes nos tilacóides dos cloroplastos, responsável pelas reações fotossintéticas de transporte de elétrons e também participa da formação/síntese da clorofila (Sun et al., 2022). O excesso de Cu pode afetar a síntese ou degradar as clorofilas como nesse estudo e em outros (Li et al., 2019; Rangel et al., 2023; Bomfim et al., 2023).

É provável que a relação entre clorofilas e acúmulo de Cu (RAC e TAC) tenha relação com as alterações observadas em trocas gasosas, visto que o comportamento dos teores de Chla e Chlb ao longo dos tratamentos é similar com os de A, gs, E, CUE, WUE (correlação + moderada) (Fig. 2, Fig. 3 e Fig. 8) como relatado por outros autores (Marques et al., 2019; Lillo et al., 2019). A taxa de fotossíntese líquida (assimilação de CO₂), condutância estomática, transpiração, eficiência do uso de carbono e da água são

proporcionalmente correlatas (correlação +) entre si, contudo, são inversamente proporcionais a concentração interna de CO₂ (correlação -), isto é, quando A, gs, E, CUE, WUE diminuem, o Ci aumenta (Fig. 3 e Fig. 8).

Além das trocas gasosas, diminuição dos teores de Chlb e TChl influenciou, também, o número (NL) e biomassa de folhas (LDW) (correlação + moderada), além da área foliar (LA) (Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 e Fig. 8), como observado por outros autores (Bouazizi et al., 2010; Shabbir et al., 2020). Outras relações importantes são as correlações positivas entre LDW com gs e CUE; e acúmulo de Cu no caule (StAC) com a WUE, isto é, o acúmulo de Cu no caule, por ter sido insignificante, não interferiu na razão biomassa colhida e água utilizada, assim como baixo acúmulo nas folhas (LAC), que foi fundamental para o balanço de carbono (CUE) e o LDW, mesmo tendo diminuição com os tratamentos mais altos, foi importante para que as plantas completassem seu ciclo de vida. Além disso, a condutância estomática é dependente de LDW, porque gs depende do número de estômatos por unidade de área foliar (densidade estomática) e do grau de abertura estomática.

4.2. Ferro

A disponibilidade e acúmulo de ferro (RAC e RAP) nas raízes não prejudicaram o crescimento e a biomassa radicular, o número de nódulos diminuiu em T250 e T350, mas em compensação, o peso fresco de nódulos aumentou em T350, ou seja, houve restrição de formação de novos nódulos e crescimento de nódulos pré-existent (Fig. 4, Fig. 5 e Fig. 6). A biomassa de parte aérea também não foi afetada negativamente pelo Fe, pelo contrário, a área foliar no T350 aumentou e a biomassa da parte aérea aumentou de T150 a T350 (Fig. 4, Fig. 5 e Fig. 6). A biomassa da parte aérea: LDW, StDW e TDW (Fig. 8b, d) foi responsável pelo índice de tolerância (TI) com correlação positiva, além de outros fatores como SL, LA e NL, como demonstrado pela análise de componentes principais (Fig. 8e).

Tanto o RDW quanto o RAC são inversamente proporcionais aos teores de clorofilas, isto é, quanto maior for a biomassa e acúmulo de Fe na raiz, menor teor de clorofilas será acumulado, principalmente a Chlb e TChl, tanto é que a Chlab é alta (Fig. 2, Fig. 7 e Fig. 8). Os teores de clorofilas são inversamente proporcionais (correlação -) aos parâmetros de trocas gasosas (Fig. 8b, d). Nota-se que nos tratamentos com maiores teores de clorofilas, há menor gs, A e E, principalmente.

A concentração interna de CO₂ está diretamente relacionada ao acúmulo de biomassa da raiz, assim como essa foi responsável pelo acúmulo de Fe no sistema radicular (Fig. 8b, d), além disso, quanto mais Fe for acumulado nas raízes, mais será acumulado na parte aérea e na biomassa total (correlação +). Além do Ci, gs apresenta uma relação positiva e moderada com o RDW e RAC, e uma relação fraca com os demais parâmetros de trocas gasosas, indicando que o acúmulo de Fe não interferiu diretamente nas trocas gasosas (Fig. 8b, d).

A porcentagem de acúmulo de Fe na raiz (RAP) apresenta correlação negativa com a porcentagem de acúmulo para parte aérea (SAP) e acúmulo de Fe nas folhas (LAC), isto é, quanto mais Fe foi acumulado na raiz, menos Fe foi translocado para a parte aérea e acumulado nas folhas (Fig. 8b, d).

4.3. Respostas comuns ao Cu e ao Fe

O sistema radicular é o órgão com maior porcentagem de acúmulo para ambos os elementos, e o acúmulo de ambos os elementos influenciaram os teores de clorofilas (são inversamente proporcionais), isto é, quanto mais Cu e Fe foi acumulado, mais baixo foram os teores de clorofilas. O acúmulo de biomassa (TDW) é proporcional aos teores de clorofilas das folhas, conseqüentemente também é proporcional ao índice de tolerância para ambos os elementos. O TI é por sua vez inversamente proporcional ao acúmulo dos EPTs.

A porcentagem de acúmulo para a parte aérea (SAP), de ambos os elementos, é inversamente proporcional à porcentagem de acúmulo na raiz (RAP), isto é, quanto maior for o acúmulo dos elementos na raiz, menos será translocado para a parte aérea das plantas, configurando um importante mecanismo de defesa (Wang et al., 2024) para evitar altas concentrações desses elementos nas folhas, e dessa forma, proteger o aparato fotossintetizante.

4.4. Respostas diferentes

Os teores de clorofilas influenciaram os parâmetros de trocas gasosas de maneira diferente em resposta a cada EPT. O acúmulo de Cu desencadeou uma relação de dependência positiva entre os teores de clorofilas e as trocas gasosas, diferentemente da resposta ao acúmulo de Fe.

Os teores de clorofilas e a assimilação de carbono (A) diminuem e o carbono interno (Ci) aumenta à medida que o acúmulo de Cu aumenta. Os teores de clorofilas, a assimilação e o carbono interno diminuem com o acúmulo de Fe.

5. Conclusão

A dinâmica de disponibilidade do elemento potencialmente tóxico varia de elemento para elemento e das condições e tipos de solo. Essa dinâmica deve ser investigada caso a caso, e não só isso, como também a relação de determinada espécie com esse sistema: solo + EPT + espécie. Devido às condições de solo, o cobre ficou, ambientalmente, mais disponível no solo que o ferro. No entanto, a absorção e acúmulo de ferro nas plantas foi maior que o acúmulo de cobre, o que pode estar relacionado com a toxicidade do elemento.

A porcentagem de acúmulo de ambos os EPTs nas raízes foram altos, conseqüentemente, a translocação para a parte aérea foi baixa, sem prejuízo fotossintético. Nas condições testadas: solo + EPT + espécie, a *C. ensiformis* apresentou potencial de fitoestabilização Cu e Fe no solo. Contudo, outros trabalhos, já citados, relatam o potencial de fitoextração de EPT dessa espécie a partir da fitogestão, que combina as estratégias de fitorremediação com a adição de fertilizantes orgânicos/inorgânicos e associação com microorganismos micorrízicos e/ou rizóbios.

Cada elemento, provocou diferentes níveis de estresse nas plantas, o que desencadeou diferentes respostas fisiológicas em *Canavalia ensiformis* a fim de resistir aos danos causados; entretanto, *Canavalia ensiformis* foi tolerante às concentrações testadas Fe (até 141,80 mg Kg⁻¹), para as concentrações superiores a 87,80 mg Kg⁻¹ de Cu no solo, a espécie não foi tolerante (T150).

O excesso de cobre no solo afetou o desenvolvimento radicular, a nodulação e o crescimento da parte aérea, bem como o acúmulo de biomassa e a produção de vagens, demonstrando sinais de toxicidade nos tratamentos 150, 250 e 350 mg Cu. dm⁻³ de solo. Além disso, é previsível que maiores concentrações disponíveis de Cu no solo sejam letais ao desenvolvimento, ou que comprometa o crescimento e estabelecimento das plantas de *C. ensiformis*.

O acúmulo de ferro não foi tão prejudicial como o cobre foi em *C. ensiformis*. O excesso de ferro afetou os pigmentos e as trocas gasosas, mas não o bastante para afetar o crescimento e o acúmulo de biomassa. Esse trabalho contribui muito para o conhecimento das respostas fisiológicas frente aos estresses por cobre e ferro ao longo do ciclo da planta, principalmente por ferro, que dificilmente se encontra na literatura de forma ambientalmente disponível no solo ou combinada a outro EPT.

A inibição ou diminuição de síntese de clorofilas altera a eficiência fotossintética, diminui a produção de biomassa da planta, como mencionado acima, e consequentemente influencia o potencial de tolerância da espécie. Sendo assim, as respostas de pigmentos fotossintetizantes e trocas gasosas são importantes para avaliar a tolerância de espécies vegetais expostas a cada elemento.

Referências

- Ahamad, A., Janardhana Raju, N., Madhav, S., Gossel, W., Ram, P., Wycisk, P., 2021. Potentially toxic elements in soil and road dust around Sonbhadra industrial region, Uttar Pradesh, India: Source apportionment and health risk assessment. *Environmental Research* 202, 111685, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111685>.
- Akib, M.A., Kuswinanti, T., Antonius, S., Mustari, K., Syaiful, S.A., Nuddin, A., Prayudyaningsih, R., 2020. *Acaulospora* sp: Can it help the growth of *Canavalia ensiformis* in heavy metal contaminated environment? *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 575, 012085, [10.1088/1755-1315/575/1/012085](https://doi.org/10.1088/1755-1315/575/1/012085).
- Andrade, R.A., De Souza, F.R., Mascarenhas, A.R.P., De Carvalho, C.A., De Mattia, F.L., Da Silva Oliveira, R.F., 2022. Cover crop rates and decomposition of green manure in Southwestern Amazon. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente* 15, 10.17765/2176-9168.2022v15n1e8600.
- Andrade, S.A.L., Gratão, P.L., Azevedo, R.A., Silveira, A.P.D., Schiavinato, M.A., Mazzafera, P., 2010. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany* 68, 198-207, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.11.009>.
- Andrade, S.A.L., Gratão, P.L., Schiavinato, M.A., Silveira, A.P.D., Azevedo, R.A., Mazzafera, P., 2009. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere* 75, 1363-1370, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.008>.
- Andrade, S.A.L.d., Jorge, R.A., Silveira, A.P.D.d., 2005. Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Agricola* 62, 389-394., <https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000400013>.
- Ariyantoro, A.R., Yulviatun, A., Yudhistira, B., Muhammad, D.R.A., 2024. Chapter 16 - Jack bean starch: properties, functionality, and modification, in: Lorenzo, J.M., Bangar, S.P. (Eds.), *Non-Conventional Starch Sources*. Academic Press, pp 467-494.
- Bomfim, N.C.P., Aguilar, J.V., de Paiva, W.d.S., de Souza, L.A., Justino, G.C., Faria, G.A., Camargos, L.S., 2021. Iron phytostabilization by *Leucaena leucocephala*. *South African Journal of Botany* 138, 318-327, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.013>.
- Bomfim, N.C.P., Aguilar, J.V., Ferreira, T.C., de Souza, L.A., Camargos, L.S., 2023. Could nitrogen compounds be indicators of tolerance to high doses of Cu and Fe in the cultivation of *Leucaena leucocephala*? *Plant Physiology and Biochemistry* 194, 489-498, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.11.042>.

Bonanno, G., Lo Giudice, R., 2010. Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecological Indicators* 10, 639-645, 10.1016/j.ecolind.2009.11.002.

Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., El Ferjani, E., 2010. Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1304-1308, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.014>.

Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., Zhao, F., 2012. Chapter 7 - Function of Nutrients: Micronutrients, in: Marschner, P. (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp 191-248, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8>.

Cannell, M.G.R., Thornley, J.H.M., 2000. Modelling the Components of Plant Respiration: Some Guiding Principles. *Annals of Botany* 85, 45-54, 10.1006/anbo.1999.0996.

Carmo, F.F.d., Kamino, L.H.Y., Junior, R.T., Campos, I.C.d., Carmo, F.F.d., Silvino, G., Castro, K.J.d.S.X.d., Mauro, M.L., Rodrigues, N.U.A., Miranda, M.P.d.S., Pinto, C.E.F., 2017. Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. *Perspectives in Ecology and Conservation* 15, 145-151, <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2017.06.002>.

Carnier, R., Coscione, A.R., Delaqua, D., Puga, A.P., de Abreu, C.A., 2022. Jack Bean development in multimetal contaminated soil amended with coffee waste-derived biochars, *Processes*, 10.3390/pr10102157.

Carvalho, L.R., Pereira, L.E.T., Hungria, M., Camargo, P.B., Da Silva, S.C., 2019. Nodulation and biological nitrogen fixation (BNF) in forage peanut (*Arachis pintoi*) cv. Belmonte subjected to grazing regimes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 278, 96-106, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.02.016>.

Casali, L., Mazzei, L., Sun, R., Chierotti, M.R., Gobetto, R., Braga, D., Grepioni, F., Ciurli, S., 2022. Thiocarbamoyl disulfides as inhibitors of urease and ammonia monooxygenase: crystal engineering for novel materials. *Crystal Growth & Design* 22, 4528-4537, 10.1021/acs.cgd.2c00439.

Cavalcante, V.S., Santos, V.R., Santos Neto, A.L.d., Santos, M.A.L.d., Santos, C.G.d., Costa, L.C., 2012. Biomass production and nutrient removal by plant cover. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 16, 521-528, <https://doi.org/10.1590/S1415-43662012000500008>, (in portuguese).

Chia, J.-C., Yan, J., Rahmati Ishka, M., Faulkner, M.M., Simons, E., Huang, R., Smieska, L., Woll, A., Tappero, R., Kiss, A., Jiao, C., Fei, Z., Kochian, L.V., Walker, E., Piñeros, M., Vatamaniuk, O.K., 2023. Loss of OPT3 function decreases phloem copper levels and impairs crosstalk between copper and iron homeostasis and shoot-to-root signaling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 35, 2157-2185, 10.1093/plcell/koad053.

Connorton, J.M., Balk, J., Rodríguez-Celma, J., 2017. Iron homeostasis in plants – a brief overview. *Metallomics* 9, 813-823, 10.1039/c7mt00136c.

Cruz, F.V.S., Gomes, M.P., Bicalho, E.M., Garcia, Q.S., 2022. Fertilization assures mineral nutrition but does not overcome the effects of Fe accumulation in plants grown in iron ore tailings. *Environmental Science and Pollution Research* 29, 18047-18062, [10.1007/s11356-021-16989-3](https://doi.org/10.1007/s11356-021-16989-3).

da Silva Paiva, W., de Araujo, M.A., Rosalem, P.F., Ferreira, T.C., Bomfim, N.C.P., Gonçalves, R.A., Martins, A.R., de Camargos, L.S., 2023. Lead effect on the morphophysiology of leaves and roots of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., a potential phytostabilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology*, [10.1007/s13762-023-05120-3](https://doi.org/10.1007/s13762-023-05120-3).

da Silva, M., de Andrade, S.A.L., De-Campos, A.B., 2018. phytoremediation potential of Jack Bean plant for multi-element contaminated soils from Ribeira Valley, Brazil. *CLEAN – Soil, Air, Water* 46, 1700321, <https://doi.org/10.1002/clen.201700321>.

da Silva, M.B., Bomfim, N.C.P., da Silva, V.N., de Lima Frachia, C., de Souza, L.A., Justino, G.C., de Camargos, L.S., 2022. Response of *Cajanus cajan* to excess copper in the soil: tolerance and biomass production. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 28, 1335-1345, [10.1007/s12298-022-01203-6](https://doi.org/10.1007/s12298-022-01203-6).

de Mendonça, G.W., Aguilar, J.V., de Marcos Lapaz, A., da Silva de Paiva, W., Ferreira, T.C., Souza, L.A., Justino, G.C., de Camargos, L.S., How does boron modify the growth of *Crotalaria juncea*? A legume with phytostabilizing potential. *International Journal of Environmental Studies*, 1-15, [10.1080/00207233.2023.2207895](https://doi.org/10.1080/00207233.2023.2207895).

de Oliveira dos Santos, A.M., Duarte, A.E., Costa, A.R., da Silva, A.A., Rohde, C., Silva, D.G., de Amorim, É.M., da Cruz Santos, M.H., Pereira, M.G., Deprá, M., de Santana, S.L., da Silva Valente, V.L., Teixeira, C.S., 2022. *Canavalia ensiformis* lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biological Macromolecules* 222, 2823-2832, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061>.

Demattê, J.L.I., 1980. Levantamento detalhado de solos do “Campus Experimental de Ilha Solteira”. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba (in portuguese).

Diakostefani, A., Velissaris, R., Cvijanovic, E., Bulgin, R., Pantelides, A., Leitch, I.J., Mian, S., Morton, J.A., Gomez, M.S., Chapman, M.A., 2024. Genome resources for underutilised legume crops: genome sizes, genome skimming and marker development. *Genetic Resources and Crop Evolution* 71, 427-438, [10.1007/s10722-023-01636-2](https://doi.org/10.1007/s10722-023-01636-2).

dos Santos, L.F.C., López, C.J.A., Medina, H.E., Osornio, J.J., 2023. Growth and mineral composition of legume cover crops for sustainable agriculture in southern Mexico. *Tropical Agriculture* 100, 182-190.

Duan, C., Razavi, B.S., Shen, G., Cui, Y., Ju, W., Li, S., Fang, L., 2019. Deciphering the rhizobium inoculation effect on spatial distribution of phosphatase activity in the rhizosphere of alfalfa under copper stress. *Soil Biology and Biochemistry* 137, 107574, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107574>.

Fasani, E., Li, M., Varotto, C., Furini, A., DalCorso, G., 2022. Metal detoxification in land plants: from bryophytes to vascular plants. STATE of the Art and Opportunities, Plants,10.3390/plants11030237.

Ferraço, M., Belo, A.F., Madalão, J.C., Pires, F.R., Celim Filho, A., 2019. The residues of *Canavalia ensiformis* and *Crotalaria juncea* after phytoremediation in soil contaminated with sulfentrazone do not result in soil recontamination. Revista Brasileira de Ciências Agrárias 14, 1-8, <https://doi.org/10.5039/agraria.v14i2a5638>.

Ferreira, T.C., Rosalem, P.F., Aguilar, J.V., da Silva, V.N., de Araujo, M.A., Martins, A.R., de Camargos, L.S., 2023. Growth, nodulation, and anatomical characterization of *Calopogonium mucunoides* Desv., a tropical legume, in copper-contaminated soil. Brazilian Journal of Botany 46, 633-644,10.1007/s40415-023-00900-0.

Garcia-Molina, A., Marino, G., Lehmann, M., Leister, D., 2020. Systems biology of responses to simultaneous copper and iron deficiency in Arabidopsis. The Plant Journal 103, 2119-2138, <https://doi.org/10.1111/tpj.14887>.

Hiiesalu, I., Bahram, M., Tedersoo, L., 2017. Plant species richness and productivity determine the diversity of soil fungal guilds in temperate coniferous forest and bog habitats. Molecular Ecology 26, 4846-4858, <https://doi.org/10.1111/mec.14246>.

Hiscox, J., Israelstam, G., 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian journal of botany 57, 1332-1334.

Kabata-Pendias A, Pendias H (2001) Trace elements in soils and plants. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, p 403.

Kabata-Pendias, A., 2000. Trace elements in soils and plants, 3rd Edition ed. CRC press, Boca Raton, <https://doi.org/10.1201/9781420039900>.

Kabata-Pendias, A., Szteke, B., 2015. Trace elements in abiotic and biotic environments. Taylor & Francis, Boca Raton London New York, <https://doi.org/10.1201/b18198>.

Kumar, V., Pandita, S., Singh Sidhu, G.P., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A.S., Setia, R., 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. Chemosphere 262, 127810, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>.

Kumar, V., Sharma, A., Kaur, P., Singh Sidhu, G.P., Bali, A.S., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., Cerda, A., 2019. Pollution assessment of heavy metals in soils of India and ecological risk assessment: A state-of-the-art. Chemosphere 216, 449-462, 10.1016/j.chemosphere.2018.10.066.

Lai, H.-Y., 2014. Effects of leaf area and transpiration rate on accumulation and compartmentalization of cadmium in *impatiens walleriana*. Water, Air, & Soil Pollution 226, 2246,10.1007/s11270-014-2246-9.

Lancheros, A., Brito, O., Guimarães, M.d.F., 2024. Exploring the effects of B10 biodiesel contamination on *Canavalia ensiformis* growth and nutrition in artificially contaminated soil. Remediation Journal 34, e 21769, <https://doi.org/10.1002/rem.21769>.

Li, Q., Chen, H.-H., Qi, Y.-P., Ye, X., Yang, L.-T., Huang, Z.-R., Chen, L.-S., 2019. Excess copper effects on growth, uptake of water and nutrients, carbohydrates, and PSII photochemistry revealed by OJIP transients in Citrus seedlings. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 30188-30205, 10.1007/s11356-019-06170-2.

Lillo, F., Ginocchio, R., Ulriksen, C., Dovletyarova, E.A., Neaman, A., 2019. Evaluation of connected clonal growth of *Solidago chilensis* as an avoidance mechanism in copper-polluted soils. *Chemosphere* 230, 303-307, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.199>.

Maia, F., Miranda, N., Melo, I., Viana, M., Góis, S., 2013. Biomassa de feijão de porco sob diferentes densidades de semeadura em Mossoró, RN. *Agropecuária Científica no Semiárido* 9, 43-49, (in portuguese).

Malavolta, E., 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira, 2. ed., ver. e atual. Piracicaba: Potafos (in portuguese).

Marques, D.M., da Silva, A.B., Mantovani, J.R., Magalhães, P.C., de Souza, T.C., 2019. Root morphology and leaf gas exchange in *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Caesalpinioideae) exposed to copper-induced toxicity. *South African Journal of Botany* 121, 186-192, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.007>.

Meirelles, F.C., Cavalcante, A.G., Gonzaga, A.R., Filla, V.A., Coelho, A.P., Lemos, L.B., Arf, O., 2023. Intercropping of upland rice with green manures in the Brazilian Cerrado. *Archives of Agronomy and Soil Science* 69, 1146-1160, 10.1080/03650340.2022.2068795.

Melkonian, J., Wolfe, D.W., Owens, T.G., 2005. Effects of elevated carbon dioxide on gas exchange and photochemical and nonphotochemical quenching at low temperature in tobacco plants varying in Rubisco activity. *Photosynthesis Research* 83, 63-74, 10.1007/s11120-004-3921-2.

Moro, C.F., Nogueira, F.C.S., Almeida, C.G.M., Real-Guerra, R., Dalberto, P.F., Bizarro, C.V., Ligabue-Braun, R., Carlini, C.R., 2023. One enzyme, many faces: urease is also canatoxin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 41, 10750-10761, 10.1080/07391102.2022.2158938.

Nijs, I., Ferris, R., Blum, H., Hendrey, G., Impens, I., 1997. Stomatal regulation in a changing climate: a field study using Free Air Temperature Increase (FATI) and Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant, Cell & Environment* 20, 1041-1050, 10.1111/j.1365-3040.1997.tb00680.x.

Parkinson, K.J., Day, W., Leach, J.E., 1980. A portable system for measuring the photosynthesis and transpiration of graminaceous leaves. *Journal of Experimental Botany* 31, 1441-1453, 10.1093/jxb/31.5.1441.

Poggere, G., Gasparin, A., Barbosa, J.Z., Melo, G.W., Corrêa, R.S., Motta, A.C.V., 2023. Soil contamination by copper: Sources, ecological risks, and mitigation strategies in Brazil. *Journal of Trace Elements and Minerals* 4, 100059, <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2023.100059>.

Preston, W., da Silva, Y.J.A.B., do Nascimento, C.W.A., da Cunha, K.P.V., Silva, D.J., Ferreira, H.A., 2016. Soil contamination by heavy metals in vineyard of a semiarid region: An approach using multivariate analysis. *Geoderma Regional* 7, 357-365, <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2016.11.002>.

Purwandari, F.A., Westerbos, C., Lee, K., Fogliano, V., Capuano, E., 2023. Proximate composition, microstructure, and protein and starch digestibility of seven collections of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) with different optimal cooking times. *Food Research International* 170, 112956, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112956>.

Rahman, M.M., Azirun, S.M., Boyce, A.N., 2013. Enhanced accumulation of copper and lead in amaranth (*Amaranthus paniculatus*), indian mustard (*Brassica juncea*) and sunflower (*Helianthus annuus*). *PLOS ONE* 8, e62941, 10.1371/journal.pone.0062941.

Raij Van B (1991) Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba, Ceres, p 343 (in portuguese).

Raij Van B, Andrade JC, Cantarela H, Quaggio, JA (2001) Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas, Instituto Agrônômico, p 285 (in portuguese).

Ramírez-Zamora, J., Mussali-Galante, P., Rodríguez, A., Castrejón-Godínez, M.L., Valencia-Cuevas, L., Tovar-Sánchez, E., 2022. Assisted phytostabilization of mine-tailings with *Prosopis laevigata* (Fabaceae) and Biochar. *Plants* 11, 10.3390/plants11243441.

Rangel, T.S., Santana, N.A., Jacques, R.J.S., Ramos, R.F., Scheid, D.L., Koppe, E., Tabaldi, L.A., de Oliveira Silveira, A., 2023. Organic fertilization and mycorrhization increase copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis* in a sandy soil. *Environmental Science and Pollution Research* 30, 68271-68289, 10.1007/s11356-023-27126-7.

Ravet, K., Pilon, M., 2013. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 19, 919-932, 10.1089/ars.2012.5084.

Ribeiro de Souza, S.C., Adrián López de Andrade, S., Anjos de Souza, L., Schiavinato, M.A., 2012. Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. *Journal of Environmental Management* 110, 299-307, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.015>.

Santana, N.A., Ferreira, P.A.A., Tarouco, C.P., Schardong, I.S., Antonioli, Z.I., Nicoloso, F.T., Jacques, R.J.S., 2019. Earthworms and mycorrhization increase copper phytoextraction by *Canavalia ensiformis* in sandy soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182, 109383, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109383>.

Santana, P.H.L., Burak, D.L., Thiengo, C.C., Peçanha, A.L., Neves, M.A., Mendonça, E.d.S., 2020. Jack beans and vetiver grass growth on iron ore tailing sediments from the Doce River dam disaster in Brazil: plant growth regulator effects under different edaphic conditions. *Journal of Soils and Sediments* 20, 4103-4110, 10.1007/s11368-020-02774-1.

Santos, H.G.d., Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C.d., Oliveira, V.Á.d., Lumbrreras, J.F., Coelho, M.R., Almeida, J.A.d., Filho, J.C.d.A., Oliveira, J.B.d., Cunha, T.J.F., 2018. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 5. ed. rev. e ampl. ed. Embrapa, Brasília, DF, Brasil, <https://www.agroapi.cnptia.embrapa.br/portal/assets/docs/SiBCS-2018-ISBN-9788570358004.pdf>. (in portuguese).

Santos, W.P.d., Silva, M.L.N., Avanzi, J.C., Acuña-Guzman, S.F., Cândido, B.M., Cirillo, M.Â., Curi, N., 2021. Soil quality assessment using erosion-sensitive indices and fuzzy membership under different cropping systems on a Ferralsol in Brazil. *Geoderma Regional* 25, e00385, <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2021.e00385>.

