UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal

Tese

Alterações bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais em sementes e plantas de tomate expostas ao chumbo

Caroline Leivas Moraes

Pelotas, 2011

Caroline Leivas Moraes

Alterações bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais em sementes e plantas de tomate expostas ao chumbo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. PhD. Nei Fernandes Lopes

Co-orientadores: Prof. Dr. Dario Munt de Moraes

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

L827p Moraes, Caroline Leivas

Alterações bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais em sementes e plantas de tomate expostas ao chumbo / Caroline Leivas Moraes ; orientador Nei Fernandes Lopes; co-orientadores Dario Munt de Moraes e Luciano do Amarante. - Pelotas, 2011- 70f. : il..- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1. Acetato de chumbo 2.Qualidade fisiológica 3.Enzimas antioxidantes 4.Trocas gasosas I. Lopes, Nei Fernandes (orientador) II.Título.

CDD 635.642

Banca Examinadora:

Prof. PhD. Nei Fernandes Lopes

Prof. Dr. José Antônio Peters

Profª. Dra. Eugênia Jacira Bolacel Braga

Prof. Dr. Paulo Celso de Mello Farias

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ilumina me protege e me acompanha em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por disponibilizar a estrutura física, corpo docente que possibilitaram a realização do nível de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

Ao meu orientador, professor Nei Fernandes Lopes, pela orientação, dedicação, respeito, confiança, valiosos ensinamentos e amizade ao longo dos seis anos de convívio.

Ao professor e co-orientador, Dario Munt de Moraes, pelos ensinamentos, pela amizade e paciência, além da preciosa e indispensável colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Juliana Aparecida Fernando e ao amigo e colega Sidnei Deuner pela amizade e indispensável contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Ao co-orientador Luciano do Amarante e ao professor Marcos Antônio Bacarin, pelas sugestões e colaboração no desenvolvimento deste trabalho de tese.

Ao pesquisador Luis Antônio Suita de Castro (EMBRAPA-Clima Temperado) pela contribuição no desenvolvimento dos trabalhos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação pelos ensinamentos.

À minha família por todo apoio, suporte, incentivo e crédito em meu trabalho.

Ao meu noivo Cássio Cassal Brauner pelo apoio durante todo o doutorado, além de seu carinho, companheirismo e muito amor que me deram força em todos os momentos desta etapa.

A todos os funcionários pela ótima convivência, auxílio e amizade.

Às amigas e colegas Patrícia Marini, Cristina Larré e Milene Galho, pela amizade sincera, pela ajuda imprescindível que me ofereceram ao longo de todo o trabalho, mas acima de tudo pelos momentos de descontração, carinho e apoio que sempre me deram suporte e força para seguir em frente.

À colega e amiga Emanuela Martinazzo pela agradável convivência, sugestões e ajuda incondicional durante o desenvolvimento dos experimentos.

Aos demais colegas do curso pela amizade e ótimos momentos.