Scheffer-Basso, S.M., 1999. Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC e *Lotus* L. UFRGS, <https://books.google.com.br/books?id=22bpZwEACAAJ>

Scott, A.J., Knott, M., 1974. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30, 507-512, 10.2307/2529204.

Shabbir, Z., Sardar, A., Shabbir, A., Abbas, G., Shamshad, S., Khalid, S., Natasha, Murtaza, G., Dumat, C., Shahid, M., 2020. Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere* 259, 127436, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127436>.

Sharma, S., Nagpal, A.K., Kaur, I., 2018. Heavy metal contamination in soil, food crops and associated health risks for residents of Ropar wetland, Punjab, India and its environs. *Food Chemistry* 255, 15-22, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.037>.

Sherasia, P., Garg, M.R., Bhandari, B., 2018. Pulses and their by-products as animal feed. United Nations.

Sherasia, P.L., Garg, M.R., Bhandari, B.M., 2018. Pulses and their By-Products as Animal Feed. United Nations, <https://doi.org/10.18356/9aa0e148-en>.

Silva, F.C.d., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, Rio de Janeiro, Brasil, <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/330496>, (in Portuguese).

Silva-López, R.E.d., 2012. *Canavalia ensiformis* (L) DC (Fabaceae). *Revista Fitos* 7, 146-154, <https://doi.org/2012.149> 10.32712/2446-4775.2012.149, (in portuguese).

Siqueira-Silva, A.I., Rios, C.O., Pereira, E.G., 2019. Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers. *Journal of Environmental Sciences* 78, 257-266, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.10.005>.

Smical, A.I., Hotea, V., Oros, V., Juhasz, J., Pop, E., 2008. Studies on transfer and bioaccumulation of heavy metals from soil into lettuce. *Environmental Engineering and Management Journal* 7, 609-615, 10.30638/eemj.2008.085.

Soares, D.O., Pinto, K.G., Bhowmik, P.C., Albertino, S.M., 2022. chemical properties of soil and cassava yield as a function of weed management by cover crops in the Amazon ecosystem, *Sustainability*, 10.3390/su14031886.

Soil Survey Staff. 2022. Keys to Soil Taxonomy, 13th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, <https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-09/Keys-to-Soil-Taxonomy.pdf>.

Sun, M., Li, S., Gong, Q., Xiao, Y., Peng, F., 2022. Leucine contributes to copper stress tolerance in peach (*Prunus persica*) seedlings by enhancing photosynthesis and the antioxidant defense system. *Antioxidants*, 10.3390/antiox11122455.

Teixeira, N.L., Caxito, F.A., Rosière, C.A., Pecoits, E., Vieira, L., Frei, R., Sial, A.N., Poitrasson, F., 2017. Trace elements and isotope geochemistry (C, O, Fe, Cr) of the Cauê iron formation, Quadrilátero Ferrífero, Brazil: Evidence for widespread microbial dissimilatory iron reduction at the Archean/Paleoproterozoic transition. *Precambrian Research* 298, 39-55, <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2017.05.009>.

Wang, R.-X., Wang, Z.-H., Sun, Y.-D., Wang, L.-L., Li, M., Liu, Y.-T., Zhang, H.-M., Jing, P.-W., Shi, Q.-F., Yu, Y.-H., 2024. Molecular mechanism of plant response to copper stress: A review. *Environmental and Experimental Botany* 218, 105590, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105590>.

Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144, 307-313, [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).

Yadav, M., George, N., Dwibedi, V., 2023. Emergence of toxic trace elements in plant environment: Insights into potential of silica nanoparticles for mitigation of metal toxicity in plants. *Environmental Pollution* 333, 122112, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122112>.

Yang, Q., Li, Z., Lu, X., Duan, Q., Huang, L., Bi, J., 2018. A review of soil heavy metal pollution from industrial and agricultural regions in China: Pollution and risk assessment. *Science of the Total Environment* 642, 690-700, 10.1016/j.scitotenv.2018.06.068.

Yusuf, D., Kholifaturrohman, R., Nurcholis, M., Setiarto, R.H.B., Anggadhanian, L., Sulistiani, 2023. Potential of white Jack Bean (*Canavalia ensiformis* L. DC) Kefir as a microencapsulated antioxidant. *Preventive nutrition and food science* 28, 453-462, 10.3746/pnf.2023.28.4.453.

Zhafira, A.S., Dwiyantri, H., Aini, N., 2023. Development of breakfast food from black rice and porang supplemented with jackbean and red dragon fruit. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1200, 012027, 10.1088/1755-1315/1200/1/012027.

Zhang, B.B., Xu, J.L., Zhou, M., Yan, D.H., Ma, R.J., 2018. Effect of light quality on leaf photosynthetic characteristics and fruit quality of peach (*Prunus persica* L. Batch). *Photosynthetica* 56, 1113-1122, 10.1007/s11099-018-0820-x.

Zhang, C., 2015. Involvement of Iron-Containing Proteins in Genome Integrity in *Arabidopsis Thaliana*. *Genome integrity* 6, 2, 10.4103/2041-9414.155953.

Zhang, D., Liu, X., Ma, J., Yang, H., Zhang, W., Li, C., 2019. Genotypic differences and glutathione metabolism response in wheat exposed to copper. *Environmental and Experimental Botany* 157, 250-259, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.06.032>.

Zhang, Q., Deng, J., Zhu, W., Wu, S., Bai, X., Zhou, Y., Yin, Y., 2021. Land-use types combined with plant species alter soil fungal community and functional guilds in the eastern mountainous region of Liaoning Province, China. *Polish Journal of Environmental Studies* 30, 477-495, 10.15244/pjoes/121047.

Zhang, T., Xu, W., Lin, X., Yan, H., Ma, M., He, Z., 2019. Assessment of heavy metals pollution of soybean grains in North Anhui of China. *Science of The Total Environment* 646, 914-922, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.335>.

Zhang, X., Fu, G., Xing, S., Fu, W., Liu, X., Wu, H., Zhou, X., Ma, Y., Zhang, X., Chen, B., 2022. Structure and diversity of fungal communities in long-term copper-contaminated agricultural soil. *Science of The Total Environment* 806, 151302, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151302>.

Zhang, Y., Yang, Z., Zhang, Z., Li, Y., Guo, J., Liu, L., Wang, C., Fan, H., Wang, B., Han, G., 2023. Root hair development and adaptation to abiotic stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 71, 9573-9598, 10.1021/acs.jafc.2c07741.

CAPÍTULO II

Respostas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, cultivada durante dois anos sob concentrações isoladas de cobre e ferro no solo: tolerância ou toxicidade?

Resumo

Estudos que avaliam o crescimento de plantas lenhosas com potencial de tolerância e fitorremediação a longo prazo são poucos, muitos avaliam arsênio, cádmio e chumbo, mas não avaliam o crescimento e fisiologia da planta, assim como a dinâmica de EPTs no sistema planta-solo, principalmente de micronutrientes como Cu e Fe. Este estudo busca compreender e avaliar o crescimento de *Leucaena leucocephala* ao excesso de Cu e Fe no solo por 12 e 24 meses de cultivo em casa de vegetação. Além disso busca responder a hipótese de que longos períodos de cultivo propiciem aumento no acúmulo desses EPTs. Para isso experimentos de 12 e 24 meses foram conduzidos em casa de vegetação, usando vasos de 10 dm³ de solo. Os tratamentos 50, 150, 250 e 350 mg dm⁻³ de cada elemento (CuSO₄*5H₂O e FeSO₄*7H₂O) foi incorporado ao solo (Oxisol) de cada unidade experimental, além do controle. Sementes de *Leucaena leucocephala* foram semeadas e após a emergência foram cultivadas por 12 e 24 meses. Foram feitas avaliações biométricas (comprimento, diâmetro) ao longo de 12 e 24 meses, trocas gasosas; peso fresco e seco dos órgãos (raiz, folhas e caules), quantificação de Cu e Fe nos órgãos das plantas e quantificação da biodisponibilidade dos elementos no solo, antes e depois do cultivo das plantas. Cálculos de fitorremediação foram realizados com base na biomassa e teores de Cu e Fe nas plantas e no solo. *L. leucocephala* não foi tolerante ao Cu em ambos os tempos de cultivo. A espécie tolerou as concentrações de Fe no solo até T250. A resposta das plantas aos EPTs foi diferente ao longo do tempo. O tempo de exposição ao EPT influenciou negativamente a biomassa das plantas submetidas ao Cu, diferentemente do Fe. As plantas acumularam mais Cu ao longo do tempo, já o mesmo não aconteceu para as plantas submetidas ao Fe.

Palavras-chave: micronutrientes metálicos; elementos potencialmente tóxicos; cultivo a longo prazo, leguminosa, plantas lenhosas, biomassa, acúmulo

^b O artigo segue as normas do periódico *Environmental and Experimental Botany (EEB)*

Abstract:

Studies that evaluate the growth of woody plants with long-term tolerance and phytoremediation potential are few, many evaluate arsenic, cadmium and lead, but do not evaluate plant growth and physiology, as well as the dynamics of PTEs in the plant-soil system, mainly micronutrients such as Cu and Fe. This study aims to understand and evaluate the growth of *Leucaena leucocephala* in excess of Cu and Fe in the soil for 12 and 24 months of cultivation in a greenhouse. Furthermore, it aims to answer the hypothesis that long periods of cultivation lead to an increase in the accumulation of these PTEs. For this purpose, experiments lasting 12 and 24 months were carried out in a greenhouse, using 10 dm³ pots of soil. Treatments 50, 150, 250 and 350 mg dm⁻³ of each element (CuSO₄*5H₂O and FeSO₄*7H₂O) were incorporated into the soil (Oxisol) of each experimental unit, in addition to the control. *Leucaena leucocephala* seeds were sown and after emergence they were cultivated for 12 and 24 months. Biometric assessments (length, diameter) were carried out over 12 and 24 months, gas exchange; fresh and dry weight of organs (roots, leaves and stems), quantification of Cu and Fe in plant organs and quantification of the bioavailability of elements in the soil, before and after plant cultivation. Phytoremediation calculations were carried out based on biomass and Cu and Fe contents in plants and soil. *L. leucocephala* was not tolerant to Cu at both cultivation times. The species tolerated soil Fe concentrations up to T250. The response of plants to PTEs was different over time. The time of exposure to PTEs negatively influenced the biomass of plants subjected to Cu, unlike Fe. The plants accumulated more Cu over time, the same did not happen for plants subjected to Fe.

Key words: metallic micronutrients; potentially toxic elements; long-term cultivation, legume, woody plants, biomass, accumulation

1. Introdução

Estudos sobre fitorremediação, uso de plantas para remediar áreas degradadas, tem aumentado ultimamente, devido à preocupação mundial sobre a segurança alimentar (Goswami e Neog, 2023; Zhang et al., 2024). A contaminação do solo por elementos potencialmente tóxicos (EPTs) tem aumentado, e esses EPTs podem ser bioacumulados na cadeia trófica. O uso de plantas para remediar, estabilizar ou ainda fitoextrair esses EPTs são estratégias sustentáveis. Além do fato de que a fitorremediação é promissora na produção de biomassa (dependendo da espécie), sequestro de carbono, melhora a qualidade e produtividade do solo e mantém a estabilidade do solo (Sarma et al., 2019; Liu et al., 2023; Hassan et al., 2024).

Elementos como arsênio, cádmio e chumbo são extensivamente estudados (Singh et al., 2020; Ullah et al., 2023; Doku et al., 2024; Yasin et al., 2024), em sua maioria por curtos períodos de cultivo, pesquisas de longo prazo são poucas (Singh et al., 2020; Doku et al., 2024). Muitos desses estudos avaliam as plantas em curtos períodos de cultivo, de horas a dias, mas podem gerar falsas expectativas de que a planta será tolerante e sobreviverá ao longo do tempo, e cumprirá o seu papel remediador (van der Ent et al.,

2024). Experimentos de curto período de cultivo são importantes para caracterização inicial do potencial de cada espécie, mas estudos sequenciais, com períodos de cultivo maiores são mais relevantes para compreender a real capacidade de cada espécie. Além disso, o cultivo a longo prazo, em condições de campo, pode melhorar os teores de nutrientes dos solos com alta concentração EPTs, através de períodos sucessivos de ciclagem de nutrientes, melhorando a qualidade do solo (Yu et al., 2021).

Um estudo bibliométrico revelou algumas tendências sobre pesquisas de fitorremediação durante o período de 2009 a 2022 em que há muitas pesquisas sobre os seguintes tópicos: “solo-calcário”; “solo co-contaminado”; “disponibilidade de metais”; e “contaminação por metais pesados” e as palavras-chave mais encontradas foram: “lodo de esgoto” seguida por “hiperacumulação” (Zhang et al., 2024). Isso sugere que muitas pesquisas estão mais concentradas na remediação do solo, uso de aditivos para auxiliar na remediação e em espécies que acumulam elevadas concentrações de EPTs, as hiperacumuladoras, do que na avaliação fisiológica, respostas metabólicas, dinâmica dos elementos nas plantas e no potencial de espécies não hiperacumuladoras, como no caso deste estudo.

Nosso grupo de pesquisa tem explorado o potencial de espécies de leguminosas arbóreas, fixadoras de nitrogênio como *Lonchocarpus cultratus* (Oliveira et al., 2021); *Inga uruguensis* (Frachia et al., 2022) e *Peltophorum dubium* (da Silva Paiva et al., 2024); e não fixadoras de nitrogênio como *Astronium graveolens* e *Astronium fraxinifolium* (Araujo et al., 2020; Leite et al., 2022), em resposta a diferentes concentrações de elementos potencialmente tóxicos no solo como ao boro e ao chumbo, além de outras pesquisas ainda não publicadas. Além de espécies nativas (Brasil) exploramos o potencial de espécies exóticas e de ampla cobertura vegetal como a *Leucaena leucocephala* aos elementos cobre e ferro (Bomfim et al., 2021 e 2023ab). Esses resultados têm sido promissores e novas hipóteses precisavam ser testadas, por isso, a *L. leucocephala* foi escolhida como objeto desse estudo.

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit é uma planta arbóreo arbustiva, rápido crescimento, lenhosa com alta produção de biomassa, espécie pioneira na sucessão ecológica, nativo da América Central, exótica (Brasil), pertencente à família *Fabaceae*, tolerante a seca e a solos pouco férteis. É uma leguminosa que por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* promove a fixação de nitrogênio (Alemán-Ramirez et al., 2022). *L. leucocephala* apresenta alguns potenciais de aplicação e estudo quanto a

produção de etanol (Singh et al., 2014; Ishak et al., 2021); biodiesel (Yusuff, 2019 e 2021); biocarvão (Nurhadi et al., 2021).

Alguns estudos indicam que *L. leucocephala* é tolerante a alguns elementos potencialmente tóxicos, como arsênico, cádmio, zinco (Rangel et al., 2017; Schneider et al., 2017; Kaur et al., 2018); com acúmulo de ferro, manganês e níquel em as raízes (Bomfim et al. 2021; Kahangwa et al. 2021), e seus o uso potencial em estratégias de fitorremediação já foi relatado (Ssenku et al., 2017; Bageel et al., 2020; Bomfim et al., 2021; Kahangwa et al., 2021).

O potencial de tolerância e fitoestabilização de *Leucaena leucocephala* ao excesso de Cu e Fe no solo (100; 200; 300; 400 e 500 mg dm⁻³ de solo) em um curto período de cultivo (120 dias), foi avaliado e documentado que a espécie foi tolerante aos tratamentos desses elementos (Bomfim et al., 2021 e 2023). E de acordo com os resultados encontrados, duas hipóteses foram levantadas: (1) o tempo de cultivo influencia no desenvolvimento, produção de biomassa e na tolerância das espécies ao excesso de Cu e Fe, visto que estes são pouco móveis no solo; (2) o cultivo de *Leucaena leucocephala* a longo prazo propicia aumento de biomassa e acúmulo de Cu e Fe.

A partir dessas hipóteses, o objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento, trocas gasosas, produção de biomassa, tolerância, acúmulo e translocação de Cu e Fe, isoladamente, de *Leucaena leucocephala*, a longo prazo, especificamente, aos 12 e 24 meses. Além disso, comparou-se os resultados de 12 com 24 meses, para compreender a dinâmica da resposta da planta ao longo do tempo para cada micronutriente metálico isoladamente.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização do solo

O solo utilizado neste estudo, Latossolo Vermelho Distrófico típico de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação (Demattê, 1980; Santos et al., 2018) ou Typic Haplustox (Oxisol) pela classificação da USDA Soil Survey Staff (2022), foi coletado (camada de 0 – 40 cm profundidade) na área experimental da fazenda de ensino, pesquisa e extensão (FEPE), setor de produção animal, Selvíria- MS (20° 20' 24,9" S 51° 24' 19,7" W). Duas amostras de solo, compostas por 10 subamostras cada, foram removidas para caracterização química (Raij, 1991), densidade do solo pelo método do cilindro volumétrico e classificação textural (Teixeira et al., 2017) de acordo com Tabela 1. O solo foi utilizado nas condições apresentadas na Tabela 1, não foi realizado correção de

acidez, sem adição de fertilizantes (orgânicos ou inorgânicos) ou inoculação de rizóbios e micorrizas.

Tabela 1: Caracterização físico-química do solo, camada de 0 - 40 cm de profundidade do solo utilizado (Oxisol).

Caracterização química do solo	camada de 0 – 40 cm
pH	5,30
Saturação por bases - V%	50,00
Soma de bases- SB	1,31 cmol _c .dm ⁻³
Cálcio- Ca ²⁺	0,7 cmol _c .dm ⁻³
Potássio- K ⁺	0,01 cmol _c .dm ⁻³
Magnésio- Mg ²⁺	0,06 cmol _c .dm ⁻³
Acidez potencial- H ⁺ +Al ³⁺	1,3 cmol _c .dm ⁻³
Alumínio- Al ³⁺	0,00 cmol _c .dm ⁻³
P- Resina	1,00 mg dm ⁻³
Matéria orgânica- MO	16,00 g dm ⁻³
capacidade de troca catiônica- CTC	2,61 cmol _c .dm ⁻³
Análise de micronutrientes	
Manganês- Mn	5,50 mg dm ⁻³
Ferro-Fe	16,00 mg dm ⁻³
Cobre- Cu	0,50 mg dm ⁻³
Zinco- Zn	0,20 mg dm ⁻³
Boro- B	0,06 mg dm ⁻³
Caracterização física do solo	
Argila	134 g kg ⁻¹
Areia	855 g kg ⁻¹
Silte	12 g kg ⁻¹
Densidade	1,47 kg dm ⁻³

2.2 Tratamentos de Cobre e Ferro

Os elementos traços avaliados neste estudo foram o Cu e o Fe. As concentrações (tratamentos) de Cu e Fe testadas foram: 0 (controle), 50, 150, 250 e 350 mg dm⁻³ de solo, as quais foram nomeadas de T0, T50, T150, T250 e T350 respectivamente. Foram preparadas soluções estoques de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄*5H₂O) e sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄*7H₂O). Os volumes 0, 20, 60, 100 e 140 ml da solução estoque de cada elemento foram diluídos em água destilada até completar o volume final de 500 ml para realizar a contaminação artificial (tratamentos) de 10 dm³ de solo.

As soluções descritas acima foram adicionadas (aplicação única) em cada unidade de solo (10 dm³) e em seguida o solo foi homogeneizado mecanicamente em betoneira. Posteriormente, foram acondicionados em sacos plásticos transparentes, identificados pelo número de tratamentos e repetições, correspondentes às unidades experimentais e incubados por 30 dias, em casa de vegetação, para estabilização dos TE no solo.

Após o período de incubação, amostras compostas de solo foram retiradas e submetidas à análise química de pH ($4,8 \pm 0,06$) e concentração de Cu e Fe biodisponível no solo (disponível para a planta) (Raij et al. 2001; Silva, 2009). A extração dos micronutrientes no solo (5 g) foi feita com a solução extratora (25 ml), duplo-ácida, de Mehlich 1 (HCl 0.05 M + H₂SO₄ 0,0125 M), na relação solo:extrator 1:5, a amostra foi agitada, em velocidade de 40 rpm, em agitador horizontal circular durante cinco minutos, (mais informações estão descritas no apêndice A e C). A determinação foi feita por ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. O limite de quantificação para Cu e Fe, no solo, foi estimado em 1,5 e 18 mg kg⁻¹, respectivamente (Silva, 2009). A marca e modelo do ICP-OES foi: Varian, modelo ES710A. O espectrômetro de ICP foi ajustado para as linhas espectrais de Cu e Fe: a 327,395 e 238,204 nm, respectivamente. Esses resultados de concentração biodisponível de Cu e Fe no solo foram chamados de TEC_{soil} (mg Kg⁻¹) e usados para o cálculo da concentração (mg) de Cu e Fe disponível no solo antes (CBC) do cultivo de *L. leucocephala* (Eq.1).

$$CBC = (TEC_{soil} * V_{soil}) * D_{soil} \text{ (Eq. 1)}$$

Onde: V_{soil}: volume do solo utilizado (dm³) e D_{soil}: densidade do solo (kg dm⁻³).

O TEC_{soil}, CBC, pH e MO, de Cu e Fe, antes do cultivo das plantas estão descritos na Tabela 5 (apêndice D), para 12 e 24 meses. O solo foi transferido para vasos com capacidade para 10 dm³ de solo, os vasos apresentam 29, 25 e 18 cm de altura, diâmetro do topo e da base, respectivamente.

2.3 Design experimental

Dois experimentos independentes, um para Cu e um para Fe, foram realizados concomitantemente em casa de vegetação por 12 e 24 meses (fator tempo), desde a semeadura até a coleta das plantas (Cu12; Cu24; Fe12; Fe24). Para cada elemento, cinco concentrações/tratamentos (fator tratamento) foram testadas, cada tratamento foi composto por seis repetições, compostas por um indivíduo em cada unidade experimental, totalizando 30 unidades experimentais em delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo por elemento (DICs de 60 unidades).

O experimento foi realizado em casa de vegetação, sob condições naturais de luz e temperatura, com irrigação automática por aspersão, na área experimental do Laboratório

de Fisiologia do Metabolismo Vegetal da Universidade do Estado de São Paulo (Unesp), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira- SP (20° 25' 06,0" S e 51° 20' 29,7" W), Brasil, entre outubro de 2020 a novembro de 2021, para o experimento de 12 meses, e a outubro de 2022, para o experimento de 24 meses. As condições de temperatura e umidade relativa foram temperatura média de 25,37 °C; temperatura máxima de 32,85°C; temperatura mínima de 19,33 °C e umidade relativa média de 70,99%.

2.4 Escolha do material vegetal

Foram utilizadas sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, cultivar K132, pureza 98%, germinação e viabilidade 60% (mínima), lote 100/2017, obtidas comercialmente por Sementes Caiçara® (Brejo Alegre, SP, Brasil). As sementes foram selecionadas de acordo com seu tamanho e forma e não foi realizado nenhum tratamento nas sementes, seja fitossanitário ou inoculação de rizóbios ou fungos micorrízicos. As sementes foram escarificadas mecanicamente e embebidas em água por 24 horas. Cinco sementes foram semeadas em cada unidade experimental na profundidade de 2.00 cm, e após a emergência das plântulas (aos 23 e 45 dias) foram desbastadas e o experimento foi realizado com uma planta por vaso, durante 12 e 24 meses.

2.5 Análise de trocas gasosas

Para determinar a resposta fotossintética das plantas, as trocas gasosas foram medidas em cada repetição aos 12 e 24 meses após a germinação, utilizando um analisador portátil de trocas gasosas, CIRAS-3 (Portable Photosynthesis System – PP Systems), de acordo com as condições ambientais. As medições foram realizadas em folíolos totalmente desenvolvidos e aparentemente saudáveis, na região do 2º ou 3º trifólio abaixo do meristema apical, entre 09h00 e 12h00 da manhã, com temperatura média diária na casa de vegetação de 35,50° C para todos os tratamentos.

As seguintes configurações foram ajustadas para troca gasosa: um folíolo dentro da cubeta universal de folhas PLC3 (janela 18 × 25 mm), 390 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ de referência, 60% de água de referência (umidade), fluxo da cubeta a 300 ml min⁻¹, fluxo do analisador a 100 ml min⁻¹, fonte de luz ambiente, sensor de radiação infravermelha (IR) para medição de temperatura foliar (36,00 °C), com uma média de radiação externa de 1058,70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, área foliar 4,50 cm², resistência da camada limite 0,40 m² s mol⁻¹, proporção estomática 50%, com auto-zero calibração do sistema (Melkonian et al. 2005; Zhang et al. 2018).

Os seguintes parâmetros foram analisados e calculados com base nas equações de Parkinson et al. (1980); Nijs et al. (1997); Cannel e Thornley (2000) e Zhang et al. (2018): taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); condutância estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); eficiência no uso da água (WUE , $\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$); eficiência intrínseca do uso da água ($EIUA$, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$); concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$); razão entre carbono interno e externo (C_iCa : C_i/C_a , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência de uso de carbono (CUE : A/C_i , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

2.6 Medidas de crescimento e coleta

O comprimento do caule (SL , cm) foi medido com fita métrica, assim como o comprimento da raiz pivotante (PRL , cm) e da raiz total (TRL , cm); o número de folhas (NL) expandidas (trifólio) foi contado; o diâmetro do caule (SD , cm) foi medido com paquímetro digital aos 0,75; 1; 1,47; 3; 6; 9; 12; 21 e 24 meses de cultivo. Ao final dos 12 e 24 meses de cultivo, o material vegetal foi coletado, separado em parte aérea (folhas e caule) e raízes, lavado em água destilada e seco com papel toalha. Foi determinado o peso fresco (g) da parte aérea (SFW), das raízes (RFW). Todas as medidas de crescimento das plantas foram realizadas de acordo com Benincasa (2003).

Após a coleta das plantas, aos 12 e 24 meses, amostras compostas de solo foram retiradas e submetidas à análise química de pH ($6,6 \pm 0,06$) e biodisponibilidade de Cu e Fe pelo método Mehlich 1 (Raij et al. 2001; Silva, 2009) para obtenção da concentração de Cu e Fe biodisponível no solo depois (CAC) do cultivo de *L. leucocephala* (Eq.2).

$$CAC = (TEC_{soil} * V_{soil}) * D_{soil} \text{ (Eq. 2)}$$

Onde: V_{soil} : volume do solo utilizado (dm^3) e D_{soil} : densidade do solo (kg dm^{-3}). O TEC_{soil} , CAC , pH e MO, de Cu e Fe, depois do cultivo das plantas estão descritos na Tabela 6 (apêndice E), para 12 e 24 meses.

2.7 Biomassa e estimativa do teor de Cu e Fe na planta

O restante das folhas, caules e raízes foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada a 60°C por 72 horas (Malavolta, 1997). Foi obtido o peso seco (biomassa, g) de folhas (LDW), caules ($StDW$), raízes (RDW) e biomassa total (soma dos órgãos, TDW) e, em seguida, esse material foi moído em moinho tipo Wiley (peneira de 10 mesh), devidamente separado e identificado quanto a repetição, tratamento e órgão.

As amostras desse material vegetal moído (folha, caule e raiz) foram utilizadas para a determinação do teor total (ambientalmente disponível) de Cu e Fe, para isso utilizou-se o método EPA3051A (US-EPA, 2007) modificado, cuja amostra vegetal sofreu uma pré-digestão com 2 mL de H₂O₂ 30%, de um dia para o outro. Posteriormente, a oxidação da matéria orgânica (0,5 g em 25 mL de extrato) foi feita pelo ácido nítrico (65% m/m) em forno de micro-ondas. O extrato resultante foi ajustado para 25 ml com água mili-Q que foi usada para detectar a concentração dos elementos e as determinações foram lidas em espectrômetro de ICP-OES. A estimativa do limite de quantificação de Cu e Fe, em material vegetal, foi de 1,5 e 10 mg/kg, respectivamente. A marca e modelo do ICP-OES e do sistema de micro-ondas foram: Varian, modelo ES710A e CEM Corporation, modelo MARS 5, respectivamente. O espectrômetro de ICP foi ajustado para as linhas espectrais de Cu e Fe: a 327,395 e 238,204 nm, respectivamente. Esses resultados do teor total (mg Kg⁻¹) dos TEs nos órgãos (TEC_{leaves/stem/root}) das plantas foram utilizados para os cálculos de fitorremediação.

Foram realizados cálculos para determinar o potencial de fitorremediação: índice de tolerância (TI) e índice de translocação (ITR) (Rahman et al. 2013); fator de transferência (TF) (Kabata-Pendias e Pendias 2001); acúmulo dos TEs nos órgãos das plantas (Bomfim et al 2021 e 2023) e porcentagem de acúmulo dos TEs, no sistema radicular (RAP%) e na parte aérea (SAP%), baseado no cálculo do índice de translocação de Rahman et al. 2013.

Foi utilizado os dados de concentração disponíveis (TEC) de cada elemento e a biomassa de cada órgão (RDW, LDW e StDW) para o cálculo de acúmulo: raiz (RAC - Eq.3), folhas (LAC-Eq.4), caule (StAC-Eq.5) e biomassa total (TAC-Eq.6).

$$RAC = (RDW * TEC_{roots})/1000 \text{ (Eq. 3);}$$

$$LAC = (LDW * TEC_{leaves})/1000 \text{ (Eq. 4);}$$

$$StAC = (StDW * TEC_{stem})/1000 \text{ (Eq. 5);}$$

$$TAC = RAC + StAC + LAC \text{ (Eq. 6).}$$

Para os cálculos de acúmulo de ferro dividiu por 1000 e o resultado foi demonstrado em mg órgão⁻¹ e mg planta⁻¹ (TAC). Para cobre não se realizou a divisão e o resultado foi demonstrado em µg órgão⁻¹ e µg planta⁻¹ (TAC).

Índice de tolerância:

$$TI = TDW/TDWT0(Eq. 7)$$

Para o cálculo de TI: entre T50 a T350 foi utilizado a média do tratamento controle de TDW.

Índice de translocação:

$$ITR = (LAC + StAC)/TAC(Eq. 8);$$

Fator de transferência:

$$TF = (RAC + LAC + StAC/CBC)(Eq. 9);$$

Porcentagem de acúmulo na parte aérea:

$$SAP (\%) = ((LAC + StAC)/TAC) * 100 (Eq. 10);$$

Porcentagem de acúmulo na raiz:

$$RAP (\%) = (RAC/TAC) * 100 (Eq. 11).$$

Foi realizado um cálculo de diferença percentual (%) (D%) da disponibilidade de ferro no solo, antes (CBC) e depois (CAC) do cultivo das plantas aos 12 e 24 meses, a fim de saber quanto aumentou ou diminuiu a disponibilidade de ferro no solo dos tratamentos (T50 a T350) em comparação a disponibilidade do tratamento controle (T0), onde:

$$D\%CBC = (CBC * 100)/CBCT0; D\%CAC = (CAC * 100)/CACT0 (Eq. 12).$$

A diferença percentual de antes e depois do cultivo para o tratamento controle foi considerada 100%. Para o cálculo da D% entre T50 a T350 foi utilizado a média do tratamento controle tanto de CBC quanto de CAC.

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variância pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, a 5% de probabilidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade: (a) anova de duas vias e com significância no teste F, a comparação de médias foi realizada por Scott-Knott, e os fatores analisados foram: TRATAMENTOS (0, 50, 150, 250 e 350) x TEMPO (12 e 24); para a partição entre parte aérea e raiz também foi utilizado TRATAMENTOS x ÓRGÃOS (parte aérea e raiz) e para comparar o efeito do cultivo da *L. leucocephala* sobre a disponibilidade do TE no solo foi utilizado: TRATAMENTOS x CULTIVO (antes e depois). (b) para as variáveis cuja a interação entre os fatores não

apresentou diferença significativa foi realizada a anova de uma via e com significância no teste F, a comparação de médias foi realizada por Scott-Knott (Scott e Knott, 1974).

Foram realizadas análises de correlação para cada TE: (d) correlação de Pearson e (e) correlação em rede, entre as variáveis: trocas gasosas; biomassa; acúmulo; índices de tolerância e translocação; e porcentagem de acúmulo na parte aérea e raiz. (f) A análise de componentes principais (PCA), para cada TE, foi realizada entre as variáveis de crescimento (NL, SD, SL e TRL), biomassa (RDW, LDW e StDW), acúmulo (RAC, LAC e StAC), fator de transferência (TF), índice de tolerância (TI) e índice de translocação (ITR), o fator tempo (12 e 24 meses) foi utilizado para fazer o cluster da PCA. (g) Uma terceira análise de componentes principais (PCA) foi realizada com os resultados de 24 meses entre as variáveis de crescimento, trocas gasosas, biomassa, acúmulo, porcentagem de acúmulo, índice de tolerância e translocação, sendo que o fator “elemento” (Cu e Fe) foi utilizado para fazer o cluster da PCA.

O software R, versão 4.2.2, foi utilizado para a análise de dados e para a elaboração dos gráficos (R Core Team, 2021). Os pacotes utilizados no R foram: “car” (Fox e Weisberg, 2019); “cowplot” (Wilke, 2020); “dgoF” (Arnold e Emerson, 2011); “dplyr” (Wickham et al, 2023); “ExpDes.pt” (Ferreira, Cavalcanti e Nogueira, 2021); “factoextra” (Kassambara e Mundt, 2020); “FactoMineR” (Lê, Josse e Husson, 2008); “GGally” (Schloerke et al, 2021); “ggbreak” (Xu et al, 2021); “ggfortify” (Horikoshi e Tang, 2016); “ggh4x” (van den Brand, 2023); “ggplot2” (Wickham, 2016); “ggpubr” (Kassambara, 2023); “ggthemes” (Arnold et al 2021); “GOplot” (Walter, Sanchez-Cabo e Ricote, 2015); “multcompView” (Graves et al, 2023); “plyr” (Wickham, 2011); “psych” (Revelle, 2023); “qgraph” (Epskamp et al, 2012); “readxl” (Wickham e Bryan, 2023) e “rstatix” (Kassambara, 2023).

As principais informações sobre a condução experimental de *L.leucocephala* submetida aos tratamentos de Cu e Fe estão resumidas na Fig.1.

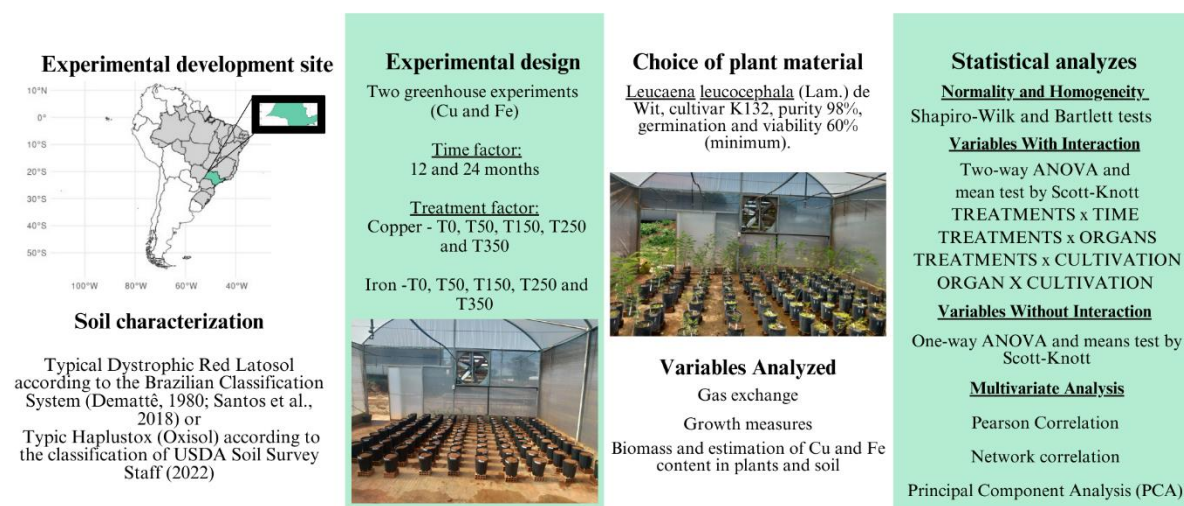


Fig.1: Main information regarding the experimental conduct: location, type of soil, statistical design, treatment, species, variables evaluated and statistical analysis.

3. Resultados

3.1 Cobre

3.1.1 Trocas gasosas

A taxa fotossintética (A) (Fig. 2a) não diferiu entre os tratamentos de Cu aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses o A foi maior em T50, seguido de redução, em T150 com A mais baixo que nos demais tratamentos. Em comparação ao tempo de cultivo, aos 24 meses o T50 e T150 apresentaram aumento e diminuição de 190,34% e 52,89%, respectivamente, de A em relação aos 12 meses de cultivo.

A transpiração (E) (Fig. 2b) não diferiu entre os tratamentos de Cu em ambos os tempos de cultivo. Apenas em T50 houve diferença quanto ao tempo: aos 24 meses o E foi 132,09% maior que aos 12 meses de cultivo. A condutância estomática (gs) (Fig. 1c) não diferiu entre os tratamentos de Cu em ambos os tempos de cultivo, tampouco diferiu na interação (12 e 24) com o tempo de cultivo.

A eficiência do uso da água (WUE) (Fig. 2d) não diferiu entre os tratamentos de Cu aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses a WUE foi maior em T50, seguido de redução, principalmente em T150 com WUE mais baixo que nos demais tratamentos. Em comparação ao tempo de cultivo, aos 24 meses o T150 e T250 apresentaram redução de 47,89% e 72,37%, respectivamente, de WUE em relação aos 12 meses de cultivo. A eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) (Fig. 1e) não diferiu entre os tratamentos de Cu em ambos os tempos de cultivo, tampouco diferiu na interação com o tempo de cultivo.

O carbono interno (Ci); a razão entre carbono interno e externo (CiCa) e eficiência do uso do carbono (CUE) (Fig. 2f g h) não diferiram entre os tratamentos de Cu aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses o Ci foi maior e menor em T150 e T50, respectivamente. Aos 24 meses o Ci, no T150, foi 123,54% maior que aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses a CiCa foi maior em T150, seguido de redução nos demais tratamentos. Não houve diferença significativa na interação tempo de cultivo para CiCa. Aos 24 meses, os tratamentos T0 e T50 apresentaram maior CUE que os demais. Em comparação ao tempo de cultivo, aos 24 meses a eficiência do uso do carbono no T50 foi 148,11% maior que aos 12 meses.

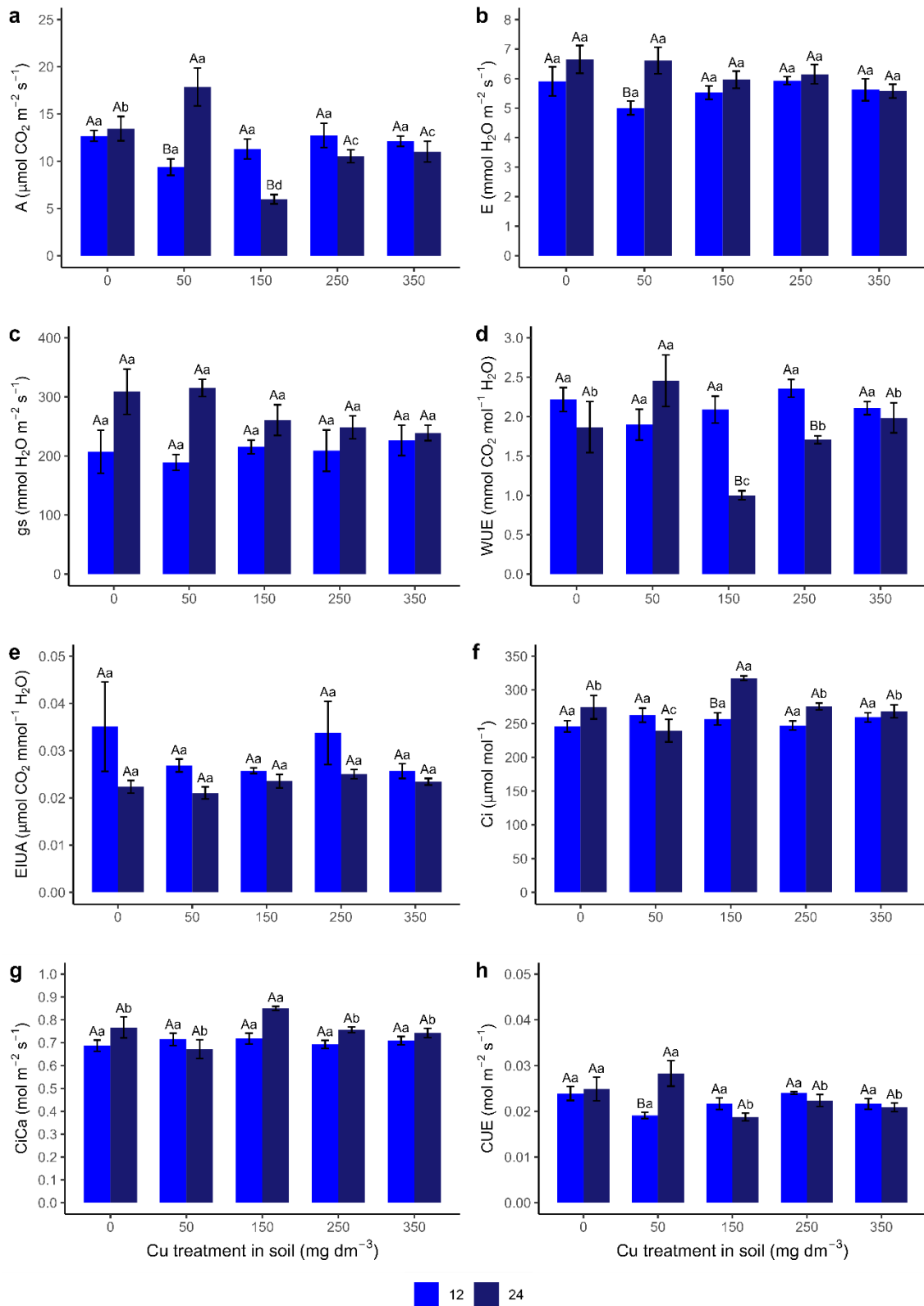


Fig.2: Gas exchange parameters of *L. leucocephala*, subjected to Cu treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) net photosynthesis (A); b) transpiration rate (E); c) stomatal conductance (gs); d) water use efficiency (WUE); e) intrinsic water use efficiency (EIUA); f) carbon use efficiency (CUE); g) internal carbon concentration (Ci) and h) internal and external CO_2 ratio (CiCa). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between 12

and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison between treatments of the same cultivation time.

3.1.2 Parâmetros de crescimento

Observou-se que desde a fase da plântula o crescimento foi influenciado pelo Cu, assim como ao longo do tempo (Fig.3). O comprimento do caule (SL) (Fig.4a) foi maior em T0 e T50, seguido de comprimentos menores nos demais tratamentos, tanto aos 12 quanto aos 24 meses de cultivo (Fig.3g h). Aos 24 meses de cultivo o SL, de T0 e T50, foi $\approx 180,13\%$ maior que aos 12 meses de cultivo. O diâmetro do caule (SD) (Fig. 4b) foi maior em T0 e T50, seguido de redução nos demais tratamentos, tanto aos 12 quanto aos 24 meses de cultivo. Não houve diferença significativa na interação tempo de cultivo para SD.

A raiz pivotante (Fig.4c), de ambos os tempos de cultivo, apresentou o menor comprimento (PRL) em T350 que nos demais tratamentos. Não houve diferença significativa na interação tempo de cultivo para PRL. Aos 12 e 24 meses, o comprimento total da raiz (TRL) (Fig.4d) foi maior entre T0 a T150 e entre T0 a T50, respectivamente, com redução nos demais tratamentos (Fig.3g h). Aos 24 meses o TRL, de T0-T50 e de T250-T350, foi $\approx 152,81\%$ e $\approx 151,38\%$ maior que aos 12 meses de cultivo.

O número de folhas (NL) (Fig.4e) foi maior em T0 e T50 com redução nos demais tratamentos, especialmente em T350, aos 12 meses (Fig.3g). Aos 24 meses, T0 e T50 apresentaram maior número de folhas com redução nos demais tratamentos (Fig.3h). Aos 24 meses, T0 e T150 apresentaram uma diminuição de 55,84% e 54,35% no número de folhas em relação aos 12 meses de cultivo, nos demais tratamentos não houve diferenças. A área foliar das folhas não foi mensurado, mas foi possível observar uma diminuição do tamanho das folhas/folíolos com o aumento dos tratamentos em ambos os tempos de cultivo. Não foram observados sintomas visuais de fitotoxicidade nas folhas/folíolos (Fig.14 apêndice E).

O peso fresco da parte aérea (SFW) e da raiz (RFW) foram apresentados no gráfico de partição de peso fresco entre parte aérea e raiz (Fig.4f) (fator órgão). Tanto aos 12 quanto aos 24 meses de cultivo houve alta produção de SFW e RFW em T0 e a partir de T50 houve baixa produção de massa fresca. Aos 24 meses, em T0 e T50, houve aumento de $\approx 170,69$ e $224,49\%$ de SFW e RFW, respectivamente, em relação aos 12 meses de cultivo. O RFW de T0 e T150 foi 176,13 e 233,72% maior que SFW aos 12 meses (representada no gráfico por “*”). Já aos 24 meses, o RFW, de T0 e T50, foi 205,69 e 155,32% maior que o SFW.

Leucaena leucocephala perde as folhas basais, à medida que folhas jovens surgem, por isso a heterogeneidade no número de folhas (erro padrão). Aos 9 meses de cultivo, uma única planta/unidade experimental do tratamento de Cu: T50 apresentou quatro inflorescências, mas elas foram cortadas com tesoura de poda para evitar o estágio reprodutivo.

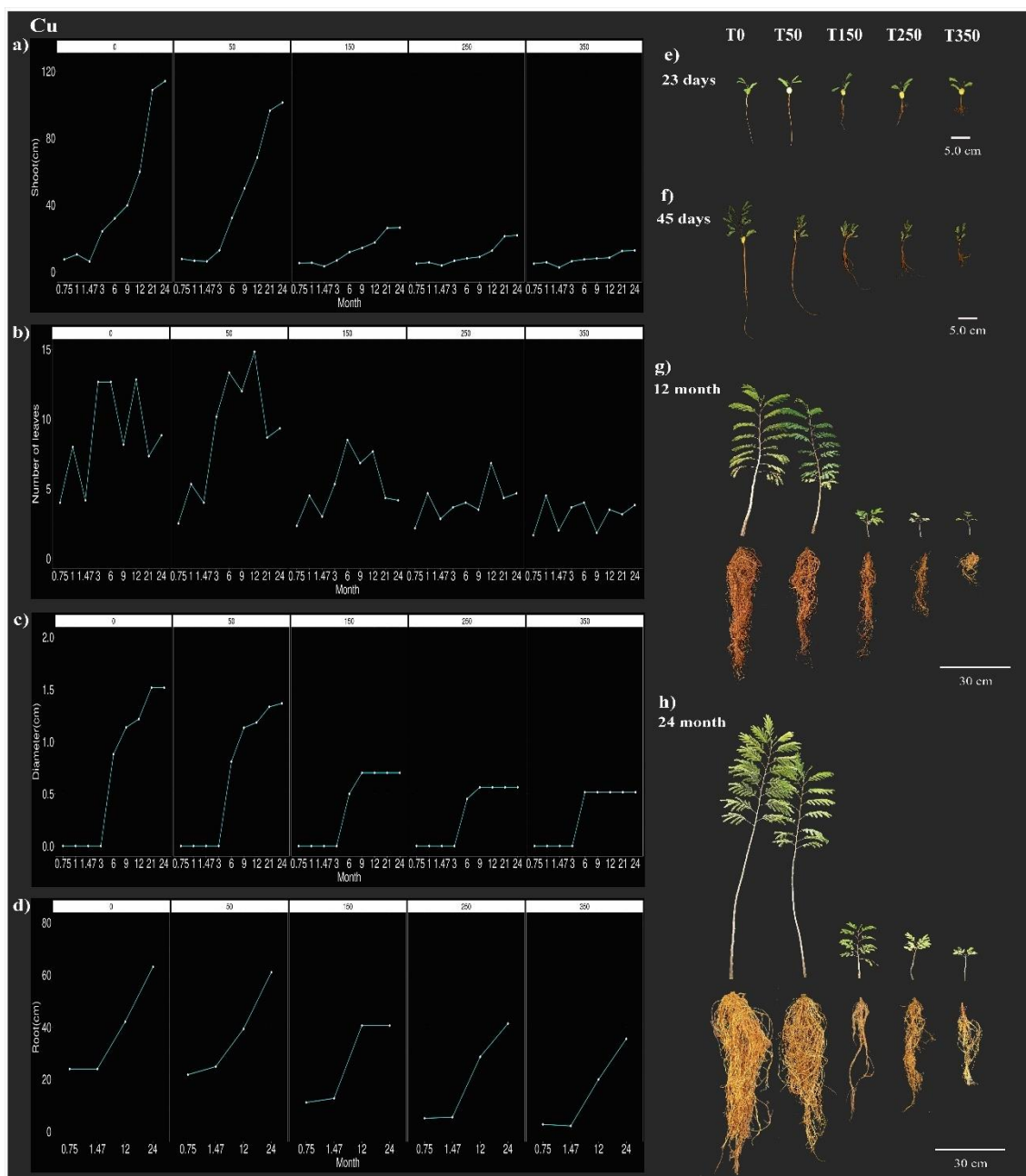


Fig.3: Shoot and root system of *L. leucocephala*, subjected to Cu treatments in the soil throughout 24 months of cultivation: 0,75; 1; 1,47; 3; 6; 9; 12; 21 and 24 months of cultivation. The treatments added, in addition to the control, were: 50; 150; 250 and 350 mg dm⁻³ of soil in a greenhouse. The left side shows graphs showing the means of variables over time: a) shoot length (cm); b) number of leaves; c) stem diameter (cm); d) root length* (cm). Number of observations: 30. Right side presents photos of *L. leucocephala* collected and separated into shoots and roots at: e) 23 days; f) 45 days; g) 12 months and h) 24 months. 23 and 45 days were considered 0,75 and 1,47 months, respectively. *: it was possible to measure root length only at 0,75; 1,47; 12 and 24 months.

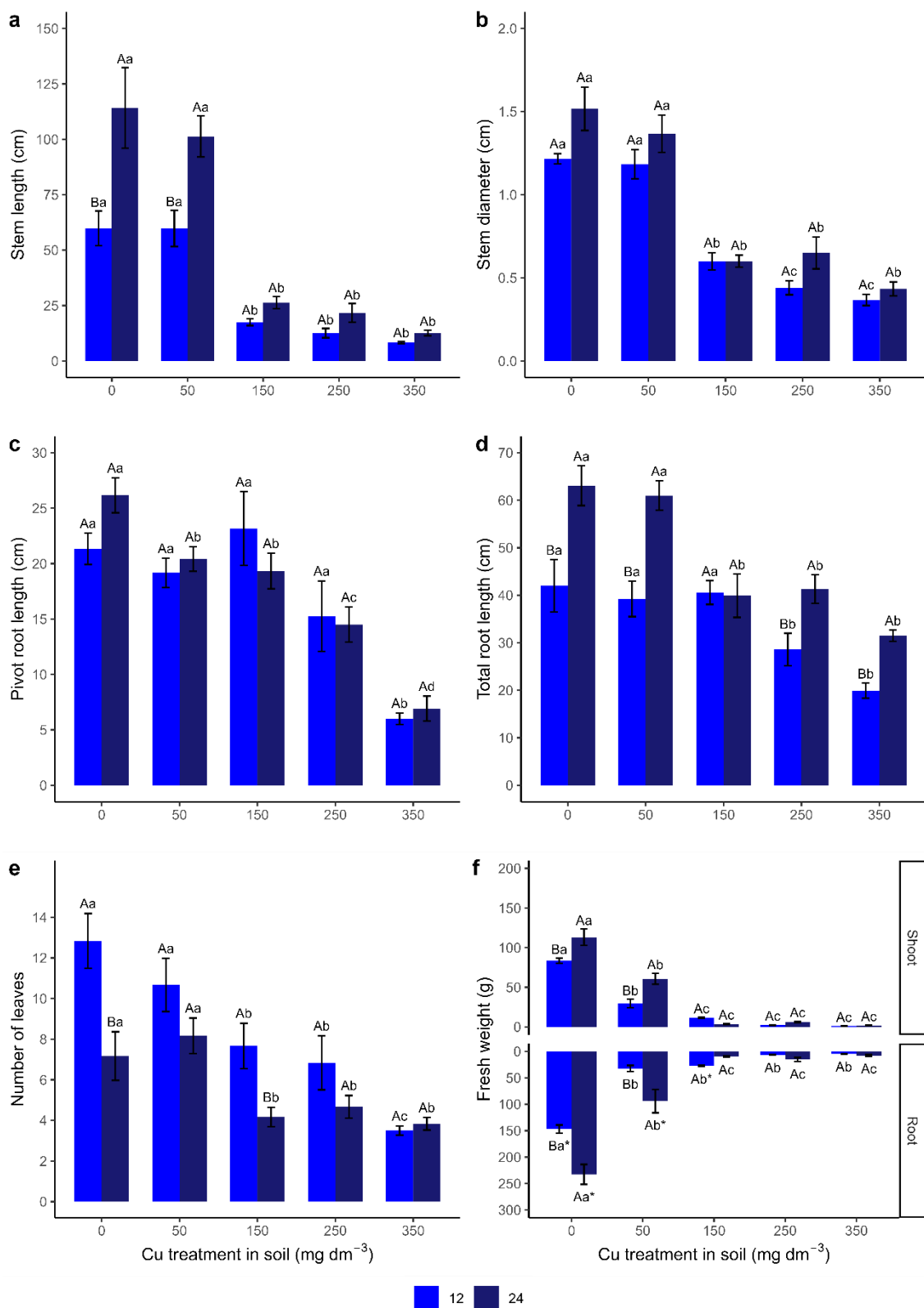


Fig.4: Growth parameters of *L. leucocephala*, subjected to Cu treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) stem length (cm); b) stem diameter (cm); c) pivot root length (cm); d) total root length (cm); e) number of leaves; f) fresh weight partitioning between the shoot and the root (g). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between 12 and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison

between treatments of the same cultivation time. *: indicates that the respective organ has the largest partition difference.