RESUMO

MORAES, Caroline Leivas. **Alterações bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais em sementes e plantas de tomate expostas ao chumbo.** 2011. 70f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O chumbo (Pb) é um metal potencialmente tóxico, podendo ser adicionado aos solos por meio de fertilizantes fosfatados, resíduos industriais e lodo de esgoto. Portanto, objetivo desta pesquisa foi avaliar alterações induzidas pelas diferentes concentrações de acetato de chumbo nas características fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais de sementes e plantas de tomate. O experimento foi dividido em duas etapas, onde na primeira avaliou-se o efeito do metal no potencial fisiológico das sementes e crescimento inicial das plântulas, teores de clorofila, carotenóides e alterações ultraestruturais. Para tanto, sementes de tomate foram submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5 e 0,75mM). Na segunda etapa, plantas cultivadas por 30 dias em casa de vegetação foram transplantas para vasos plásticos e mantidas em sala de crescimento climatizada. Após um período de 14 dias, foram realizadas quatro aplicações das diferentes concentrações de Pb, as quais eram intercaladas com solução nutritiva. Quatro avaliações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram determinadas e, ao final do experimento, determinou-se a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutationa redutase, peroxidação lipídica e conteúdo de H_2O_2, bem como as características de crescimento. Os resultados permitiram verificar que o acetato de chumbo reduziu a viabilidade das sementes e causou redução nas características de crescimento, além de distorções nos tilacoides dos cloroplastos e na quantidade e tamanho dos grãos de amido. Os teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides foram drasticamente afetados pelo acetato de chumbo. Quanto à assimilação de CO_2, condutância estomática e transpiração, houve decréscimo significativo para todas as variáveis, bem como nas características de crescimento, sendo o sistema radical mais sensível ao metal. Em relação ao sistema de enzimas antioxidante, em geral, houve aumento na atividade das enzimas analisadas, porém não o suficiente para impedir peroxidação lipídica das membranas. Logo, pode-se concluir que o acetato de chumbo reduz a qualidade fisiológica das sementes de tomate. Nas plantas, tem efeito direto na fase bioquímica da fotossíntese por induzir o fechamento estomático, diminuindo consideravelmente a entrada de CO_2 para o interior mesofilo.

Palavras-chave: Acetato de chumbo. Qualidade fisiológica. Enzimas antioxidantes. Trocas gasosas.

ABSTRACT

MORAES, Caroline Leivas. **Biochemical, physiological, and ultrastructural changes in seeds and tomato plants exposed to lead.** 2011. 70f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Lead (Pb) is a potentially toxic metal, it can be added to soils via phosphate fertilizers, industrial waste and sewage sludge. Therefore, the purpose of this research was to evaluate the changes induced by different concentrations of lead acetate in physiological characteristics, biochemical and ultrastructural of seeds and tomato plants. The experiment was divided into two trials, where the first evaluated the effect of metal on the physiological potential of seeds and initial seedling growth, chlorophyll, carotenoids and ultrastructural alterations. In the first trial tomato seeds were exposed to different concentrations of lead acetate (zero; 0,25; 0,5 and 0,75mM). In the second trial, plants grown for 30 days in a greenhouse were transplanted to plastic pots and kept in climate-controlled growth room. After a period of 14 days, there were four applications of different concentrations of lead acetate, which were irrigated with nutrient solution. Four evaluations of gas exchange and chlorophyll a fluorescence were determined, and at the end of the experiment, there were measured the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, lipid peroxidation and H_2O_2 content, as well as the growth characteristics. Results demonstrated that lead acetate reduced the seed viability and caused a reduction in growth characteristics, and distortions in the thylakoids of chloroplasts and the amount and size of starch grains. The content of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids were dramatically affected by lead acetate. In CO_2 assimilation, stomatal conductance and transpiration, there was a significant decrease for all variables, as well as on growth characteristics, and the root system was more sensitive to the metal. Regarding the antioxidant enzyme system in general, there was an increased activity of the enzymes analyzed, but not enough to prevent lipid peroxidation of membranes. In conclusion, lead acetate reduces the physiological quality of tomato seeds. In plants, it has direct effects on the biochemical phase of photosynthesis by inducing stomatal closure, reducing considerably the input of CO_2 into the interior mesophyll.

Palavras-chave: Lead acetate. Physiological quality. Antioxidant enzymes. Gas exchange.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A = taxa assimilatória líquida