3.1.3 Biomassa e acúmulo de cobre

A seguir constam os resultados de biomassa (peso seco) e acúmulo de Cu por órgão e pela planta toda (total). Os resultados de biomassa em T0 foram muito altos em relação aos demais tratamentos e a fim de esmiuçar os dados de acúmulo de Cu entre T50 e T350, foi retirado o T0 das análises, caso o contrário, o acúmulo de Cu entre T50 e T350 seria agrupado em um único grupo menor que T0. Para a análise da anova de duas vias (a) das variáveis acúmulo e porcentagem de acúmulo de cobre, o T0 foi excluído dos tratamentos, a fim de esmiuçar os agrupamentos entre T50 e T350, visto que, com T0, altíssimo, os demais tratamentos ficavam semelhantes, formando dois agrupamentos apenas: T0: agrupamento “a” e T50 a T350: agrupamento “b”.

A biomassa de folha (LDW) (Fig.5a), em ambos os tempos de cultivo, foi muito alta no T0, com redução nos demais tratamentos, especialmente a partir de T150. Não houve diferença significativa na interação tempo de cultivo para LDW. O acúmulo de Cu na folha (LAC) (Fig.5b) foi maior em T150 que nos demais tratamentos, aos 12 meses. Já aos 24 meses de cultivo, o LAC foi maior em T50. Em T50 houve aumento no acúmulo de Cu em 241,64% e em T150 apresentou menos 7,90% de acúmulo aos 24 meses. Não houve diferença significativa na interação tempo de cultivo nos demais tratamentos. Para conhecimento, o acúmulo de Cu na folha em T0 foi de 49,13 e 2709,88 $\mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$ aos 12 e 24 meses, respectivamente.

A biomassa do caule (StDW) (Fig.5c), em ambos os tempos de cultivo, foi muito alta no T0, com redução nos demais tratamentos, especialmente a partir de T150. Aos 24 meses, o StDW de T0 e T50, aumentou 120,96 e 215,94% comparado com 12 meses de cultivo. O acúmulo de Cu no caule (StAC) (Fig.5d) foi maior em T150 que nos demais tratamentos, aos 12 meses. Já aos 24 meses de cultivo, o StAC foi maior em T150 e T250. Em T150 e T250 apresentaram menos 71,90 e mais 241,64% de acúmulo aos 24 comparado com 12 meses de cultivo. Para conhecimento, o acúmulo de Cu no caule em T0 foi de 119,17 e 144,14 $\mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$ aos 12 e 24 meses, respectivamente.

A biomassa da raiz (RDW) (Fig.5e), em ambos os tempos de cultivo, foi muito alta no T0, com redução nos demais tratamentos, especialmente a partir de T150. Aos 24 meses, o RDW de T0 e T50, aumentou 140,13 e 431,36% comparado com 12 meses de cultivo. O acúmulo de Cu na raiz (RAC) (Fig.5f) foi maior em T150 que nos demais

tratamentos, aos 12 meses. Já aos 24 meses de cultivo, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Em T50, T250 e T350 o acúmulo de Cu aumentou em 339,30, 603,09 e 436,30% aos 24 meses em relação aos 12 meses de cultivo, em T150 não diferiu entre 12 e 24 meses. Para conhecimento, o acúmulo de Cu na raiz em T0 foi de 200,61 e 322,25 $\mu\text{g } \text{órgão}^{-1}$ aos 12 e 24 meses, respectivamente.

A biomassa total da planta (TDW) (Fig.5g), em ambos os tempos de cultivo, foi muito alta no T0, com redução nos demais tratamentos. Aos 24 meses, o TDW de T0 e T50, aumentou 147,69 e 358,49% comparado com 12 meses de cultivo. O acúmulo de Cu por toda planta (TAC) (Fig.5h) foi maior em T150, T350, seguido de T250 e T50 aos 12 meses. Aos 24 meses de cultivo, o maior TAC ocorreu em T350, seguido de T150, T250 e T0. Em T150, T250 e T350, houve 148,90; 182,19; e 169,92% mais acúmulo em 24 que em 12 meses de cultivo. Para conhecimento, o acúmulo de Cu por toda planta em T0 foi de 4,16 e 23,42 $\mu\text{g planta}^{-1}$ aos 12 e 24 meses, respectivamente.

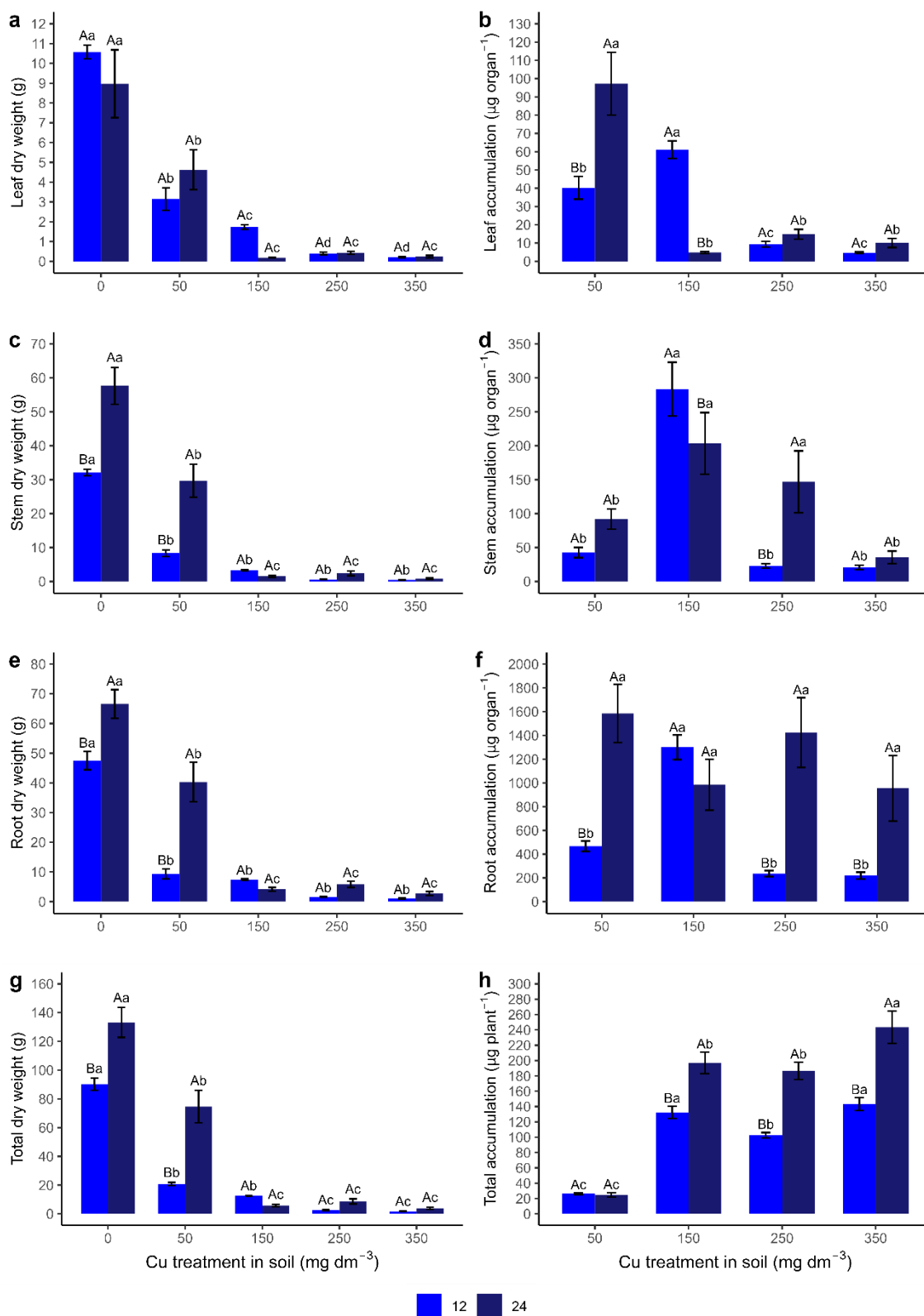


Fig.5: Dry weight and accumulation of *L. leucocephala*, subjected to Cu treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) leaves dry weight (g); b) Cu accumulation in the leaf (μg organ⁻¹); c) stem dry weight (g); d) Cu accumulation in the stem (μg organ⁻¹); e) root dry weight (g); f) Cu accumulation in the root (μg organ⁻¹); g) total plant dry weight (g); h) total Cu accumulation (μg plant⁻¹). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison

between 12 and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison between treatments of the same cultivation time.

3.1.4 Índices de fitorremediação e disponibilidade de cobre no solo

A biomassa seca da parte aérea (SDW) e da raiz (RDW) foram apresentados no gráfico de partição de peso seco entre parte aérea e raiz (Fig.6a). Tanto aos 12 quanto aos 24 meses de cultivo houve alta produção de SDW e RDW em T0 e a partir de T50 houve baixa produção de peso seco. Aos 24 meses, em T0 e T50, houve aumento de 156,10 e 299,17% de SDW, e 140,13 e 431,36% de RDW, respectivamente, em relação aos 12 meses de cultivo. O RFW de T0 foi 111,28% maior que SFW aos 12 meses. Já aos 24 meses, não houve diferença significativa na interação órgão (parte aérea e raiz).

A porcentagem de acúmulo na parte aérea (SAP%) e na raiz (RAP%) foram apresentados no gráfico de partição de acúmulo (%) entre parte aérea e raiz (Fig.6b). Tanto aos 12 quanto aos 24 meses de cultivo houve maior SAP% em T150, com menor porcentagem de acúmulo nos demais tratamentos. Aos 12 meses, houve maior RAP% nos tratamentos T50, T250 e T350. Aos 24 meses, em T350 e T150 houve maior e menor RAP%. Não houve diferença significativa na interação órgão (parte aérea e raiz) em ambos os tempos de cultivo. Para conhecimento, o SAP% em T0 foi de 44,59 e 89,04% aos 12 e 24 meses, respectivamente. RAP% em T0 foi de 55,41 e 10,96% aos 12 e 24 meses, respectivamente.

O índice de tolerância (TI) (Fig.6c) em T0 é igual a 1,0 em ambos os tempos de cultivo. Aos 12 meses, as plantas apresentaram TI menor que 0,5 entre T50 a T350. Aos 24 meses, as plantas apresentaram TI igual a 0,5 em T50 e menor que 0,5 a partir de T150. O índice de translocação de Cu para a parte aérea (ITR) (Fig.6d) foi maior no T0, em ambos os tempos de cultivo. Embora nenhum tratamento tenha apresentado ITR igual ou maior que 1,0, apenas o T0, aos 24 meses de cultivo, foi de 0,89. O Fator de transferência (TF) de Cu, do solo para a planta (Fig.6e) foi comparado apenas nos tratamentos com adição de Cu (T50 a T350). O TF de T50 e T150 foram maiores que os demais tratamentos, aos 12 meses de cultivo. Já aos 24 meses, apenas T50 apresentou maior TF. Nenhum tratamento, de ambos os tempos de cultivo, apresentou TF maior que 1%.

A concentração de Cu biodisponível no solo, aos 12 e 24 meses, foi representado no gráfico de partição entre antes e depois do cultivo de *L. leucocephala* (fator cultivo) (Fig.6f), para avaliar o efeito da espécie sobre a absorção e acúmulo de Cu do solo. A concentração de Cu no solo, antes do cultivo da espécie (CBC), aumentou à medida que aumentou a adição de Cu no solo (T50 a T350), aos 12 e aos 24 meses de cultivo. A

biodisponibilidade de Cu no solo aumentou ao longo do tempo em T150, T250 e T350: o CBC de 24 foi 153,65; 123,88 e 151,55% maior que aos 12 meses de cultivo. A concentração de Cu no solo, depois do cultivo da espécie (CAC), aumentou à medida que aumentaram os tratamentos de Cu (T50 a T350), aos 12 e aos 24 meses de cultivo. Não houve diferença na biodisponibilidade de Cu entre 12 e 24 meses para CAC. Comparando o antes e depois, aos 12 meses, o CAC em T350, foi 130,41% maior que o CBC. Aos 24 meses, o CAC, em T150; T250 e T350, foi 83,87; 79,08 e 80,90% menor, respectivamente, que o CBC (mais informações estão descritas nos apêndices D e E).

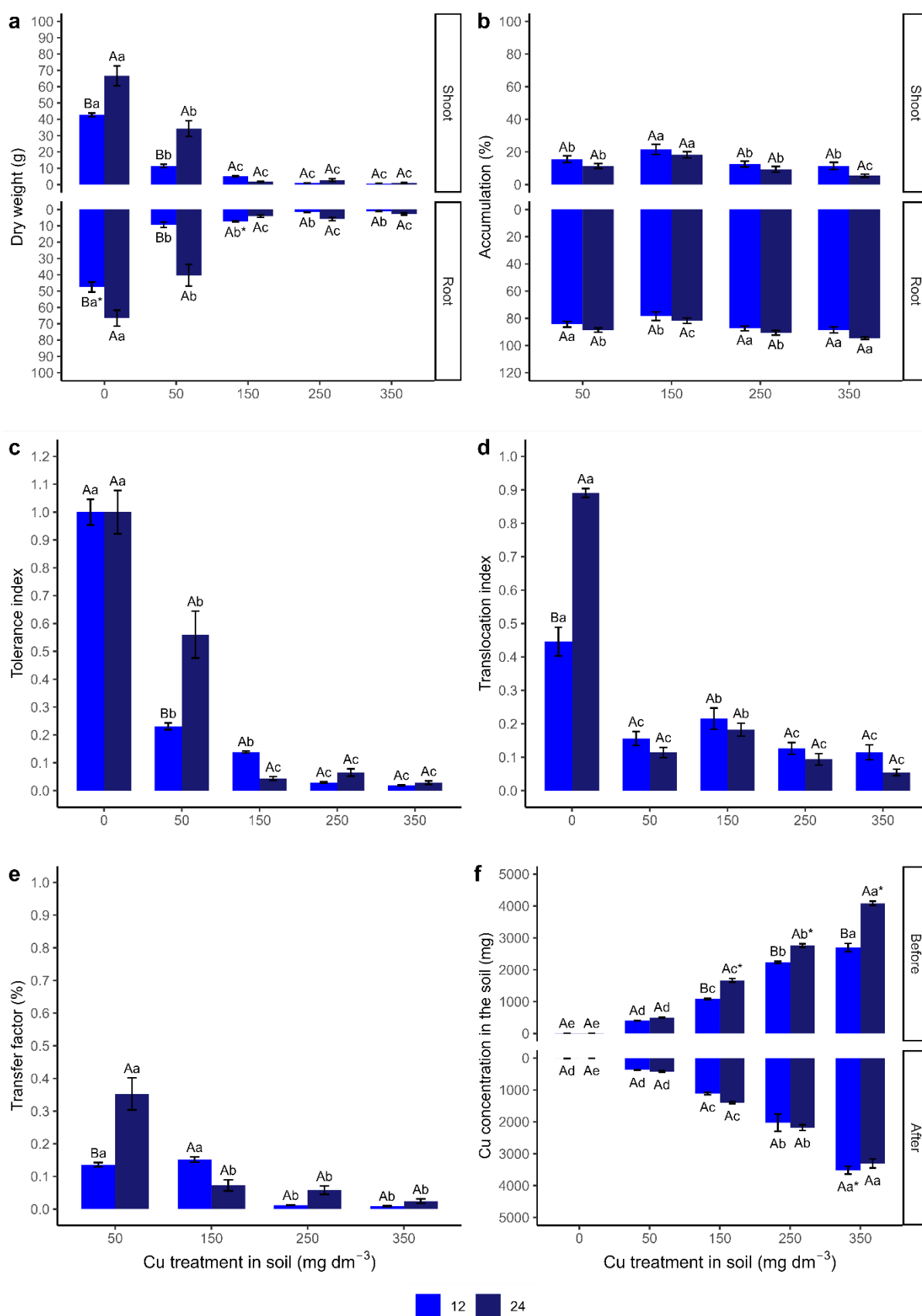


Fig.6: Copper availability in the soil and phytoremediation indexes of *L. leucocephala*, subjected to Cu treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) partitioning of dry weight between the shoot and the root (g); b) percentage of Cu accumulation between the root (RAP) and shoot (SAP) organs (%); c) tolerance index; d) translocation index; e) transfer factor (%); f) Cu concentration available (mg) in 10

dm³ of soil before and after *L. leucocephala* cultivation, respectively. Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between 12 and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison between treatments of the same cultivation time. *: indicates that the respective organ/cultivation has the largest partition difference.

3.1.5 Análises multivariadas

A matriz de correlação (Pearson e rede) (Fig. 7a b c d) permitiu identificar associações e relações entre as variáveis: trocas gasosas; crescimento; biomassa; acúmulo; tolerância; índice de translocação; porcentagem de acúmulo e os tratamentos de Cu em cada tempo de cultivo (12 e 24), separadamente. Em *L. leucocephala* cultivada sob os tratamentos de Cu, aos 12 meses (Fig. 7a, c), as relações observadas entre A, E, gs, WUE e CUE; gs e TAC; LDW, StDW, RDW e TDW; TI, LDW, StDW e TDW; RAC, LAC e StAC; SAP%, LDW, StDW, RDW TDW, TI e ITR: são correlações positivas (moderadas e fortes). As relações entre TAC, RDW, LDW, StDW e TDW; TAC e TI; TAC e SAP%; TAC e ITR; TI e RAP%; SAP% e RAP%; RAP%, RDW, LDW, StDW e TDW; RAP% e ITR: são correlações negativas (moderadas e fortes).

As relações positivas (moderadas e fortes) entre as variáveis observadas aos 24 meses foram: A, E, gs, WUE, CUE, LDW, StDW, RDW, TDW, LAC, TI, SAP% e ITR; LAC e TI; LAC e SAP%; LAC e ITR; RAC e RAP%; TAC e RAP%; TI e SAP%; TI e ITR. Entre as variáveis RAC e LAC; RAC e TI; RAC e SAP%; RAC e ITR; RAC, RAP%, LDW, StDW, RDW e TDW; StAC, A, WUE e CUE; TAC e LAC; TAC e TI; TAC, LDW, StDW, RDW, TDW, A, E, gs, WUE e CUE; RAP% e TI; RAP% e LAC; RAP%, gs e E; RAP% e ITR; ITR e TAC: foram observadas relações negativas (moderadas e fortes).

A análise de componentes principais (72,6%) das variáveis de crescimento; biomassa; acúmulo; índice de tolerância e translocação foi realizada com o intuito de agrupar essas variáveis, segundo o comportamento da variação de suas características, em um determinado conjunto de dados: 12 ou 24 meses de cultivo (Fig. 7e). De acordo com os resultados, as inter-relações, dentre todas as variáveis, para 12 meses são compostas por: StAC, LAC, RDW, StDW; LDW, TI, TF, ITR, TRL, SL, SD e NL, já o agrupamento de 24 meses engloba o RAC e todas essas anteriormente mencionadas.

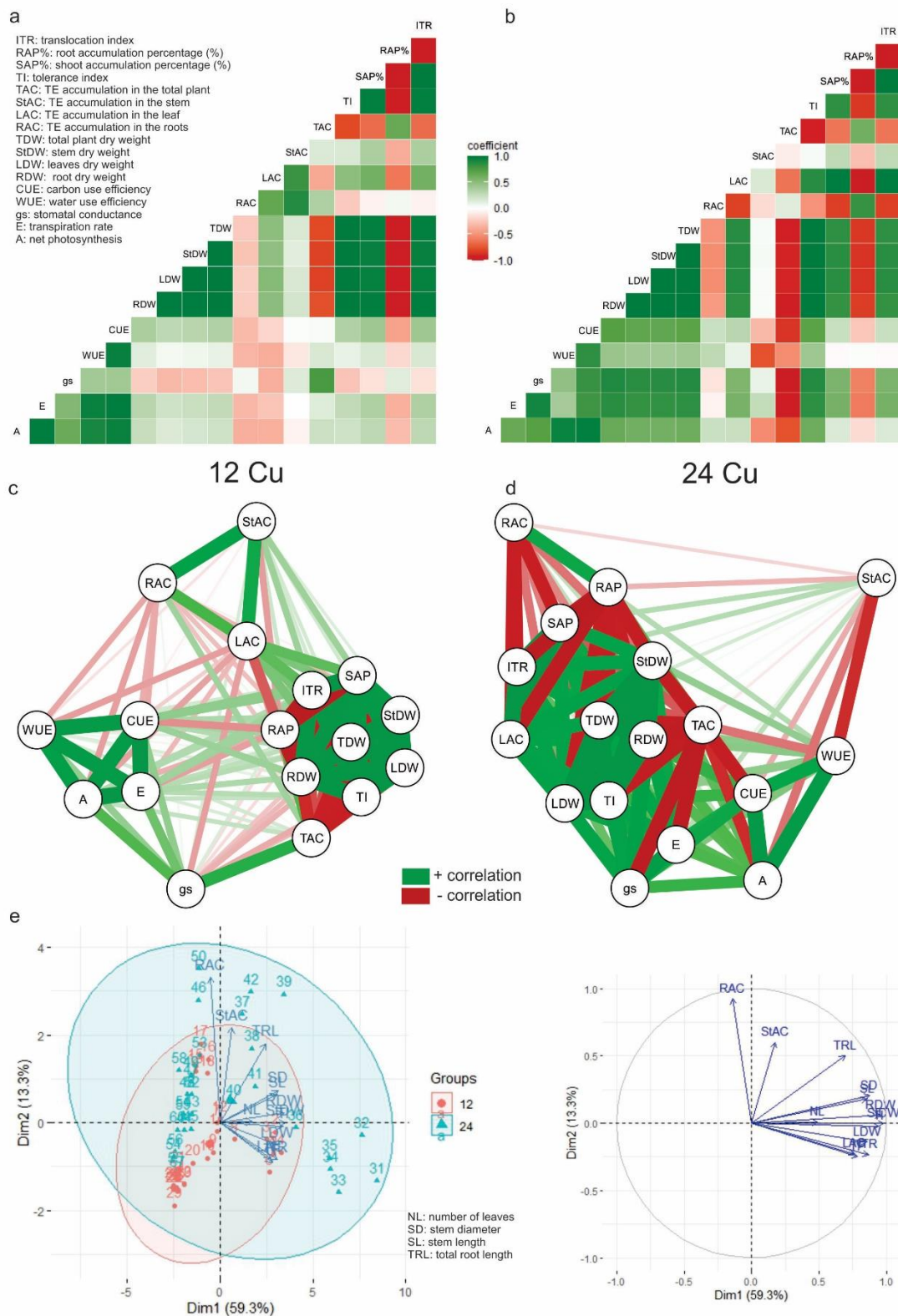


Fig.7: Multivariate analysis: correlation and principal component analysis (PCA) of *L. leucocephala*, subjected to Cu treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. Correlation analysis was performed with the variables gas exchange, biomass, accumulation, tolerance and translocation index, and percentage of accumulation: (a) and (b): Pearson correlation (r); (c) and (d) network correlation. Left and right side are the correlations of *Leucaena leucocephala* at 12 and 24 months of cultivation, respectively;

(e) principal component analysis - PCA (PCA-biplot and PCA-variables). Pearson correlation (r): coefficient = 1, indicates a positive correlation between the variables; coefficient = -1, indicates negative correlation; coefficient = ± 0.5 , indicates a moderate correlation; coefficient = 0, indicates that the variables do not depend linearly on each other. Network correlation: each variable is a node and each correlation is a connecting edge/line. Closer, correlated relationships have a thicker edge/connection, and the more intense the color, the stronger the relationship between them ($R \geq 0.7$ and the significance level is $p < 0.05$). In both correlations: intense green indicates a strong positive correlation (as the value of one variable increases, so does the value of the other variable); Deep red means a strong negative correlation (as the value of one variable increases, the value of the other decreases). The principal component analysis Biplot was performed with the growth variables; biomass; index of tolerance and percentage of accumulation. The acronyms of the variables analyzed were: A: photosynthetic rate; E: transpiration rate; gs: stomatal conductance; WUE: water use efficiency; CUE: carbon use efficiency; RDW: root dry weight; LDW: dry weight of leaves; StDW: stem dry weight; TDW: total biomass; RAC: root accumulation; LAC: accumulation in leaves; StAC: stem accumulation; TAC: accumulation in total biomass; TI: tolerance index; ITR: translocation index; SAP%: shoot accumulation percentage; RAP%: root accumulation percentage; NL: number of leaves; SL: stem length; SD: stem diameter; TRL: total root length. Number of observations: 60.

3.2 Ferro

3.2.1 Trocas gasosas

A taxa fotossintética (A) (Fig. 8a) foi mais alta entre T50 a T350, aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses, o A foi mais alto entre T50 a T250 que nos demais tratamentos. Em comparação ao tempo de cultivo, aos 24 meses o T0, T150 e T250 apresentaram aumento de 150,20; 130,63 e 148,52%, respectivamente, de A em relação aos 12 meses de cultivo.

A transpiração (E) (Fig. 8b) não diferiu entre os tratamentos de Fe aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses, T0 e T150 apresentaram maior E que os demais tratamentos. Em T0, T150 e T250 houve diferença quanto ao tempo: aos 24 meses o E foi 160,15; 152,78 e 129,27% maior que aos 12 meses de cultivo.

A condutância estomática (gs) (Fig. 8c), aos 12 meses, foi maior em T50, T150 e T350 que nos demais tratamentos. Aos 24 meses de cultivo, gs foi maior em T150, com menor gs nos demais tratamentos, especialmente em T350. Quanto à interação tempo, aos 24 meses, T0, T50, T150 e T250 apresentaram gs 197,17; 138,42; 199,64 e 171,31% maior que aos 12 meses de cultivo.

A eficiência do uso da água (WUE) (Fig. 8d) foi maior entre T50 a T350 que T0, aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses a WUE não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Não houve interação significativa entre 12 e 24 meses de cultivo para WUE. A eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) (Fig. 8e), aos 12 meses, foi maior em T0 e T250 que os demais tratamentos. Aos 24 meses de cultivo, o EIUA foi maior em T0 e T350. Aos 24 meses, em T0, T50, T150 e T250, o EIUA diminuiu 79,87; 81,06; 76,28 e 73,98% comparado com o EIUA de 12 meses.

O carbono interno (Ci) e a razão entre carbono interno e externo (CiCa) (Fig. 8f g) não diferiram entre os tratamentos de Fe aos 12 e 24 meses de cultivo, tampouco houve interação entre o tempo. Aos 12 meses, não houve diferença significativa entre os tratamentos de Fe para eficiência do uso de carbono (CUE) (Fig. 8h). Aos 24 meses, os tratamentos T0, T150 e T250 apresentaram maior CUE que os demais. Em comparação ao tempo de cultivo, aos 24 meses a eficiência do uso do carbono em T0, T150 e T250 foi 156,60; 158,15 e 131,14% maior que aos 12 meses.

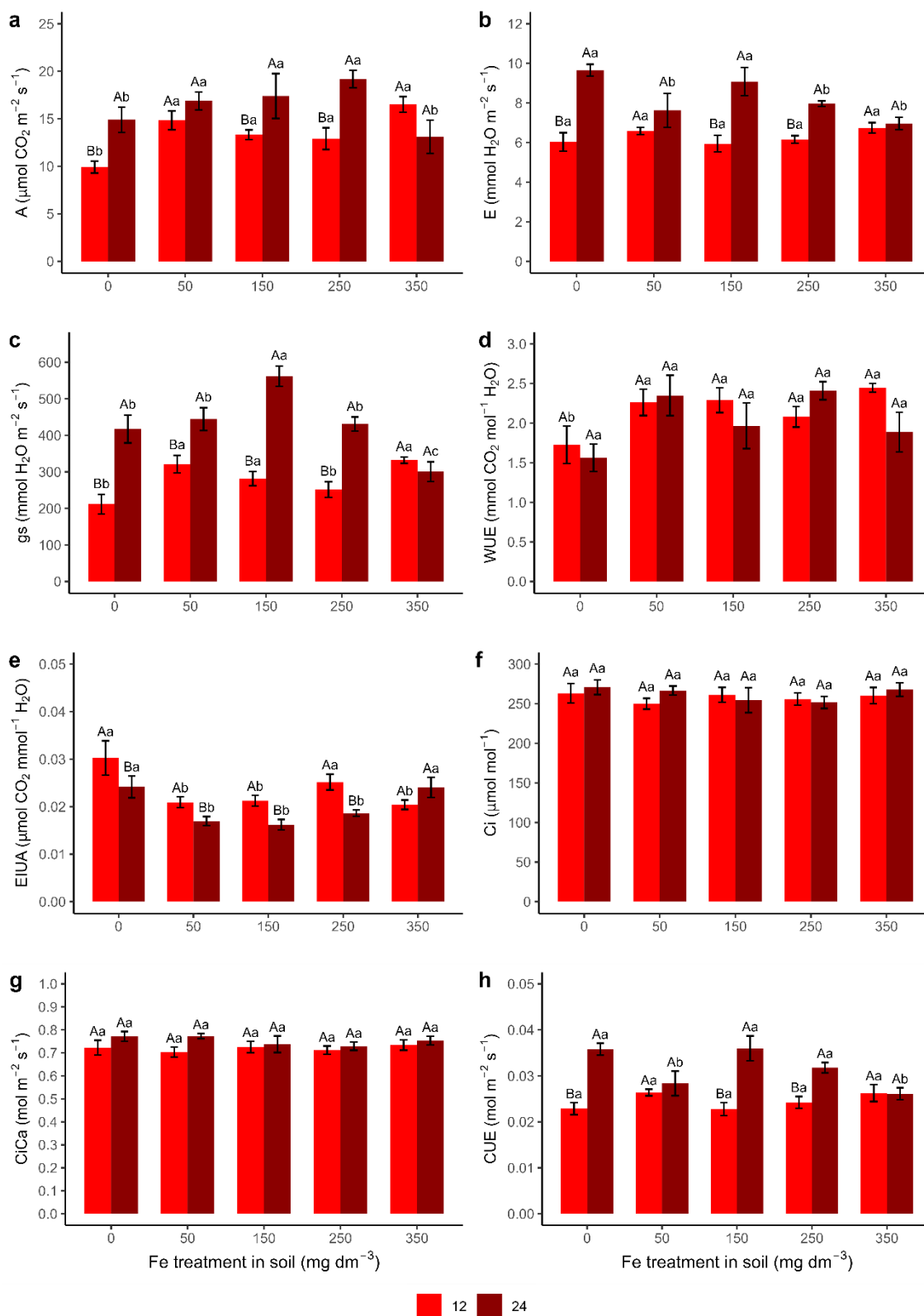


Fig.8: Gas exchange parameters of *L. leucocephala*, subjected to Fe treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) net photosynthesis (A); b) transpiration rate (E); c) stomatal conductance (gs); d) water use efficiency (WUE); e) intrinsic water use efficiency (EIUA); f) carbon use efficiency (CUE); g) internal carbon concentration (Ci) and h) internal and external CO_2 ratio (CiCa). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between 12 and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison between treatments of the same cultivation time.

3.2.2 Parâmetros de crescimento

Uma visão geral do crescimento das plântulas e plantas submetidas ao Fe pode ser observado na Fig.9. O comprimento do caule (SL) (Fig.10a) foi maior em T50 e T150, seguido de redução nos demais tratamentos, especialmente em T250 e T350, aos 12 meses de cultivo (Fig.9g). Aos 24 meses o SL foi maior em T50 e T150, seguido de redução nos demais tratamentos, especialmente em T350 (Fig.9h). Não houve diferença significativa na interação tempo de cultivo para SL. O diâmetro do caule (SD) (Fig.10b) foi maior em T50 e T150, seguido de redução nos demais tratamentos, aos 12 meses de cultivo. Aos 24 meses, o SD foi menor em T350 que os demais tratamentos. Não houve diferença significativa na interação tempo de cultivo para SD.

O comprimento da raiz pivotante (PRL) e o comprimento total da raiz (TRL) (Fig.10c d), não diferiram entre os tratamentos de Fe aos 12 e 24 meses de cultivo, tampouco houve interação entre o tempo de cultivo. O número de folhas (NL) (Fig.10e) foi maior em T50 com redução nos demais tratamentos, aos 12 meses. Aos 24 meses, T50 apresentaram maior número de folhas com redução nos demais tratamentos. Aos 24 meses, T250 apresentou maior NL que os demais tratamentos. Em T50 e T250, aos 24 meses, o NL diminuiu 37,66% e aumentou 143,28%, respectivamente, em relação aos 12 meses de cultivo. Não foram observados sintomas visuais de fitotoxicidade nas folhas/folículos em ambos os tempos de cultivo (Fig.14 apêndice E).

O peso fresco da parte aérea (SFW) e da raiz (RFW) foram apresentados no gráfico de partição de peso fresco entre parte aérea e raiz (Fig.10f). O SFW, aos 12 meses, foi maior entre T0 e T150 com redução nos demais tratamentos. Aos 24 meses, em T0, o SFW diminuiu 62,02% em relação aos 12 meses. Nos demais tratamentos não houve interação com tempo de cultivo para SFW.

O RFW, aos 12 meses, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos de Fe. Já aos 24 meses, o RFW foi maior em T50 e T150 com menor biomassa nos demais tratamentos, especialmente em T350. Em T50 e T150, aos 24 meses, houve aumento de 171,07 e 151,16% de RFW comparado com 12 meses. Comparando o peso fresco da parte aérea com a raiz, não houve interação significativa entre os órgãos aos 12 meses. Aos 24 meses, o RFW entre T0 a T250 foi 199,92; 215,80; 156,19 e 182,55% maior que SFW, respectivamente (representada no gráfico por “**”).

Leucaena leucocephala perde as folhas basais, à medida que folhas jovens surgem, por isso a heterogeneidade no número de folhas (erro padrão). Aos 9 meses de cultivo,

uma única planta/unidade experimental do tratamento de Fe: T150 apresentou três inflorescências, mas elas foram cortadas com tesoura de poda para evitar o estágio reprodutivo.

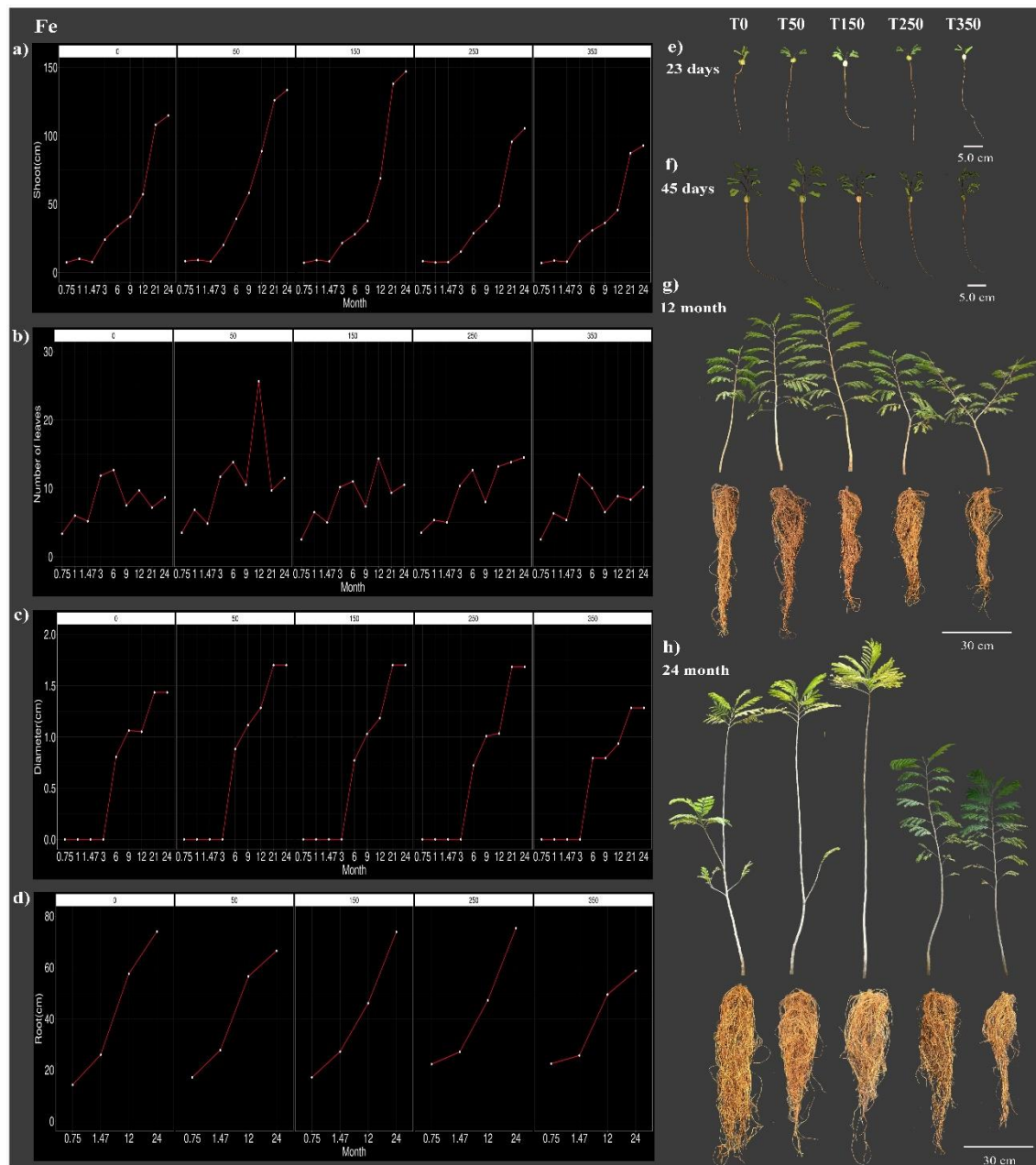


Fig.9: Shoot and root system of *L. leucocephala*, subjected to Fe treatments in the soil throughout 24 months of cultivation: 0,75; 1; 1,47; 3; 6; 9; 12; 21 and 24 months of cultivation. The treatments added, in addition to the control, were: 50; 150; 250 and 350 mg dm⁻³ of soil in a greenhouse. The left side shows graphs showing the means of variables over time: a) shoot length (cm); b) number of leaves; c) stem diameter (cm); d) root length* (cm). Number of observations: 30. Right side presents photos of *L. leucocephala* collected and separated into shoots and roots at: e) 23 days; f) 45 days; g) 12 months and h) 24 months. 23 and 45 days were considered 0,75 and 1,47 months, respectively. *: it was possible to measure root length only at 0,75; 1,47; 12 and 24 months.

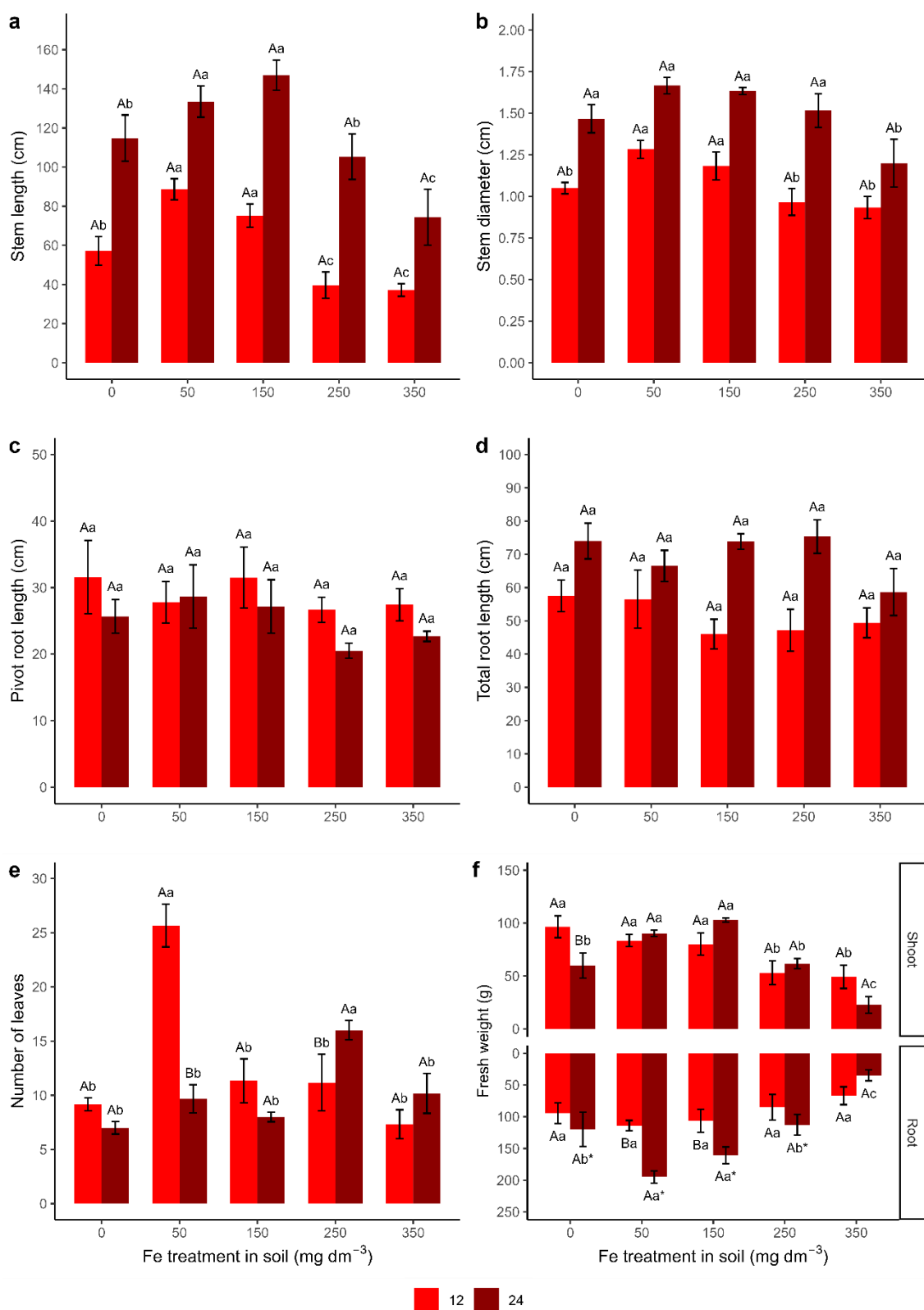


Fig.10: Growth parameters of *L. leucocephala*, subjected to Fe treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) stem length (cm); b) stem diameter (cm); c) pivot root length (cm); d) total root length (cm); e) number of leaves; f) fresh weight partitioning between the shoot and the root (g). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between 12 and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison between treatments of the same cultivation time. *: indicates that the respective organ has the largest partition difference.

3.2.3 Biomassa e acúmulo de ferro

A seguir estão apresentados os resultados de biomassa (peso seco) e acúmulo de Fe por órgão e pela planta toda (total). Não houve diferença na biomassa de T0 em relação aos demais tratamentos, sendo assim, nesta sessão de acúmulo de Ferro será considerado os resultados de T0 na análise estatística.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, de ambos os tempos de cultivo, para biomassa de folha (LDW) (Fig.11a) e acúmulo de Fe na folha (Fig.11b), e também não houve diferenças na interação tempo de cultivo.

A biomassa do caule (StDW) (Fig.11c), aos 12 meses, foi maior entre T0 a T150, com redução nos demais tratamentos. Aos 24 meses, T50 e T150 apresentaram maior StDW que os demais tratamentos, especialmente em T250 e T350. Comparando 24 com 12 meses, o StDW de T50, T150 e T250, aumentou 185,84; 224,36; 174,00%, respectivamente, em relação aos 12 meses de cultivo. O acúmulo de ferro no caule (StAC) (Fig.11d), aos 12 meses, foi maior entre T0 a T150, nos demais tratamentos o acúmulo foi menor. Aos 24 meses, o StAC foi maior entre T0 a T150, nos demais tratamentos o acúmulo foi menor, especialmente em T350. Aos 24 meses as plantas dos tratamentos entre T0 a T250 acumulou mais Fe que aos 12 meses de cultivo. Esse acúmulo foi 168,02; 220,26; 206,83 e 252,59% maior, em T350 não houve diferença de acúmulo ao longo do tempo.

A biomassa da raiz (RDW) (Fig.11e), aos 12 e 24 meses, foi maior entre T0 a T250, com redução em T350. Não houve diferença de RDW ao longo do tempo. Aos 12 meses não houve diferença de acúmulo de ferro na raiz (RAC) (Fig.11f) entre os tratamentos. Já aos 24 meses, houve maior acúmulo em T0 e T50, com menor acúmulo nos demais tratamentos, especialmente em T250 e T350. Aos 24 meses as plantas dos tratamentos entre T0 a T150 acumulou mais Fe que aos 12 meses de cultivo. Esse acúmulo foi 281,81; 291,67 e 259,71% maior, para os demais tratamentos não houve diferença de acúmulo ao longo do tempo.

A biomassa total da planta (TDW) (Fig.11g), não diferiu entre os tratamentos de Fe, aos 12 meses. Aos 24 meses, o TDW de T50 e T150 foi maior, e nos demais tratamentos o TDW foi menor, especialmente em T350. Em T50 e T150 o TDW aumentou $\approx 164,92\%$ em relação a 12 meses de cultivo. O acúmulo de Fe por toda planta (TAC) (Fig.11h), aos 12 meses, não diferiu entre os tratamentos. Aos 24 meses o TAC foi maior em T0, com menor acúmulo nos demais tratamentos, especialmente entre T150

a T350. Ao longo do tempo o TAC de T0 e T50 aumentou 234,10 e 177,78% em relação a 12 meses de cultivo.

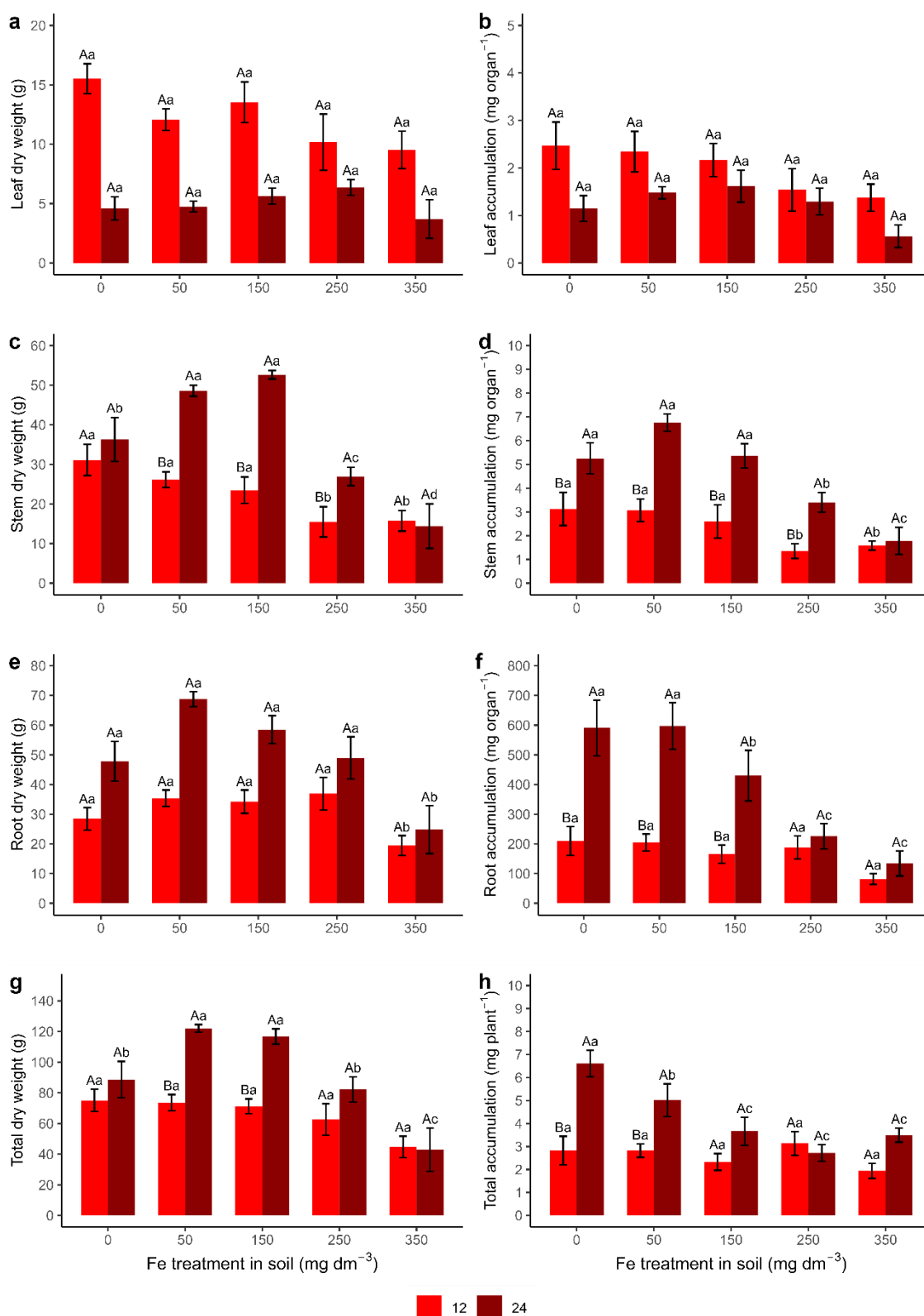


Fig.11: Dry weight and accumulation of *L. leucocephala*, subjected to Fe treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) leaves dry weight (g); b) Cu accumulation in the leaf (mg organ⁻¹); c) stem dry weight (g); d) Cu accumulation in the stem (mg organ⁻¹); e) root dry weight (g); f) Cu accumulation in the root (mg organ⁻¹); g) total plant dry weight (g); h) total Cu accumulation (mg plant⁻¹). Number of

observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between 12 and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison between treatments of the same cultivation time.

3.2.4 Índices de fitorremediação e disponibilidade de ferro no solo

A biomassa seca da parte aérea (SDW) e da raiz (RDW) foram apresentados no gráfico de partição de peso seco entre parte aérea e raiz (Fig.12a). Aos 12 meses, entre T0 e T150, houve maior SDW que nos demais tratamentos. Aos 24 meses, o SDW foi maior em T50 e T150, com menor SDW nos demais tratamentos, especialmente em T350. Aos 24 meses, houve $\approx 148,52\%$ de aumento de SDW nos tratamentos T50 e T150. O RDW de T350 foi menor que os demais tratamentos em ambos os tempos de cultivo, e não houve diferença significativa na interação de tempo de cultivo para RDW. Na interação parte aérea e raiz houve interação em T0, onde o RDW foi 61,06% menor que SDW, aos 12 meses; e no T250, aos 24 meses, onde o RDW foi 146,97% maior que o SDW. Nos demais tratamentos não houveram diferenças na interação parte aérea e raiz.

A porcentagem de acúmulo na parte aérea (SAP%) e na raiz (RAP%) foram apresentados no gráfico de partição de acúmulo (%) entre parte aérea e raiz (Fig.12b). Tanto aos 12 quanto aos 24 meses de cultivo não houveram diferenças de SAP% e RAP% entre os tratamentos, tampouco houve diferença na interação tempo de cultivo. Não houve diferença significativa de acúmulo (%) na interação entre os órgãos parte aérea e raiz.

O índice de tolerância (TI) (Fig.12c) em T0 é igual a 1,0 em ambos os tempos de cultivo. Embora o T350 tenha apresentado o menor valor de TI, as plantas apresentaram TI maior que 0,5 em todos os tratamentos, aos 12 meses. Já aos 24 meses, o TI foi maior que 1,0 nos tratamentos T50 e T150, entretanto, houve TI menor que 0,5 em T350. Na interação tempo de cultivo, o TI de T50 e T150 foi $\approx 139,61\%$ maior que o TI aos 12 meses de cultivo.

O índice de translocação de Fe para a parte aérea (ITR) (Fig.12d) foi baixo, não chegou a 0,1 em todos os tratamentos para ambos os tempos de cultivo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, de ambos os tempos, tampouco houve interação ao longo do tempo.

A concentração de Fe disponível no solo, aos 12 e 24 meses, foi representada no gráfico de partição entre antes e depois do cultivo de *L. leucocephala* (Fig.12e), para avaliar o efeito da espécie sobre a concentração de Fe no solo. A concentração de Fe no solo, antes do cultivo da espécie (CBC), aumentou à medida que aumentou a adição de Fe no solo (T50 a T350), aos 12 e aos 24 meses de cultivo. Não houve interação entre 12

e 24 meses para o CBC. A concentração de Fe no solo, depois do cultivo da espécie (CAC), aumentou à medida que aumentavam os tratamentos de Fe, especialmente entre T150 a T350, aos 12 e aos 24 meses de cultivo. Quanto à interação entre 12 e 24 meses, o CAC dos tratamentos T0 e T50 aumentou 186,13 e 175,07% ao longo do tempo, nos demais tratamentos não houve interação entre 12 e 24.

Comparando antes e depois do cultivo de *L. leucocephala*, observa-se que a disponibilidade de Fe no solo foi maior depois do cultivo (CAC) que antes (CBC), tanto aos 12 quanto aos 24 meses (Fig.12e). Aos 12 meses, em T0, T50, T150 e T250, o CAC foi 276,06; 236,30; 276,62 e 141,56% maior que o CBC, respectivamente, em T350 não houve diferença entre CAC e CBC. Aos 24 meses, de T0 a T350, o CAC foi 513,83; 413,70; 269,23; 161,60 e 141,49% maior que o CBC, respectivamente.

Houve diferença de aumento de CBC e CAC do T0 para os demais tratamentos. O CBC de T0 foi 278,58 mg para ambos os tempos de cultivo (Fig.12e). O CAC de T0 foi 769,03 e 1431,41 mg, aos 12 e 24 meses, respectivamente (Fig.12e). Realizou-se um cálculo para saber quanto o CBC e o CAC de cada tratamento (T50 a T350) aumentou ou diminuiu em relação ao controle (T0) para ambos os tempos, e isso foi representado no gráfico de diferença percentual (D_{CBC} e D_{CAC}), separado em antes e depois do cultivo (Fig.12f) a fim de saber se a planta teve algum efeito sobre o Fe no solo. Considerou-se que o D_{CBC} e o D_{CAC} de T0 foram iguais a 100%, em ambos os tempos (12 e 24).

O D_{CBC} , de ambos os tempos, foi maior entre T150 a T350 e não houve interação entre 12 e 24 meses para D_{CBC} . O D_{CAC} , aos 12 meses, foi maior entre T150 a T350. Aos 24 meses, o D_{CAC} não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Quanto à interação antes e depois do cultivo: aos 12 meses, o D_{CAC} de T150, T250 e T350 foi 56,80; 51,28 e 43,49% menor que o D_{CBC} , respectivamente. Aos 24 meses, o D_{CAC} de T150, T250 e T350 foi 29,70; 31,45 e 27,54% menor que o D_{CBC} , respectivamente.

O Fator de transferência (TF) de Fe, do solo para a planta (Fig.12g) nos tratamentos T0 e T50 foram altos, comparados com T150, T250 e T350, nesses tratamentos os TFs foram 27,66; 13,87 e 7,32%, respectivamente, aos 12 meses. Aos 24 meses de cultivo, os TFs de T150, T250 e T350 foram 62,21; 21,09 e 11,26%, respectivamente. Comparando o TF ao longo do tempo, houve aumento de 292,82; 269,52 e 224,96%, em T0, T50 e T150, comparado com o TF de 12 meses, respectivamente.

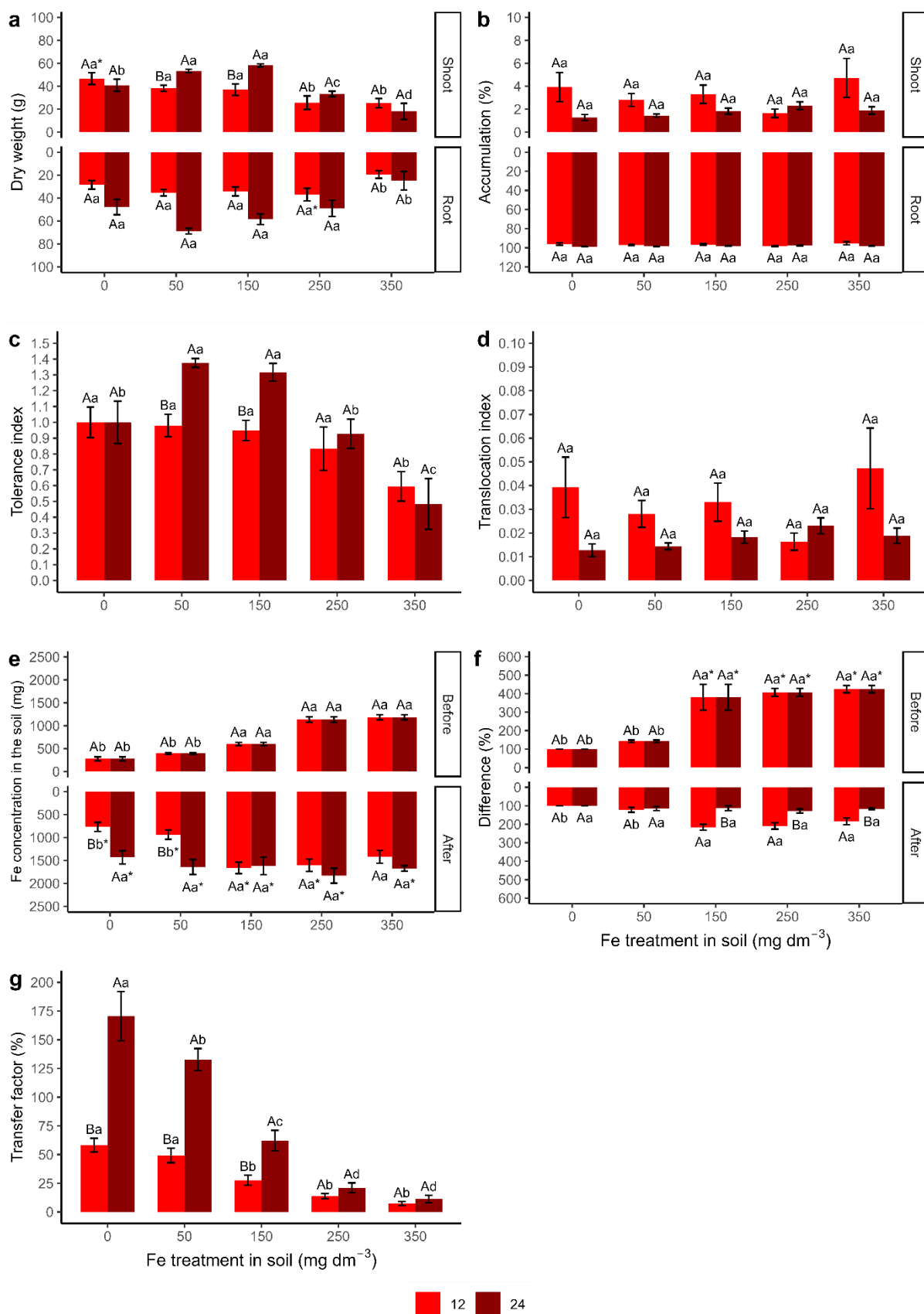


Fig.12: Iron availability in the soil and phytoremediation indexes of *L. leucocephala*, subjected to Fe treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. a) partitioning of dry weight between the shoot and the root (g); b) percentage of Fe accumulation between the root (RAP%) and shoot (SAP%) organs; c) tolerance index; d) translocation index; e) Fe concentration available (mg) in 10 dm³ of soil *L. leucocephala*

cultivation, respectively; f) percentage difference (D%) of iron availability in the soil, before and after plant cultivation; g) transfer factor (%). Number of observations: 60. Mean and standard error were presented, and different letters indicate differences between treatments using the Scott Knott test, in a double factorial design. Capital letters indicate a comparison between 12 and 24 months of cultivation in the same treatment and lowercase letters indicate a comparison between treatments of the same cultivation time. *: indicates that the respective organ/cultivation has the largest partition difference.

3.2.5 Análises multivariadas

A matriz de correlação (Pearson e rede) (Fig. 13a b c d) permitiu identificar associações e relações entre as variáveis: trocas gasosas; crescimento; biomassa; acúmulo; tolerância; índice de translocação; porcentagem de acúmulo e os tratamentos de Fe em cada tempo de cultivo (12 e 24), separadamente. Em *L. leucocephala* cultivada sob os tratamentos de Fe, aos 12 meses (Fig. 13a, c), as relações observadas entre A, E, gs, WUE e CUE; RDW, TDW, RAC, TAC e TI; LDW, StDW, TDW, RAC, LAC, StAC e TI; TDW, RAC, LAC, StAC, TAC e TI; TAC e RAP%; RDW e RAP%; SAP% e ITR: são correlações positivas de coloração verde (moderadas a fortes). As relações entre A, E, gs, WUE, CUE, LDW, StDW, RDW, TDW, RAC, LAC, StAC, TAC e TI; TI, SAP% e ITR; RAC, SAP% e ITR; são relações negativas de coloração vermelha (fracas a moderadas). Já as relações entre LDW e A; RDW e SAP%; RDW e ITR; TAC, SAP% e ITR; SAP% e RAP%; RAP% e ITR são relações negativas fortes. Quanto mais clara é a cor da linha de conexão entre as variáveis, mais distante é a relação entre elas, ou quanto mais fraca a correlação, maior é a distância entre elas.

Aos 24 meses (Fig. 13b, d), observamos uma diferença entre as correlações, onde há uma predominância de correlações positivas entre as variáveis de trocas gasosas, biomassa, acúmulo e índice de tolerância. Algumas poucas relações, mencionadas anteriormente, apresentam correlação negativa fraca como: E e WUE; WUE e CUE; WUE e RAC; WUE e TAC; TAC e A; TAC e LDW. As relações entre RAC e RAP%; TAC e RAP%; SAP% e ITR apresentam correlação positiva forte.

A análise de componentes principais (69,0%) das variáveis de crescimento; biomassa; acúmulo; índice de tolerância e translocação foi realizada com o intuito de agrupar essas variáveis, segundo o comportamento da variação de suas características, em um determinado conjunto de dados: 12 ou 24 meses de cultivo (Fig. 13e). De acordo com os resultados, as inter-relações, dentre todas as variáveis, para 12 meses são compostas por: ITR, LDW, NL e LAC, já o agrupamento de 24 meses engloba o RDW, StDW, RAC, StAC, TI, TF, SD, SL e TRL.

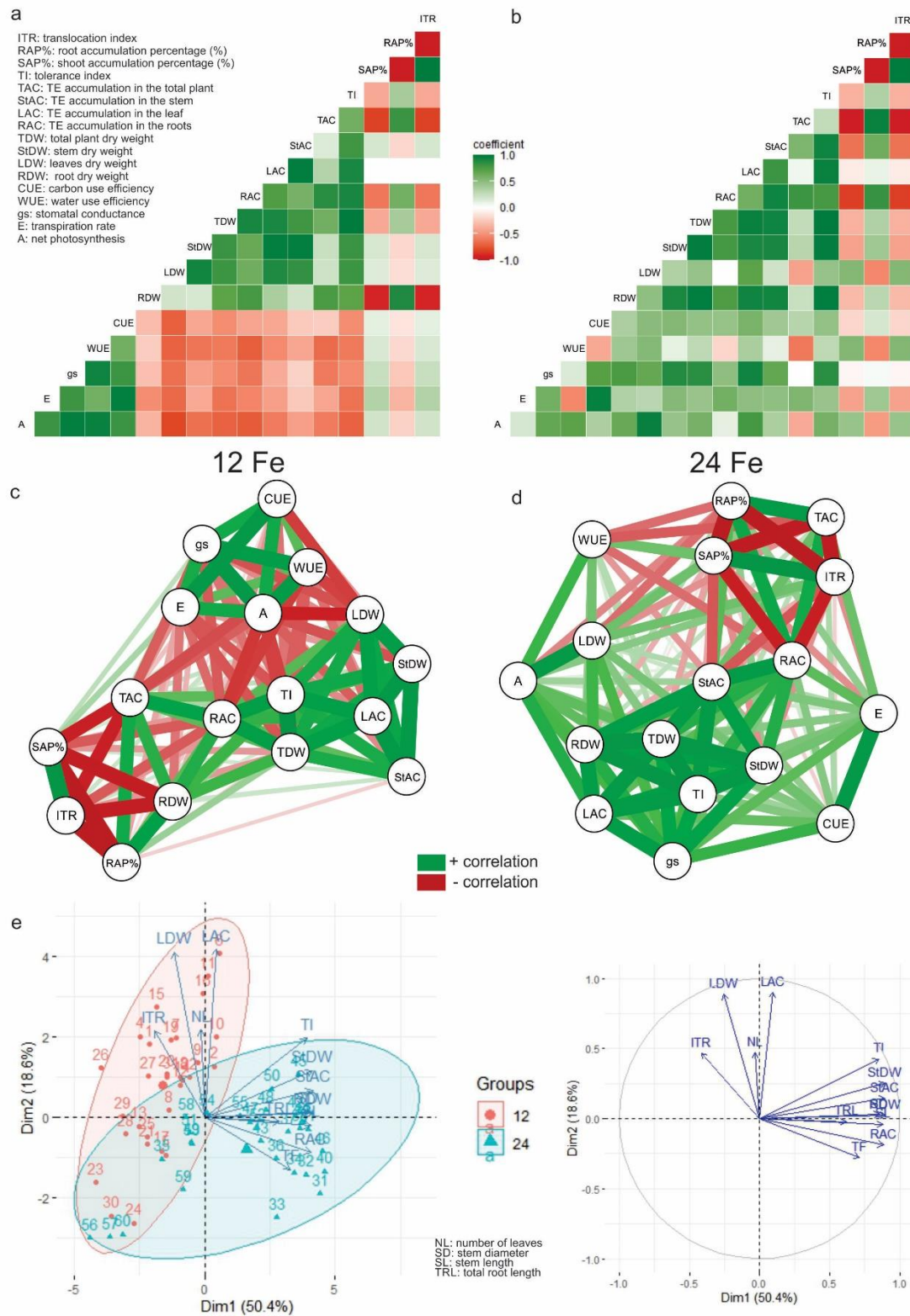


Fig.13: Multivariate analysis: correlation and principal component analysis (PCA) of *L. leucocephala*, subjected to Fe treatments in the soil, at 12 and 24 months of cultivation. Correlation analysis was performed with the variables gas exchange, biomass, accumulation, tolerance and translocation index, and percentage of accumulation: (a) and (b): Pearson correlation (r); (c) and (d) network correlation. Left and

right side are the correlations of *Leucaena leucocephala* at 12 and 24 months of cultivation, respectively; (e) principal component analysis - PCA (PCA-biplot and PCA-variables). Pearson correlation (r): coefficient = 1, indicates a positive correlation between the variables; coefficient = -1, indicates negative correlation; coefficient = ± 0.5 , indicates a moderate correlation; coefficient = 0, indicates that the variables do not depend linearly on each other. Network correlation: each variable is a node and each correlation is a connecting edge/line. Closer, correlated relationships have a thicker edge/connection, and the more intense the color, the stronger the relationship between them ($R \geq 0.7$ and the significance level is $p < 0.05$). In both correlations: intense green indicates a strong positive correlation (as the value of one variable increases, so does the value of the other variable); Deep red means a strong negative correlation (as the value of one variable increases, the value of the other decreases). The principal component analysis Biplot was performed with the growth variables; biomass; index of tolerance and percentage of accumulation. The acronyms of the variables analyzed were: A: photosynthetic rate; E: transpiration rate; gs: stomatal conductance; WUE: water use efficiency; CUE: carbon use efficiency; RDW: root dry weight; LDW: dry weight of leaves; StDW: stem dry weight; TDW: total biomass; RAC: root accumulation; LAC: accumulation in leaves; StAC: stem accumulation; TAC: accumulation in total biomass; TI: tolerance index; ITR: translocation index; SAP%: shoot accumulation percentage; RAP%: root accumulation percentage; NL: number of leaves; SL: stem length; SD: stem diameter; TRL: total root length. Number of observations: 60.

4. Discussão

É importante destacar que os períodos de cultivo exercem diferentes respostas sobre as variáveis. Aos 4 meses de cultivo, sob diferentes concentrações de Cu (100; 200; 300; 400 e 500 mg dm⁻³ de solo), não foram observadas diferenças significativas para A, Ci e CUE (Bomfim et al., 2023). Da mesma forma, após 12 meses tratamentos com Cu não apresentaram influência significativa nas trocas gasosas (A, E, gs, WUE, EIUA, Ci, CiCa e CUE) de *L. leucocephala*. Entretanto, apesar da ausência de efeito sobre as trocas gasosas, os tratamentos com Cu, especialmente acima de T150 em 12 meses, provocaram uma redução significativa no número de folhas, comprimento e diâmetro do caule, comprimento da raiz, e na biomassa tanto da parte aérea quanto da raiz (Fig.4), demonstrando ser prejudicial ao crescimento das plantas.

Aos 24 meses, no entanto, os tratamentos e o acúmulo de Cu passaram a influenciar as trocas gasosas (A, WUE, Ci, CiCa e CUE), bem como as variáveis de crescimento e biomassa, principalmente a partir de T150 (Fig.4 e 7). Portanto, para espécies arbóreas, é imprescindível considerar o cultivo e avaliações fisiológicas e biométricas a longo prazo para compreender melhor as respostas e possíveis mecanismos e/ou estratégias de defesa utilizadas por cada espécie a determinado estresse para avaliar o real potencial da espécie.

À medida que os tratamentos de Cu e o tempo aumentam, aumenta o acúmulo de Cu na raiz, consequentemente o acúmulo de Cu na planta aumenta (Fig.5), demonstrando assim o efeito negativo do Cu sobre as trocas gasosas, o crescimento e biomassa da planta, assim como foi observado grandes concentrações de Cu nas raízes (183,29 mg kg⁻¹) de *L.*

leucocephala, cujo crescimento foi severamente prejudicado aos 90 dias de cultivo em solo com até 50% de resíduos de Cu no solo (Lins et al., 2006).

Não houve diferença na partição de biomassa entre raiz e parte aérea entre T50 e T350, tanto aos 12 quanto aos 24 meses, tampouco na porcentagem de acúmulo (Fig.6). O índice de translocação (ITR) é menor que 0,2, isto é, *L. leucocephala* não é fitoextratora de Cu, menos que 20% de Cu foi translocado e acumulado na parte aérea e $\approx 80\%$ de Cu foi acumulado no sistema radicular, de acordo com o RAP% e SAP% (Fig.6), assim como observado por Lins et al. (2006). Desses 20%, apenas 4% de Cu foi acumulado nas folhas, isto é, a maior parte de Cu translocado para a parte aérea foi acumulado no caule, e como podemos observar, em T150 aos 24 meses, o StAC (Fig.5) atrelado a arquitetura da raiz (PRL, TRL e RDW) (Fig.4) diminuiu a eficiência do uso da água e a fotossíntese líquida (T150) das plantas (Fig.2), assim como nos tratamentos de 100 e 200 mg dm⁻³ da mesma espécie aos 4 meses de cultivo (Bomfim et al., 2023).

Poucas plantas são capazes de acumular grandes quantidades de elementos em sua parte aérea, principalmente em suas folhas, chamadas de hiperacumuladoras, porém muitas dessas espécies são inadequadas para projetos de fitorremediação devido sua baixa produção de biomassa e incapacidade de sobreviver ou prosperar em ambientes com concentrações elevadas de PTEs (co-contaminação) (Hunt et al., 2014). Foi reportada uma concentração limite de 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ para hiperacumulação de Cu em plantas; para Fe, até o momento; não se tem registros (van der Ent et al., 2012). Nas folhas de *L. leucocephala* foram acumuladas aproximadamente 9,88 $\mu\text{g orgão}^{-1}$ ($\pm 152,10$); 73,01 ($\pm 9,20$) $\mu\text{g orgão}^{-1}$ e 1120,84 $\mu\text{g orgão}^{-1}$ ($\pm 152,10$) entre T150 a T350, aos 24 meses, nas folhas, parte aérea e raízes, respectivamente, demonstrando quão baixo é o acúmulo de Cu parte aérea das plantas em relação a hiperacumuladoras.

Desde a fase de plântula, observa-se o efeito do Cu, a partir de T150, sobre o crescimento e desenvolvimento de *L. leucocephala* (Fig.3 e 4), mas nota-se também, possivelmente, um processo de aclimação ao estresse por Cu, entre 3 a 12 meses, como demonstrado na Fig.3, cujo crescimento (SL, SD, NL) é constante, entretanto, a partir dos 12 meses, as plantas continuam a crescer (incorporam biomassa), mas, de forma mais restrita, lenta, principalmente em relação à parte aérea (Fig.3 e 4). A partir do momento que uma espécie se estabelece em um solo com alta ou baixa concentração de PTE, ajustes aparecerão dentro dos limites da plasticidade fenotípica, além da adaptação e evolução da tolerância nas populações ao longo do tempo (Pollard et al. 2002; van der Ent et al., 2013). Neste estudo, *L. leucocephala* foi cultivada em condições de solo natural, enriquecido

com Cu e Fe apenas, a partir de sementes, após a emergência das plântulas, o crescimento foi avaliado ao longo de 12 e 24 meses, em condições de casa de vegetação. À medida que as plantas se desenvolviam ao longo do tempo, ajustes, planta-solo, ocorriam frente ao estresse metálico.

As plantas apresentaram capacidade de sobreviver durante esse período, mas o TI, menor que 0,3 indica que as plantas não são tolerantes ao Cu (Fig.6). O TI é calculado de acordo com a capacidade de acúmulo de biomassa da espécie, em uma razão entre os tratamentos enriquecidos com TEs e o tratamento controle. Nesse sentido, a diferença de crescimento, entre T50 a T350, demonstra como o Cu afetou negativamente a espécie (Fig.4). Quanto ao TI: de 0-0,5: classifica-se como não tolerante; de 0,5–1,0 classifica-se tolerante (Jia et al., 2017).

O comprimento da raiz pivotante (PRL) e a biomassa da raiz (RDW) não se alteram ao longo do tempo para cada tratamento, mas, o comprimento total da raiz (TRL) aumentou, em T250 e T350 (Fig.4), e isso pode justificar o aumento de acúmulo de Cu ao longo do tempo (Fig.5), ou seja, maior superfície de contato entre raiz e solução do solo, maior absorção e acúmulo. Quanto maior o acúmulo na raiz (RAC e RAP%), menor a translocação de Cu para a parte aérea (LAC e ITR) (Fig.6). De acordo com a separação dos grupos 12 e 24 da PCA, o acúmulo de Cu no caule (StAC) foi a variável mais importante (acúmulo na parte aérea) para explicar o comportamento de LAC, RDW, StDW; LDW, TI, TF, ITR, TRL, SL, SD e NL aos 12 meses de cultivo (Fig.7), já aos 24 meses, o acúmulo de Cu na raiz foi a variável mais importante para explicar o comportamento das demais variáveis (Fig.7). Observa-se que a raiz é um órgão muito importante no processo de aclimação do estresse por dois motivos: (1) por ser o sítio prioritário de acúmulo de Cu; (2) restringir a translocação de Cu para as folhas, além das outras funções como absorção de água e nutrientes, sustentação, e associação simbiótica com bactérias diazotróficas (Cambrollé et al., 2013; Kumar et al., 2021; Bomfim et al., 2021 e 2023).

A correlação entre a biomassa e as trocas gasosas demonstram a importância de estudar como a anatomia das plantas responde ao estresse metálico ao longo do tempo. Alguns estudos mostraram que boro e o chumbo, por exemplo, alteram a anatomia de folhas e raízes de arbóreas como *Astronium graveolens*, *Astronium fraxinifolium* Schott e *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Araujo et al., 2020; Leite et al., 2022; da Silva Paiva et al., 2024). Essas plantas apresentaram aumento na espessura do parênquima paliádico e esponjoso, além da manutenção da área de secção transversal do elemento

vaso radicular em *P. dubium*; aumento da espessura da epiderme abaxial e adaxial em *A. graveolens* e *A. fraxinifolium* (Araujo et al., 2020; Leite et al., 2022; da Silva Paiva et al., 2024) para aclimação a presença desses metais.

Quanto aos elementos de vaso, tanto radicular quanto caulinar, são responsáveis pelo transporte de água, nutrientes e hormônios através da planta (Myburg et al., 2013), e pode ser que o acúmulo de Cu e Fe possa ter provocado alterações nos elementos de vaso, xilema, visto que houve correlação negativa entre StAC - WUE, em Cu, e TAC - WUE, em Fe, aos 24 meses de cultivo. *L. leucocephala* submetida a doses de arsênio apresentou, dentre outras características, acúmulo de substâncias fenólicas, principalmente no xilema secundário (Schneider et al., 2013), o que reforça a possibilidade de que o Cu e o Fe tenham afetado a WUE. Alterações anatômicas induzidas por estresse metálico podem ser benéficas para o crescimento das plantas, aumentando a tolerância ao estresse (da Silva Paiva et al., 2024). Isto sugere a necessidade de mais pesquisas morfoanatômicas para entender como essas mudanças ao longo do tempo interferem na resposta fitotóxica.

O índice de transferência (TF) refere-se a porcentagem de Cu que foi transferido do solo para a planta e de acordo com nossos resultados, essa razão planta/solo foi muito baixa, nem 1% do Cu que estava biodisponível no solo foi transferido para a planta, embora a biodisponibilidade de Cu no solo tenha diminuído após o cultivo de *L. leucocephala* (CAC), exceto em T350 aos 12 meses, como mostra a Fig.6. A partir de T150 a T350 não houve diferença entre o TF de 12 e 24 meses, assim como não houve diferença na biodisponibilidade de Cu após o cultivo das plantas em relação ao tempo de cultivo (Fig.6). As plantas submetidas aos tratamentos de Cu, ao longo de 24 meses, tiveram seu crescimento prejudicado e limitado, porém as plantas não cessaram a absorção e acúmulo de Cu, como podemos ver no StAC, RAC e TAC (Fig.5), com isso, supõe-se que o CAC foi menor que o CBC devido ao acúmulo de Cu nas plantas (TAC), ainda que insuficiente para transferir e diminuir 50% Cu do solo, por exemplo. Acredita-se que o crescimento restrito da raiz devido a toxicidade do Cu, em T350 aos 12 meses, limitou a capacidade de absorção e acúmulo de Cu, com isso o CAC foi 130,41% maior que o CBC (Fig.3, 4 e 6).

Características como o tipo de solo, capacidade de troca catiônica, pH, matéria orgânica e textura, influenciam na disponibilidade de Cu e sua distribuição tem alta afinidade por MO, com isso, acumula-se no solo facilmente. O pH rizosférico influencia mais a biodisponibilidade do Cu que o pH do solo (Chaignon et al., 2009; Wu et al.,

2010a, 2010b). Sendo assim, a alta quantidade de matéria orgânica dissolvida no pH rizosférico altera ainda mais a especiação dinâmica do Cu (Bravin et al., 2012). Assim como o pH e altas concentrações de Al e Fe no solo (Zhang et al., 2018a). Além disso, as raízes de algumas plantas também são responsáveis por alterarem a biodisponibilidade de Cu no solo como também as mudanças de estações e condições edafoclimáticas de cada região (Yruela, 2009; Moreira et al., 2022). A disponibilidade de Fe no solo também é afetada pelo pH do solo, sais e alguns íons dissolvidos na solução do solo (Ning et al., 2023).

A absorção de Cu e Fe pelas raízes são semelhantes, envolvendo mecanismos redutores de absorção de Cu^{+1} (íon cuproso) na superfície da célula radicular a partir de Cu^{+2} (íon cúprico) (Printz et al., 2016). No caso da aquisição de Fe, há redução do Fe^{3+} radicular através de uma Fe (III)-quelato redutase juntamente com um aumento na biossíntese de um transportador de Fe^{2+} e acidificação da rizosfera em Fe^{2+} o qual é absorvido pelas raízes (Lucena et al., 2017; Ning et al., 2023). As duas formas de Cu^{+1} e Cu^{+2} podem ser transferidas do solo para as plantas, mas geralmente são transferidas na forma de complexos de Cu, assim como complexos de Fe, e translocados da raiz para a parte aérea através dos vasos de xilema (Kumar et al., 2021).

Transportadores de metais pesados (ZIP, por exemplo) em conjunto com outras moléculas de transporte (nicotianamina, por exemplo) de metais também participam da absorção e translocação desses elementos minerais através dos tecidos das plantas (Kumar et al., 2021). A mobilidade, a relocação solo-planta do Cu variam substancialmente de acordo com a especiação, já o Fe apresenta baixa mobilidade dentro dos órgãos da planta (Lucena et al., 2017; Kumar et al., 2021; Ning et al., 2023).

Diferentemente do observado em Cu, a biomassa e o crescimento das plantas não foram drasticamente prejudicados pela biodisponibilidade e acúmulo de Fe ao longo do tempo, por exemplo: a biomassa total (TDW), entre T50 e T250, foi igual ou superior a T0, apenas em T350 que TDW foi menor que T0. Além disso, o acúmulo de Fe não aumentou ao longo do tempo, como no caso do Cu.

De maneira geral, os tratamentos de Fe, T50 e T150 estimularam o crescimento e o incremento de biomassa das plantas (SL, SD, StDW, TDW). O T250 afetou negativamente algumas das variáveis analisadas aos 12 meses (SL, SD, NL), mas ao longo do tempo, a resposta das plantas a esse tratamento foi positivamente diferente, embora a biomassa de parte aérea (SDW, StDW) tivesse sido menor que T0. Os

tratamentos de Fe não afetaram o crescimento de raiz (PRL e TRL), em ambos os tempos de cultivo, embora a biomassa de raiz (RDW) tenha sido menor em T350 que T0.

O T350 afetou o crescimento e biomassa das plantas (SL, StDW, SDW, RDW) aos 12 e 24 meses de cultivo e essas variáveis se correlacionam positivamente com o índice de tolerância, isto é, se uma aumenta a outra também aumenta. O índice de tolerância entre T50 a T250 foi igual ou superior a 1,0, já em T350 o TI foi 0,5, indicando que a biomassa das plantas foi afetada pela toxicidade de Fe, embora todas as plantas tenham sobrevivido ao longo de 24 meses de cultivo.

A transferência (TF) de Fe para a planta aumentou ao longo do tempo, entre T0 e T150, assim como no acúmulo de Fe no caule e na raiz (StAC e RAC), mas não refletiu no acúmulo total (TAC): a partir de T150 não houve diferença de acúmulo entre 12 e 24 meses. Conforme o baixo índice de translocação (ITR) e os dados de porcentagem de acúmulo (RAP% e SAP%), *L. leucocephala* restringe o Fe no sistema radicular, assim como observado por Lins et al. (2006).

Embora tenha ocorrido transferência e acúmulo de Fe na planta, a biodisponibilidade de Fe no solo foi maior depois do cultivo (CAC) das plantas que antes (CBC), tanto aos 12 quanto aos 24 meses. Supõe-se que a interação das propriedades físico-químicas do solo + exsudatos radiculares + PTE + microrganismos tenham aumentado a biodisponibilidade de Fe no solo. A secreção de sideróforos por rizobactérias e endofíticos estimulam a mobilização de ferro na rizosfera para a absorção pelas raízes e isso pode ser responsável pelo o aumento da solubilização de Fe no solo (Dey et al., 2020; Doku et al., 2024). Embora a presença de microrganismos (rizóbios ou micorrizas) não foi avaliada neste estudo, foi observado que as raízes das plantas de todos os tratamentos apresentaram nódulos com formato multilobado, indicando a associação simbiótica com rizóbios nas suas raízes.

Observou-se que a proporção de aumento de disponibilidade de Fe foi diferente de T0, chamado de diferença percentual, e esses dados mostram que antes do cultivo de *L. leucocephala* a proporção/taxa de aumento da disponibilidade de Fe no solo entre os tratamentos era maior que depois do cultivo da espécie. Isto é, a proporção de aumento de Fe disponível no solo, D_{CAC} , teria sido igual ou maior que o D_{CBC} se a espécie não influenciasse na dinâmica do elemento no solo, demonstrando que a espécie pode ajudar a estabilizar o Fe no solo.

A associação de técnicas combinadas (fitogerenciamento ou fitogestão): plantas, microrganismos micorrízicos e/ou rizóbios ou fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos

podem aumentar o potencial de fitorremediação da espécie, além disso, os microrganismos associados às plantas podem aumentar a tolerância das plantas, melhorar os teores de nutrientes da rizosfera, melhorar a qualidade do solo e com isso beneficiar o crescimento sustentável das plantas em meio ao estresse metálico (Yu et al., 2021; Doku et al., 2024).

Leucaena leucocephala não é hiperacumuladora de Cu e Fe, mas apresenta muitas características favoráveis tanto para fitorremediação, quanto para melhoria da qualidade do solo: crescimento rápido; altos rendimentos de biomassa (50 toneladas ha⁻¹ ano⁻¹); colonização micorrízica; nodulação e fixação de nitrogênio; resistência a doenças; flexibilidade em resposta à disponibilidade de nutrientes no solo (tolera solos pouco férteis); o comprimento da raiz axial e densidade do comprimento lateral da raiz a caracteriza como planta de sistema radicular profundo, fazendo com que seja capaz de buscar água em regiões mais profundas (tolerância ao estresse hídrico), também ajuda no controle de erosão do solo, reduzindo o escoamento superficial e a perda de solo; adaptabilidade a uma ampla gama de condições ambientais, sendo portanto indicada para projetos de revegetação com devido manejo (Savale et al. 2007; Bageel et al., 2020; Alemán-Ramirez et al., 2022).

A partir dos resultados pós cultivo, a diminuição da biodisponibilidade dos elementos no solo não foi tão alta, a ponto de reduzir 50% desses elementos, ou alta transferência e acúmulo pelas plantas, mas os dados comprovam o potencial da espécie na estabilização de TEs nas condições de solo apresentadas: tanto as propriedades físico químicas, baixa matéria orgânica, solo de baixa fertilidade, concentração biodisponível de TE, pH variando entre 4,88 a 6,9 e restrição imposta pelo tamanho do vaso, condicionaram o crescimento, tolerância e potencial das plantas em estabilizar os TEs. Entretanto, em condições de cultivo a longo prazo em campo, com determinada densidade populacional de espécimes, e associadas com outras técnicas de fitogerenciamento, a estabilização e até mesmo a fitoextração podem ser potencializadas. Isso é evidenciado por registros de que o cultivo a longo prazo de *L. leucocephala* em associação com comunidades bacterianas, em áreas abandonadas de rejeitos de mineração, acumule grandes quantidades de PTEs (Fe, Cd e Mn) na sua parte aérea (fitoextração) (Doku et al., 2024).

Em uma revisão de escopo (no prelo), onde o contexto do estudo foi restrito a níquel, fisiologia vegetal e Fabaceae, evidenciou a falta de diversidade de espécies da Família Fabaceae em estudos com níquel, sendo que a maioria das espécies estudadas

foram herbáceas e as lenhosas (*Gleditsia triacanthos* L., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit., *Pongamia pinnata* (L.) Pierre, *Robinia pseudoacacia* L., e *Tamarindus indica* L. apareceram uma única vez, representando apenas 3% das espécies como sujeito de estudos dos trabalhos investigados (no prelo). Esse panorama pode ser expandido para outros PTEs, algumas poucas espécies arbóreas e/ou lenhosas são estudadas quanto a tolerância e potencial fitorremediador de PTEs (Flores, 2021).

Algumas (poucas) espécies de plantas lenhosas com alta produção de biomassa, tolerância e potencial acúmulo de PTEs foram investigadas quanto a fitorremediação de solos contaminados por Cd, Zn, Cu, As e Pb: os gêneros: *Salix* (Cao et al., 2022; Li et al., 2022a), *Quercus spp.* (Qu et al., 2020; Li et al., 2022b; Li et al., 2023), *Populus* (Hu et al., 2021), *Phyllostachys* (Bian et al., 2021), *Rhus* (Shi et al., 2023), *Pinus* (Kharazian et al., 2023) e *Leucaena spp* (Lins et al., 2006; Schneider et al., 2013 e 2017; Bomfim et al., 2021 e 2023). Desses trabalhos poucos apresentaram cultivo e avaliação por mais de seis meses (Hu et al., 2021; Li et al., 2022b; Li et al., 2023).

Além disso, o baixo acúmulo de PTEs em plantas lenhosas estão associados ao efeito de diluição biológica desses elementos na biomassa das plantas, em condições de cultivo em vaso a produção de biomassa e acúmulo não é a mesma que o cultivo dessas plantas em campo, como demonstrado no cultivo de choupo (*Populus deltoides* CL.) cultivado em campo sob rejeitos de mineração (Cd, Cu, Cr, Ni, Pb e Zn) com acompanhamento durante 4 anos (Suo et al., 2021). Sendo assim, estudos com plantas lenhosas necessitam de cultivo e avaliação a longo prazo, assim como cultivo a campo, para determinar a real tolerância e potencial fitorremediador das espécies. Nosso estudo foi conduzido por 12 e 24 meses em condições de casa de vegetação, mas não deixa de ter resultados relevantes para serem usados como referências de conhecimento para outros estudos também em vaso, estudos futuros ou projetos de fitorremediação em condições de campo, e até mesmo para uso em outras áreas de pesquisa como engenharia genética, biotecnologia e/ou bioenergia (aplicações bioenergéticas) (Alemán-Ramirez et al., 2022).

Dificuldades encontradas

O crescimento (PRL e TRL) das raízes não foi prejudicado pelos tratamentos de Fe e observou-se que as raízes ocuparam toda extensão do vaso, diferentemente do efeito dos tratamentos de Cu. Não foi possível separar e quantificar os nódulos das raízes devido à dificuldade e o cuidado de separar as raízes do solo, durante esse processo de coleta,

lavagem e secagem perderam-se muitos nódulos. Com isso, não foi possível avaliar a qualidade dos nódulos, bem como avaliar o metabolismo e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por meio desses órgãos.

A condição de estresse metálico imposta às plantas fez com que o crescimento e biomassa dessas plantas lenhosas fossem restritos, principalmente nos tratamentos com maior concentração do agente estressante. Considerando que os foliólulos sejam finos e delicados com baixo peso fresco, e que o crescimento e biomassa de parte aérea foi prejudicado pelo estresse, em que em alguns tratamentos a partição de biomassa foi menor que o sistema radicular, não foi possível coletar amostras de folhas para quantificar o metabolismo de nitrogênio, tampouco avaliar a resposta molecular do sistema antioxidante e o grau de degradação da membrana através da estimativa da peroxidação lipídica. Além disso, não foi possível monitorar e controlar o pH do solo ao longo dos 12 e 24 meses, ainda que a variação seja alta (4,88 a 6,60), o pH ficou dentro da faixa de disponibilidade proposto por Malavolta (1980) e que é sabido que a mudança de pH é comum ao longo do tempo (Suo et al., 2021). Nesse cenário, é sugerida uma abordagem bioquímica para complementar as respostas obtidas nesse experimento.

5. Conclusão

Experimentos em condições de casa de vegetação em curtos períodos são importantes como estudos pilotos para identificar espécies com potencial de tolerância a estresse metálico. Entretanto, cultivos e avaliação a longo prazo de espécies lenhosas são muito importantes para a validação de como a planta responde ao estresse ao longo do tempo, evitando respostas superestimadas obtidas em curtos períodos de estresse. A utilização de solo em condições naturais enriquecidas com os PTEs é preferível a outros substratos para compreender a dinâmica dos elementos na tríade planta-solo-microrganismos. Os insights sobre o potencial fitorremediador de *L. leucocephala* a diferentes PTEs, em cultivos longos, em condições de campo, e a reutilização de seus resíduos de biomassa merecem estudos adicionais. Este estudo encoraja pesquisas futuras de remediação com *L. leucocephala* em condições de campo, a partir de manejo e tratamentos culturais específicos para evitar a disseminação descontrolada de sementes.

Leucaena leucocephala apresentou comportamentos diferentes em respostas ao Cu e ao Fe. Concentrações biodisponíveis superiores a 27,40 mg kg⁻¹ de Cu no solo (tratamento > 50 mg dm⁻³) afetaram negativamente o crescimento de *L. leucocephala*, devido a isso, a espécie foi caracterizada como não tolerante ao Cu aos 12 e 24 meses de

cultivo. A espécie foi tolerante a concentrações entre 22,98 a 76,93 mg kg⁻¹ de Fe no solo (até o tratamento 250 mg dm⁻³), concentrações de Fe superiores a estas foram entendidas como prejudiciais para o crescimento, reduzindo a tolerância de *L. leucocephala*.

Leucaena leucocephala apresentou baixo índice de translocação de Cu e Fe, sendo que os elementos transferidos para as plantas foram absorvidos e acumulados majoritariamente no sistema radicular. As plantas acumularam Cu e Fe, em média: 126,01 µg planta⁻¹ (± 5,64) e 2,47 mg planta⁻¹ (± 0,25) aos 12 meses; 209,03 µg planta⁻¹ (± 10,54) e 3,30 mg planta⁻¹ (± 0,26) aos 24 meses, entre T150 a T350 de Cu e Fe, respectivamente, na sua biomassa. O acúmulo de Cu na planta aumentou ao longo do tempo, entretanto, o tempo de cultivo não influenciou o acúmulo de Fe. O tempo de cultivo ou o tempo de exposição da planta ao estresse metálico influenciou o bom crescimento e potencial de acúmulo de PTEs das plantas.

Ao longo do tempo a biodisponibilidade de Cu e Fe no solo aumentaram, tanto antes quanto depois do cultivo das plantas, devido às interações planta-solo. A biodisponibilidade do Cu no solo, depois do cultivo das plantas, foi menor que antes do cultivo, demonstrando a influência de *L. leucocephala* na estabilização do Cu no solo. *L. leucocephala* também influencia na estabilização de Fe no solo, mas são necessários estudos complementares para compreender melhor a dinâmica do Fe no sistema planta-solo.

Referências

- Alemán-Ramirez, J.L., Okoye, P.U., Torres-Arellano, S., Mejía-Lopez, M., Sebastian, P.J., 2022. A review on bioenergetic applications of *Leucaena leucocephala*. *Industrial Crops and Products* 182, 114847, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114847>.
- Araujo, M.A., Leite, M.C.M., Camargos, L.S., Martins, A.R., 2020. Tolerance evaluation and morphophysiological responses of *Astronium graveolens*, a native brazilian Cerrado, to addition of lead in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 195, 110524, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110524>.
- Arnold, J.B., Gergely Daroczi [ctb], Bo Werth [ctb], Brian Weitzner [ctb], Joshua Kunst [ctb], Baptise Auguie [ctb], Bob Rudis [ctb], Hadley Wickham [ctb] (Code from the ggplot2 package.), Justin Talbot [ctb] (Code from the labeling package), [ctb], J.L., 2021. ggthemes: Extra Themes, Scales and Geoms for 'ggplot2'. <https://CRAN.R-project.org/package=ggthemes>.
- Arnold, T.B., Emerson, J.W., 2011. Nonparametric Goodness-of-Fit Tests for Discrete Null Distributions. *The R Journal* 3, 34-39, 10.32614/RJ-2011-016.

Bageel, A., Honda, M.D.H., Carrillo, J.T., Borthakur, D., 2020. Giant leucaena (*Leucaena leucocephala* subsp. glabrata): a versatile tree-legume for sustainable agroforestry. *Agroforestry Systems* 94, 251-268, [10.1007/s10457-019-00392-6](https://doi.org/10.1007/s10457-019-00392-6).

Benincasa MMP (2003) *Análise de crescimento de plantas: noções básicas*. Jaboticabal: FUNEP, p 42. (in Portuguese).

Bian, F., Zhong, Z., Li, C., Zhang, X., Gu, L., Huang, Z., Gai, X., Huang, Z., 2021. Intercropping improves heavy metal phytoremediation efficiency through changing properties of rhizosphere soil in bamboo plantation. *Journal of Hazardous Materials* 416, 125898, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125898>.

Bomfim, N.C.P., Aguilar, J.V., de Paiva, W.d.S., de Souza, L.A., Justino, G.C., Faria, G.A., Camargos, L.S., 2021. Iron phytostabilization by *Leucaena leucocephala*. *South African Journal of Botany* 138, 318-327, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.013>.

Bomfim, N.C.P., Aguilar, J.V., Ferreira, T.C., de Souza, L.A., Camargos, L.S., 2023. Could nitrogen compounds be indicators of tolerance to high doses of Cu and Fe in the cultivation of *Leucaena leucocephala*? *Plant Physiology and Biochemistry* 194, 489-498, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.11.042>.

Bomfim, N.C.P., Aguilar, J.V., Ferreira, T.C., dos Santos, B.S., de Paiva, W.d.S., de Souza, L.A., Camargos, L.S., 2023. Root development in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit enhances copper accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*, [10.1007/s11356-023-28152-1](https://doi.org/10.1007/s11356-023-28152-1).

Bravin, M.N., Garnier, C., Lenoble, V., Gérard, F., Dudal, Y., Hinsinger, P., 2012. Root-induced changes in pH and dissolved organic matter binding capacity affect copper dynamic speciation in the rhizosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 84, 256-268, [10.1016/j.gca.2012.01.031](https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.01.031).

Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Figueroa-Luque, E., Luque, T., Figueroa, M.E., 2013. Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monopetalum*. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 8839-8847, [10.1007/s11356-013-1833-4](https://doi.org/10.1007/s11356-013-1833-4).

Cannell, M.G.R., Thornley, J.H.M., 2000. Modelling the Components of Plant Respiration: Some Guiding Principles. *Annals of Botany* 85, 45-54, [10.1006/anbo.1999.0996](https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0996).

Cao, Y., Tan, Q., Zhang, F., Ma, C., Xiao, J., Chen, G., 2022. Phytoremediation potential evaluation of multiple *Salix* clones for heavy metals (Cd, Zn and Pb) in flooded soils. *Science of The Total Environment* 813, 152482, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152482>.

Chaignon, V., Quesnoit, M., Hinsinger, P., 2009. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. *Environmental Pollution* 157, 3363-3369, [10.1016/j.envpol.2009.06.032](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.06.032).

da Silva Paiva, W., de Araujo, M.A., Rosalem, P.F., Ferreira, T.C., Bomfim, N.C.P., Gonçalves, R.A., Martins, A.R., de Camargos, L.S., 2024. Lead effect on the morphophysiology of leaves and roots of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., a potential phytostabilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology* 21, 2735-2746, [10.1007/s13762-023-05120-3](https://doi.org/10.1007/s13762-023-05120-3).

Demattê, J.L.I., 1980. Levantamento detalhado de solos do “Campus Experimental de Ilha Solteira”. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba (in Portuguese).

Dey, S., Regon, P., Kar, S., Panda, S.K., 2020. Chelators of iron and their role in plant's iron management. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 26, 1541-1549, [10.1007/s12298-020-00841-y](https://doi.org/10.1007/s12298-020-00841-y).

Doku, E.T., Sylverken, A.A., Belford, J.D.E., 2024. Rhizosphere microbiome of plants used in phytoremediation of mine tailing dams. *International Journal of Phytoremediation*, 1-9, [10.1080/15226514.2024.2301994](https://doi.org/10.1080/15226514.2024.2301994).

EPA, U.S., 2007. Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils, in: EPA, U.S. (Ed.), United States Environmental Protection Agency- U.S. EPA ed. United States Environmental Protection Agency- U.S. EPA, Washington, DC, p. Analytical Method, <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3051a.pdf>.

Epskamp, S., Cramer, A.O.J., Waldorp, L.J., Schmittmann, V.D., Borsboom, D., 2012. qgraph: Network Visualizations of Relationships in Psychometric Data. *Journal of Statistical Software* 48, 1 - 18, [10.18637/jss.v048.i04](https://doi.org/10.18637/jss.v048.i04).

Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A., 2021. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Português). <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>. (in Portuguese).

Flores, J.C., 2021. The Future of Phytoremediation, in: Flores, J.C. (Ed.). Nova Science Publishers Inc, p. 305, Chapter 8: Phytoremediation: A Scientometric analysis of contribution in Scielo and Scopus databases, pg 271, <https://novapublishers.com/shop/the-future-of-phytoremediation/>.

Fox, J., Weisberg, S., 2019. An R Companion to Applied Regression, Third ed. Sage, <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>.

Frachia, C.d.L., Silva, V.N.d., Paiva, W.d.S.d., Barbosa, I.C.F., Silva, M.B.d., Souza, L.A., Justino, G.C., Camargos, L.S.d., 2022. *Inga uruguensis* response to lead: effects on growth and nitrogenous compounds. *Rodriguésia* 73, <https://doi.org/10.1590/2175-7860202273063>.

Goswami, R., Neog, N., 2023. Heavy Metal Pollution in the Environment: Impact on Air Quality and Human Health Implications, in: Singh, R.P., Singh, P., Srivastava, A. (Eds.), Heavy Metal Toxicity: Environmental Concerns, Remediation and Opportunities. Springer Nature Singapore, Singapore, pp 75-103. [10.1007/978-981-99-0397-9_4](https://doi.org/10.1007/978-981-99-0397-9_4).

Graves, S., Piepho, H.-P., Selzer, L., Dorai-Raj, S., 2023. multcompView: Visualizations of Paired Comparisons. <https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>.

Hassan, S., Bhadwal, S.S., Khan, M., Sabreena, Nissa, K.-U., Shah, R.A., Bhat, H.M., Bhat, S.A., Lone, I.M., Ganai, B.A., 2024. Revitalizing contaminated lands: A state-of-the-art review on the remediation of mine-tailings using phytoremediation and genomic approaches. *Chemosphere* 356, 141889, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141889>.

Horikoshi, M., Tang, Y., 2016. ggfortify: Data Visualization Tools for Statistical Analysis Results., <https://CRAN.R-project.org/package=ggfortify>.

Hu, Y., Huang, Y., Xu, Z., Ma, Y., Chen, H., Cui, D., Su, J., Nan, Z., 2021. Redistribution of calcium and sodium in calcareous soil profile and their effects on copper and lead uptake: A poplar-based phytomanagement. *Science of The Total Environment* 755, 142535, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142535>.

Hunt, A.J., Anderson, C.W.N., Bruce, N., García, A.M., Graedel, T.E., Hodson, M., Meech, J.A., Nassar, N.T., Parker, H.L., Rylott, E.L., Sotiriou, K., Zhang, Q., Clark, J.H., 2014. Phytoextraction as a tool for green chemistry. *3*, 3-22, doi:10.1515/gps-2013-0103.

Ishak, M.Z., Kuan, M.L., Ismail, K.S.K., 2021. Optimization of upstream processing for the production of bioethanol from *Leucaena leucocephala* seeds using *Kluyveromyces marxianus* UniMAP 1-1, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1 ed, 10.1088/1755-1315/765/1/012053.

Jia, W., Miao, F., Lv, S., Feng, J., Zhou, S., Zhang, X., Wang, D., Li, S., Li, Y., 2017. Identification for the capability of Cd-tolerance, accumulation and translocation of 96 sorghum genotypes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145, 391-397, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.002>.

Kabata-Pendias A, Pendias H (2001) Trace elements in soils and plants. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, p 403.

Kahangwa, C.A., Nahonyo, C.L., Sangu, G., Nassary, E.K., 2021. Assessing phytoremediation potentials of selected plant species in restoration of environments contaminated by heavy metals in gold mining areas of Tanzania. *Heliyon* 7, e07979, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07979>.

Kassambara, A., 2023. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>.

Kassambara, A., 2023. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>.

Kassambara, A., Mundt, F., 2020. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.

Kaur, B., Singh, B., Kaur, N., Singh, D., 2018. Phytoremediation of cadmium-contaminated soil through multipurpose tree species. *Agroforestry Systems* 92, 473-483, 10.1007/s10457-017-0141-2.

Kharazian, P., Bacchetta, G., Cappai, G., Piredda, M., De Giudici, G., 2023. An integrated geochemical and mineralogical investigation on soil-plant system of *Pinus halepensis* pioneer tree growing on heavy metal polluted mine tailing. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 157, 272-285, 10.1080/11263504.2022.2100502.

Kumar, V., Pandita, S., Singh Sidhu, G.P., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A.S., Setia, R., 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere* 262, 127810, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>.

Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1 - 18, 10.18637/jss.v025.i01.

- Leite, M.C.M., de Araujo, M.A., da Silva de Paiva, W., Camargos, L.S., Martins, A.R., 2022. Morphological responses and tolerance of a tree native to the Brazilian Cerrado *Astronium fraxinifolium* Schott to boron toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 29, 6900-6910, [10.1007/s11356-021-15710-8](https://doi.org/10.1007/s11356-021-15710-8).
- Li, X., Cao, Y., Xiao, J., Salam, M.M.A., Chen, G., 2022. Bamboo biochar greater enhanced Cd/Zn accumulation in *Salix psammophila* under non-flooded soil compared with flooded. *Biochar* 4, 7, [10.1007/s42773-022-00139-0](https://doi.org/10.1007/s42773-022-00139-0).
- Li, X., Xiao, J., Gai, X., Du, Z., Salam, M.M.A., Chen, G., 2023. Facilitated remediation of heavy metals contaminated land using *Quercus spp.* with different strategies: Variations in amendments and experiment periods. *Science of The Total Environment* 876, 163245, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163245>.
- Li, X., Xiao, J., Salam, M.M.A., Chen, G., 2022. Evaluation of dendroremediation potential of ten *Quercus spp.* for heavy metals contaminated soil: A three-year field trial. *Science of The Total Environment* 851, 158232, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158232>.
- Lins, C.E.L., Cavalcante, U.M.T., Sampaio, E.V.S.B., Messias, A.S., Maia, L.C., 2006. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. *Applied Soil Ecology* 31, 181-185, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.06.004>.
- Liu, Y., Zhou, J., Sun, D., Chen, H., Qin, J., Chen, G., Qiu, R., 2023. Polyaspartic acid assisted-phytoremediation of cadmium-contaminated farmland: Phytoextraction efficiency, soil quality, and rhizosphere microbial community. *Science of The Total Environment* 862, 160736, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160736>.
- Lucena, J.J., Hernandez-Apaolaza, L., 2017. Iron nutrition in plants: an overview. *Plant and Soil* 418, 1-4, [10.1007/s11104-017-3316-8](https://doi.org/10.1007/s11104-017-3316-8).
- Malavolta, E., 1980. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo, Ceres, 251p. (in Portuguese).
- Malavolta, E., 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira, 2. ed., ver. e atual. Piracicaba: Potafos (in Portuguese).
- Melkonian, J., Wolfe, D.W., Owens, T.G., 2005. Effects of elevated carbon dioxide on gas exchange and photochemical and nonphotochemical quenching at low temperature in tobacco plants varying in Rubisco activity. *Photosynthesis Research* 83, 63-74, [10.1007/s11120-004-3921-2](https://doi.org/10.1007/s11120-004-3921-2).
- Moreira, A., Moraes, L.A.C., de Melo, T.R., Heinrichs, R., Moretti, L.G., 2022. Chapter Five - Management of copper for crop production, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 257-298. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2022.02.005>.
- Myburg, A.A., Lev-Yadun, S., Sederoff, R.R., 2013. Xylem Structure and Function, *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001302.pub2>.
- Nijs, I., Ferris, R., Blum, H., Hendrey, G., Impens, I., 1997. Stomatal regulation in a changing climate: a field study using Free Air Temperature Increase (FATI) and Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant, Cell & Environment* 20, 1041-1050, [10.1111/j.1365-3040.1997.tb00680.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1997.tb00680.x).

- Ning, X., Lin, M., Huang, G., Mao, J., Gao, Z., Wang, X., 2023. Research progress on iron absorption, transport, and molecular regulation strategy in plants. *Frontiers in Plant Science* 14, <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1190768>.
- Nurhadi, N., Rianda, S., Irawan, C., Pramono, G.P., 2021. Biochar production investigation from pyrolysis of lamtoro wood as a coal blend for fuel substitution in steam power plants, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1 ed, 10.1088/1755-1315/749/1/012037.
- Oliveira, D.G., Carvalho, M.E.A., Silva, H.F., Brignoni, A.S., Lima, L.R., Camargos, L.S., Souza, L.A., 2021. *Lonchocarpus cultratus*, a Brazilian savanna tree, endures high soil Pb levels. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 50931-50940, 10.1007/s11356-021-15856-5.
- Parkinson, K.J., Day, W., Leach, J.E., 1980. A portable system for measuring the photosynthesis and transpiration of graminaceous leaves. *Journal of Experimental Botany* 31, 1441-1453, 10.1093/jxb/31.5.1441.
- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A., Smith, J.A.C., 2002. The Genetic Basis of Metal Hyperaccumulation in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 539-566, 10.1080/0735-260291044359.
- Printz, B., Lutts, S., Hausman, J.-F., Sergeant, K., 2016. Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics. *Frontiers in Plant Science* 7, 10.3389/fpls.2016.00601.
- Qu, H., Ma, C., Xiao, J., Li, X., Wang, S., Chen, G., 2021. Co-planting of *Quercus nuttallii*, *Quercus pagoda* with *Solanum nigrum* enhanced their phytoremediation potential to multi-metal contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 23, 1104-1112, 10.1080/15226514.2021.1878105.
- Rahman, M.M., Azirun, S.M., Boyce, A.N., 2013. Enhanced accumulation of copper and lead in amaranth (*Amaranthus paniculatus*), indian mustard (*Brassica juncea*) and sunflower (*Helianthus annuus*). *PLOS ONE* 8, e62941, 10.1371/journal.pone.0062941.
- Raij Van B, Andrade JC, Cantarela H, Quaggio, JÁ., 2001. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas, Instituto Agrônômico, p 285 (in Portuguese).
- Raij Van B., 1991. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba, Ceres, p 343 (in Portuguese).
- Rangel, W.M., Thijs, S., Janssen, J., Oliveira Longatti, S.M., Bonaldi, D.S., Ribeiro, P.R.A., Jambon, I., Eevers, N., Weyens, N., Vangronsveld, J., Moreira, F.M.S., 2017. Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 19, 142-156, 10.1080/15226514.2016.1207600.
- Revelle, W., 2023. psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research. Northwestern University, <https://CRAN.R-project.org/package=psych>.
- Santos, H.G.d., Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C.d., Oliveira, V.Á.d., Lumberras, J.F., Coelho, M.R., Almeida, J.A.d., Filho, J.C.d.A., Oliveira, J.B.d., Cunha, T.J.F., 2018.

Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 5. ed. rev. e ampl. ed. Embrapa, Brasília, DF, Brasil, <https://www.agroapi.cnptia.embrapa.br/portal/assets/docs/SiBCS-2018-ISBN-9788570358004.pdf>. (in Portuguese).

Sarma, H., Nava, A.R., Prasad, M.N.V., 2019. Mechanistic understanding and future prospect of microbe-enhanced phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental Technology and Innovation* 13, 318-330,10.1016/j.eti.2018.12.004.

Savale, S., Sanglikar, R., Sthool, V., Kadam, J., 2007. Effect of *Leucaena leucocephala* barriers and bund on erosion losses and yield of pearl millet+mothbean. *Asian Journal of Soil Science* 2, 142–145.

Schloerke, B., Cook, D., Larmarange, J., Briatte, F., Marbach, M., Thoen, E., Elberg, A., Crowley, J., 2021. GGally: Extension to 'ggplot2'. <https://CRAN.R-project.org/package=GGally>.

Schneider, J., Bundschuh, J., Rangel, W.d.M., Guilherme, L.R.G., 2017. Potential of different AM fungi (native from As-contaminated and uncontaminated soils) for supporting *Leucaena leucocephala* growth in As-contaminated soil. *Environmental Pollution* 224, 125-135, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.071>.

Schneider, J., Labory, C.R.G., Rangel, W.M., Alves, E., Guilherme, L.R.G., 2013. Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 262, 1245-1258, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.091>.

Scott, A.J., Knott, M., 1974. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30, 507-512, 10.2307/2529204.

Shi, X., Wang, S., He, W., Wang, Y., 2023. Lead accumulation and biochemical responses in *Rhus chinensis* Mill to the addition of organic acids in lead contaminated soils. *RSC Advances* 13, 4211-4221,10.1039/D2RA07466D.

Silva, F.C.d., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, Rio de Janeiro, Brasil, <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/330496>. (in Portuguese).

Singh, B., Kaur, B., Singh, D., 2020. Assessment of different multipurpose tree species for phytoextraction of lead from lead-contaminated soils. *Bioremediation Journal* 24, 215-230,10.1080/10889868.2020.1811634.

Singh, M.K., Singh, J., Kumar, M., Thakur, I.S., 2014. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 110, 92-99, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.010>.

Soil Survey Staff. 2022. Keys to Soil Taxonomy, 13th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, <https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-09/Keys-to-Soil-Taxonomy.pdf>.

Ssenku, J.E., Ntale, M., Backeus, I., Oryem-Origa, H., 2017. Phytoremediation Potential of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. for Heavy Metal-Polluted and Heavy Metal-Degraded Environments, in: Baudh, K., Singh, B., Korstad, J. (Eds.), *Phytoremediation*

Potential of Bioenergy Plants. Springer Singapore, Singapore, pp 189-209.10.1007/978-981-10-3084-0_7.

Suo, Y., Tang, N., Li, H., Corti, G., Jiang, L., Huang, Z., Zhang, Z., Huang, J., Wu, Z., Feng, C., Zhang, X., 2021. Long-term effects of phytoextraction by a poplar clone on the concentration, fractionation, and transportation of heavy metals in mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 47528-47539,10.1007/s11356-021-13864-z.

Team, R.C., 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, <https://www.R-project.org/>.

Teixeira, N.L., Caxito, F.A., Rosière, C.A., Pecoits, E., Vieira, L., Frei, R., Sial, A.N., Poitrasson, F., 2017. Trace elements and isotope geochemistry (C, O, Fe, Cr) of the Cauê iron formation, Quadrilátero Ferrífero, Brazil: Evidence for widespread microbial dissimilatory iron reduction at the Archean/Paleoproterozoic transition. *Precambrian Research* 298, 39-55, <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2017.05.009>.

Ullah, S., Liu, Q., Wang, S., Jan, A.U., Sharif, H.M.A., Ditta, A., Wang, G., Cheng, H., 2023. Sources, impacts, factors affecting Cr uptake in plants, and mechanisms behind phytoremediation of Cr-contaminated soils. *Science of The Total Environment* 899, 165726,<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165726>.

van der Brand, T.v.d., 2023. ggh4x: Hacks for 'ggplot2'. <https://CRAN.R-project.org/package=ggh4x>.

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil* 362, 319-334,10.1007/s11104-012-1287-3.

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil* 362, 319-334,10.1007/s11104-012-1287-3.

van der Ent, A., Rylott, E.L., 2024. Inventing hyperaccumulator plants: improving practice in phytoextraction research and terminology. *International Journal of Phytoremediation*, 1-4,10.1080/15226514.2024.2322631.

Walter, W., Sanchez-Cabo, F., Ricote, M., 2015. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*.

Wickham, H., 2011. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software* 40, 1 - 29,10.18637/jss.v040.i01.

Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Wickham, H., Bryan, J., 2023. readxl: Read Excel Files. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>.

Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., Vaughan, D., 2023. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.

Wilke, C.O., 2020. Cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'. <https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>.

- Wu, C., Luo, Y., Zhang, L., 2010. Variability of copper availability in paddy fields in relation to selected soil properties in southeast China. *Geoderma* 156, 200-206,<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.02.018>.
- Wu, Z., Fernandez-Lima, F.A., Russell, D.H., 2010. Amino acid influence on copper binding to peptides: Cysteine versus arginine. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21, 522-533,[10.1016/j.jasms.2009.12.020](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.12.020).
- Xu, S., Chen, M., Feng, T., Zhan, L., Zhou, L., Yu, G., 2021. Use ggbreak to Effectively Utilize Plotting Space to Deal With Large Datasets and Outliers. *Frontiers in Genetics* 12,[10.3389/fgene.2021.774846](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.774846).
- Yasin, M.U., Haider, Z., Munir, R., Zulfiqar, U., Rehman, M., Javaid, M.H., Ahmad, I., Nana, C., Saeed, M.S., Ali, B., Gan, Y., 2024. The synergistic potential of biochar and nanoparticles in phytoremediation and enhancing cadmium tolerance in plants. *Chemosphere* 354, 141672,<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141672>.
- Yruela, I., 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology* 36, 409-430,<https://doi.org/10.1071/FP08288>.
- Yusuff, A.S., 2019. Adsorption of hexavalent chromium from aqueous solution by *Leucaena leucocephala* seed pod activated carbon: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences* 26, 89-102,[10.1080/25765299.2019.1567656](https://doi.org/10.1080/25765299.2019.1567656).
- Yusuff, A.S., 2021. Parametric optimization of solvent extraction of *Jatropha curcas* seed oil using design of experiment and its quality characterization. *South African Journal of Chemical Engineering* 35, 60-68,[10.1016/j.sajce.2020.11.006](https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.11.006).
- Zhang, B., Zhang, C., Liu, C., Jing, Y., Wang, Y., Jin, L., Yang, L., Fu, A., Shi, J., Zhao, F., Lan, W., Luan, S., 2018. Inner Envelope CHLOROPLAST MANGANESE TRANSPORTER 1 Supports Manganese Homeostasis and Phototrophic Growth in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 11, 943-954,<https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.04.007>.
- Zhang, B.B., Xu, J.L., Zhou, M., Yan, D.H., Ma, R.J., 2018. Effect of light quality on leaf photosynthetic characteristics and fruit quality of peach (*Prunus persica* L. Batch). *Photosynthetica* 56, 1113-1122, [10.1007/s11099-018-0820-x](https://doi.org/10.1007/s11099-018-0820-x).
- Zhang, K., Liu, F., Zhang, H., Duan, Y., Luo, J., Sun, X., Wang, M., Ye, D., Wang, M., Zhu, Z., Li, D., 2024. Trends in phytoremediation of heavy metals-contaminated soils: A Web of science and CiteSpace bibliometric analysis. *Chemosphere* 352, 141293,<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141293>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui apresentados contribuem muito para o conhecimento das respostas fisiológicas frente aos estresses por altas concentrações de cobre e ferro ao longo do ciclo da planta, principalmente por ferro, que dificilmente se encontra na literatura de forma biodisponível no solo, sem estar atrelado a uma co-contaminação ou contaminação múltipla de elementos. As respostas na concentração de pigmentos fotossintetizantes e nas trocas gasosas são importantes para avaliar a tolerância de espécies vegetais expostas a cada elemento potencialmente tóxico (EPT). A dinâmica de disponibilidade EPT varia de elemento para elemento e das condições e tipos de solo. Essa dinâmica deve ser investigada caso a caso (elemento + solo), e não só isso, como também a relação de determinada espécie com esse sistema: solo + EPT + espécie.

Os micronutrientes: cobre e ferro em concentrações elevadas no solo podem ser caracterizados como elementos potencialmente tóxicos para espécies vegetais. De acordo com a Lista de Valores Orientadores para Solo e Água Subterrânea (CETESB, 2021), o valor de prevenção (VP) e o valor de intervenção (VI) em solo agrícola para cobre é de 60 e 760 mg kg⁻¹ peso seco de solo, respectivamente. Para ferro não existem valores orientadores tampouco valor de intervenção (CETESB, 2021). A partir deste trabalho, podemos concluir com base na tolerância de duas espécies de leguminosas, herbácea e uma arbórea, concentrações limites de biodisponibilidade de cobre e ferro no solo. Concentração superior a 87,80 mg kg⁻¹ de cobre no solo afeta a tolerância e o crescimento de *Canavalia ensiformis* e *L. leucocephala*. Concentração superior a 80,46 mg kg⁻¹ de ferro no solo afeta a tolerância e o crescimento de *L. leucocephala*. Trabalhos como esse e estes resultados (tolerância e concentração biodisponível limite) podem ser utilizados como referência para estudos futuros ou para servirem de referência a valores orientadores.

Este trabalho aponta uma discussão importante a respeito do tempo de cultivo ou tempo de condução experimental de espécies arbóreas submetidas a estresse por EPTs em condições controladas ou em campo. O acúmulo de ferro nas plantas de *L. leucocephala* não acompanha o acúmulo de biomassa ao longo do tempo, isto é, mesmo que a biomassa da planta aumente ao longo de 24 meses, o acúmulo de ferro não aumenta. Podemos inferir que após um certo período, a planta cessa a absorção e o acúmulo de ferro, o que possivelmente é uma estratégia para sua sobrevivência ou pelas características de disponibilidade de ferro no solo: a biodisponibilidade do ferro no solo é baixa para as plantas e essa parece ser uma explicação mais plausível para o acúmulo ao longo do tempo. Já a biodisponibilidade de cobre no solo é alta e ao longo do tempo as plantas absorvem e acumulam cobre em seus órgãos, por essa razão

o acúmulo de biomassa de *L. leucocephala* é afetado proporcionalmente ao tempo de exposição ao cobre e ao seu acúmulo. Devido à alta biodisponibilidade de cobre para as plantas, o cobre foi o EPT mais prejudicial ao crescimento de *C. ensiformis*, não apresentando tolerância a concentração superior a 87,80 mg de Cu kg⁻¹ de solo.

APÊNDICE A- Determinação do teor semi-total de Cu e Fe no solo - método EPA3051A

Para determinação do teor semi-total de Cu e Fe no solo (ambientalmente disponível) utilizou-se o método EPA3051A (US-EPA, 2007), cuja amostra de solo (50 g em 25 ml de extrato) sofreu digestão por ácido nítrico (65% m/m) em forno de micro-ondas. O extrato resultante foi ajustado para 25 ml com água mili-Q que foi usada para detectar a concentração dos elementos e as determinações foram lidas em espectrômetro de ICP-OES. A estimativa do limite de quantificação de Cu e Fe, em solo, foi de 1,5 e 18 mg kg⁻¹, respectivamente. A marca e modelo do ICP-OES e do sistema de micro-ondas foram: Varian, modelo ES710A e CEM Corporation, modelo MARS 5, respectivamente. O espectrômetro de ICP foi ajustado para as linhas espectrais de Cu e Fe: a 327.395 e 238.204 nm, respectivamente.

Referência:

U.S. EPA. 2007. “Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils,” Revision 1. Washington, DC, <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3051a.pdf>.

APÊNDICE B- TABELA 3

Tabela 3: Média e erro padrão ($\pm$) da concentração biodisponível e semi- total de cobre e ferro no solo antes do cultivo de *Canavalia ensiformis*.

Concentração biodisponível (Mehlich1) e semi- total (EPA3051) de Cu e Fe no solo antes do cultivo de *Canavalia ensiformis*

TEC	Mehlich1 (mg kg ⁻¹)	EPA3051 (mg kg ⁻¹)
Tratamento	Cu	
T0	0,58 $\pm$ 0,02	1,77 $\pm$ 0,32
T50	28,28 $\pm$ 1,28	29,08 $\pm$ 1,36
T150	87,80 $\pm$ 1,67	92,86 $\pm$ 4,86
T250	141,97 $\pm$ 7,86	145,56 $\pm$ 2,67
T350	220,36 $\pm$ 2,30	189,43 $\pm$ 12,28
Tratamento	Fe	
T0	40,91 $\pm$ 0,58	5824,07 $\pm$ 933,07
T50	56,26 $\pm$ 0,53	4653,33 $\pm$ 706,27
T150	83,74 $\pm$ 1,40	8809,45 $\pm$ 1134,16
T250	113,19 $\pm$ 0,88	5718,92 $\pm$ 1169,29
T350	141,80 $\pm$ 2,26	7271,51 $\pm$ 689,60

APÊNDICE C - TABELA 4

Tabela 4: Média e erro padrão ($\pm$) da concentração biodisponível e semi- total de cobre e ferro no solo antes do cultivo de *L. leucocephala*, aos 12 e 24 meses.

Concentração biodisponível (Mehlich1) e semi- total (EPA3051) de Cu e Fe no solo antes do cultivo de <i>L. leucocephala</i>				
Extração	Mehlich		EPA3051	
Tempo	12 meses (mg kg ⁻¹)	24 meses (mg kg ⁻¹)	12 meses (mg kg ⁻¹)	24 meses (mg kg ⁻¹)
Tratamento	Cu		Cu	
T0	0,72 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,00	1,58 $\pm$ 0,16	1,58 $\pm$ 0,16
T50	27,40 $\pm$ 0,79	34,02 $\pm$ 0,73	32,80 $\pm$ 0,65	38,69 $\pm$ 1,30
T150	73,81 $\pm$ 1,56	113,41 $\pm$ 3,86	104,82 $\pm$ 3,44	115,47 $\pm$ 5,44
T250	151,61 $\pm$ 2,38	187,81 $\pm$ 3,58	181,54 $\pm$ 4,70	190,81 $\pm$ 8,41
T350	183,41 $\pm$ 8,81	277,95 $\pm$ 4,37	244,39 $\pm$ 7,13	242,33 $\pm$ 5,77
Tratamento	Fe		Fe	
T0	22,98 $\pm$ 2,94	22,98 $\pm$ 2,94	5696,10 $\pm$ 787,98	5672,54 $\pm$ 781,64
T50	74,61 $\pm$ 1,25	74,61 $\pm$ 1,25	5926,69 $\pm$ 636,54	5455,12 $\pm$ 826,98
T150	67,19 $\pm$ 13,16	67,19 $\pm$ 13,16	5724,29 $\pm$ 933,23	6601,08 $\pm$ 843,08
T250	76,93 $\pm$ 4,02	76,93 $\pm$ 4,02	6082,52 $\pm$ 1203,37	6407,17 $\pm$ 861,51
T350	80,46 $\pm$ 3,72	80,46 $\pm$ 3,72	6476,32 $\pm$ 298,67	6534,99 $\pm$ 304,36

APÊNDICE D - TABELA 5

Tabela 5: Média e erro padrão ($\pm$) da concentração biodisponível do elemento no solo- TEC_{soil} (mg kg^{-1}); pH, matéria orgânica- MO (g dm^{-3}) e concentração biodisponível do elemento antes do cultivo de *L. leucocephala* - CBC, em 10 dm^3 de solo (mg), em cada tratamento, separados em 12 e 24 meses.

Antes do cultivo de <i>L. leucocephala</i>								
Tempo	12 meses				24 meses			
	TEC (mg kg^{-1})	CBC (mg/vaso)	pH	MO (g dm^{-3})	TEC (mg kg^{-1})	CBC (mg/vaso)	pH	MO (g dm^{-3})
Tratamento	Cu							
T0	$0,72 \pm 0,03$	$10,53 \pm 0,39$	$4,90 \pm 0,03$	$14,00 \pm 0,31$	$0,51 \pm 0,00$	$7,49 \pm 0,03$	$4,80 \pm 0,03$	$13,00 \pm 0,31$
T50	$27,40 \pm 0,79$	$402,85 \pm 11,65$	$5,00 \pm 0,03$	$13,00 \pm 0,31$	$34,02 \pm 0,73$	$500,04 \pm 10,74$	$5,00 \pm 0,03$	$13,00 \pm 0,31$
T150	$73,81 \pm 1,56$	$1085,03 \pm 22,97$	$4,80 \pm 0,03$	$14,00 \pm 0,31$	$113,41 \pm 3,86$	$1667,19 \pm 56,76$	$4,80 \pm 0,03$	$13,00 \pm 0,31$
T250	$151,61 \pm 2,38$	$2228,66 \pm 34,96$	$4,80 \pm 0,03$	$16,00 \pm 0,31$	$187,81 \pm 3,58$	$2760,79 \pm 52,68$	$4,80 \pm 0,03$	$13,00 \pm 0,31$
T350	$183,41 \pm 8,81$	$2696,12 \pm 129,52$	$4,70 \pm 0,03$	$14,00 \pm 0,31$	$277,95 \pm 4,37$	$4085,89 \pm 64,26$	$4,70 \pm 0,03$	$13,00 \pm 0,31$
Tratamento	Fe							
T0	$22,98 \pm 2,94$	$278,57 \pm 43,18$	$5,40 \pm 0,11$	$13,00 \pm 0,30$	$22,98 \pm 2,94$	$278,57 \pm 43,18$	$5,30 \pm 0,11$	$13,00 \pm 0,30$
T50	$74,61 \pm 1,25$	$396,90 \pm 18,40$	$5,20 \pm 0,11$	$12,00 \pm 0,30$	$74,61 \pm 1,25$	$396,90 \pm 18,40$	$5,30 \pm 0,11$	$13,00 \pm 0,30$
T150	$67,19 \pm 13,16$	$600,74 \pm 34,41$	$4,80 \pm 0,11$	$13,00 \pm 0,30$	$67,19 \pm 13,16$	$600,74 \pm 34,41$	$4,90 \pm 0,11$	$13,00 \pm 0,30$
T250	$76,93 \pm 4,02$	$1133,72 \pm 59,13$	$4,70 \pm 0,11$	$13,00 \pm 0,30$	$76,93 \pm 4,02$	$1133,72 \pm 59,13$	$4,70 \pm 0,11$	$15,00 \pm 0,30$
T350	$80,46 \pm 3,72$	$1182,70 \pm 54,75$	$4,50 \pm 0,11$	$15,00 \pm 0,30$	$80,46 \pm 3,72$	$1182,70 \pm 54,75$	$4,50 \pm 0,11$	$13,00 \pm 0,30$

APÊNDICE E – TABELA 6

Tabela 6: Média e erro padrão ($\pm$) da concentração biodisponível do elemento no solo- TEC_{soil} ($mg\ kg^{-1}$); pH, matéria orgânica- MO ($g\ dm^{-3}$) e concentração biodisponível do elemento depois do cultivo de *L. leucocephala* - CAC, em $10\ dm^3$ de solo (mg), em cada tratamento, separados em 12 e 24 meses.

Depois do cultivo de <i>L. leucocephala</i>								
Tempo	12 meses				24 meses			
	TEC ($mg\ kg^{-1}$)	CAC (mg/vaso)	pH	MO ($g\ dm^{-3}$)	TEC ($mg\ kg^{-1}$)	CAC (mg/vaso)	pH	MO ($g\ dm^{-3}$)
Tratamento	Cu							
T0	$0,77 \pm 0,02$	$11,29 \pm 0,26$	$6,50 \pm 0,07$	$12,00 \pm 0,29$	$0,50 \pm 0,05$	$7,32 \pm 0,67$	$6,10 \pm 0,07$	$10,00 \pm 0,29$
T50	$25,30 \pm 0,65$	$371,98 \pm 9,59$	$6,70 \pm 0,07$	$12,00 \pm 0,29$	$28,81 \pm 1,60$	$423,45 \pm 23,50$	$6,70 \pm 0,07$	$11,00 \pm 0,29$
T150	$75,94 \pm 2,48$	$1116,26 \pm 36,40$	$6,70 \pm 0,07$	$12,00 \pm 0,29$	$95,13 \pm 2,26$	$1398,36 \pm 33,25$	$6,40 \pm 0,07$	$11,00 \pm 0,29$
T250	$137,92 \pm 18,40$	$2027,36 \pm 270,43$	$6,80 \pm 0,07$	$13,00 \pm 0,29$	$148,53 \pm 6,14$	$2183,36 \pm 90,23$	$6,30 \pm 0,07$	$12,00 \pm 0,29$
T350	$239,19 \pm 8,47$	$3516,06 \pm 124,53$	$6,60 \pm 0,07$	$13,00 \pm 0,29$	$224,88 \pm 9,76$	$3305,66 \pm 143,53$	$6,80 \pm 0,07$	$12,00 \pm 0,29$
Tratamento	Fe							
T0	$58,06 \pm 6,74$	$769,03 \pm 99,07$	$6,60 \pm 0,06$	$12,00 \pm 0,16$	$95,38 \pm 9,95$	$1431,41 \pm 146,28$	$6,70 \pm 0,06$	$11,00 \pm 0,16$
T50	$111,11 \pm 6,91$	$937,88 \pm 101,64$	$6,70 \pm 0,06$	$12,00 \pm 0,16$	$118,45 \pm 11,15$	$1642,00 \pm 163,92$	$6,90 \pm 0,06$	$11,00 \pm 0,16$
T150	$75,25 \pm 8,47$	$1661,75 \pm 124,50$	$6,40 \pm 0,06$	$12,00 \pm 0,16$	$117,88 \pm 13,04$	$1617,38 \pm 191,73$	$6,70 \pm 0,06$	$12,00 \pm 0,16$
T250	$76,93 \pm 9,19$	$1604,94 \pm 135,14$	$6,40 \pm 0,06$	$12,00 \pm 0,16$	$124,63 \pm 11,11$	$1832,06 \pm 163,34$	$6,70 \pm 0,06$	$11,00 \pm 0,16$
T350	$80,46 \pm 9,49$	$1419,78 \pm 139,56$	$6,40 \pm 0,06$	$12,00 \pm 0,16$	$113,84 \pm 4,07$	$1673,41 \pm 59,87$	$6,80 \pm 0,06$	$11,00 \pm 0,16$

APÊNDICE F - FIGURA 14

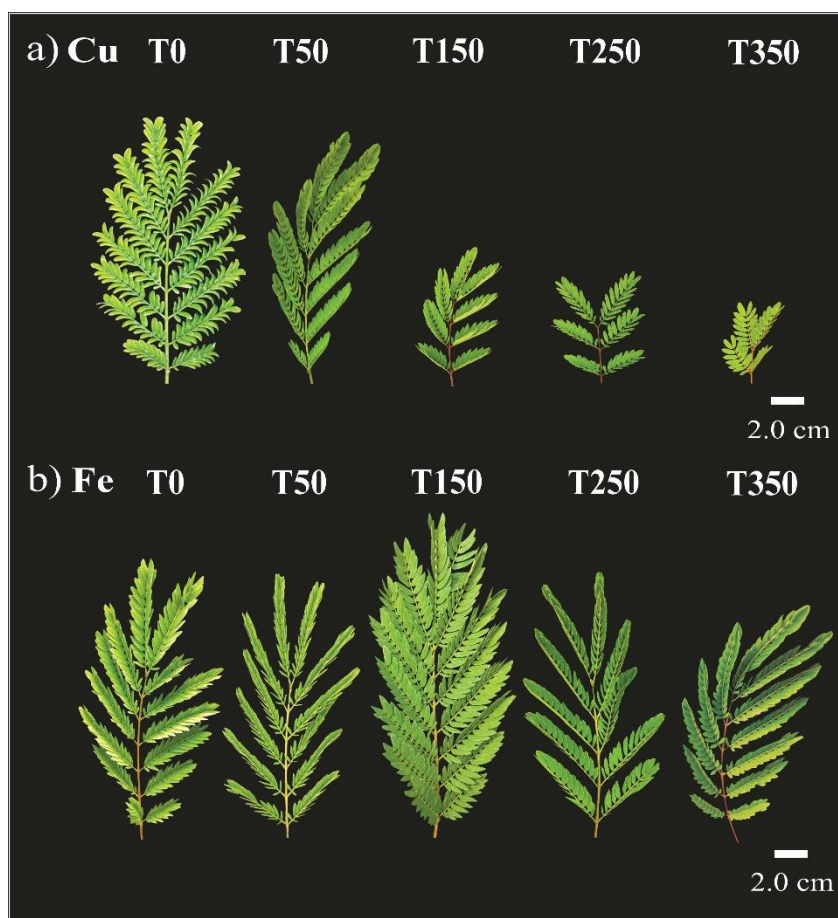


Fig.14: Folioles de *L. leucocephala* subjected to Fe treatments in the soil at 24 months of cultivation. The treatments added, in addition to the control, were: 50; 150; 250 and 350 mg dm⁻³ of soil in a greenhouse.