ASA = ascorbato

ALA = δ-aminolevulínico

ALAD = δ-aminolevulínico desidratase

APX = ascorbato peroxidase

ATP = adenosina trifosfato

CAT = catalase

CE = condutividade elétrica

$CdCl_2$ = cloreto de cádmio

DAS = dias após a semeadura

DHA = dehidroascorbato

E% = porcentagem de emergência

EROs = espécies reativas de oxigênio

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

GR = glutationa redutase

gs = condutância estomática

GSH = glutationa reduzida

GSSG = glutationa oxidada

H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

IVE = índice de velocidade de emergência

IVG = índice de velocidade de germinação

KI = iodeto de potássio

MDA = malonaldeído

MDHA = monodehidroascorbato

NADPH = nicotinamida adenina dinocleotídeo fosfato reduzida

NBT = azul de nitro tetrazólio

O_2 = oxigênio molecular

$O_2^{\bullet -}$ = radical superóxido

$^1O_2$ = oxigênio singlet

OH• = radical hidroxila

FSII = fotossistema II

PCG = primeira contagem de germinação

p- NP = p- nitrofenol

PVPP = polivinil polipirrolidona

SH = grupo sulfidril

SOD = superóxido dismutase

TBA = ácido tiobarbitúrico

TCA = ácido tricloroacético

Tr = taxa de transpiração

TRE = taxa de transporte de elétrons

ΦPS2 = rendimento quântico efetivo do FSII

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL....10

CAPÍTULO 1....16

MODIFICAÇÕES NA QUALIDADE DE SEMENTES E ULTRAESTRUTURAIS DE PLÂNTULAS DE TOMATE INDUZIDAS PELO CHUMBO....16

1. INTRODUÇÃO....17

2. MATERIAL E MÉTODOS....19

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO....23

4. CONCLUSÕES....37

CAPÍTULO 2....38

ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E ANTIOXIDANTE DE PLANTAS DE TOMATE EXPOSTAS AO CHUMBO....38

1. INTRODUÇÃO....39

2. MATERIAL E MÉTODOS....41

3. RESULTADOS....44

4. DISCUSSÃO....51

5. CONCLUSÕES....57

CONSIDERAÇÕES FINAIS....58

REFERÊNCIAS....59

INTRODUÇÃO GERAL

A degradação do ambiente é resultante da atividade humana desde vários séculos até o presente, mas somente há poucas décadas o homem começou a preocupar-se com o impacto dos poluentes sobre as próximas gerações.

Atualmente, como resultado da atividade humana, as plantas e sementes estão mais expostas a quantidades enormes de produtos potencialmente danosos. A extensão em que as funções vitais dos vegetais são afetadas pelos poluentes, e se há dano visível, dependem de muitos fatores, tanto bióticos como abióticos. Dentre os diversos fatores, os mais importantes a serem considerados são a espécie, a forma de crescimento, a idade, as condições climáticas e edáficas, as propriedades químicas e a concentração do poluente, bem como o momento e a duração do mesmo (LARCHER, 2000). Fatores, tais como estádio de desenvolvimento da planta, tempo de exposição ao metal e as diferentes espécies químicas dos elementos, podem também interferir nesses aspectos, refletindo nos teores dos poluentes nas diferentes partes da planta (ALLOWAY; AYRES, 1997).

O termo metal pesado é aplicado a um grupo heterogêneo de elementos químicos que possuem densidade superior a 5 g cm^{-3} (SEREGIN; IVANOV, 2001). Dos 90 elementos químicos que ocorrem naturalmente 53 são metais pesados. Entre estes metais, ferro (Fe), molibdênio (Mo), manganês (Mn), zinco (Zn) e cobre (Cu) são importantes como micronutrientes, enquanto níquel (Ni), cobalto (Co), vanádio (Va) e cromo (Cr) são elementos tóxicos, com maior ou menor importância como elementos traços. Por outro lado, prata (Ag), arsênio (As), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb) não têm função conhecida como

nutrientes, sendo mais ou menos tóxicos para as plantas, sementes e microorganismos (BENAVIDES et al., 2005).

As plantas necessitam de água, macronutrientes e micronutrientes para sobreviver e absorvem, principalmente pelas raízes, os elementos metálicos que estão no solo e na água. Em microquantidades alguns elementos metálicos são necessários para obtenção de uma planta saudável, tendo a sua absorção facilitada por mecanismos próprios de transporte e acumulação, no entanto, as plantas não conseguem evitar totalmente a entrada de metais tóxicos pelo mesmo mecanismo.

Teores fitotóxicos de metais não são ocasionalmente encontrados sob condições naturais, porém o crescente emprego de fertilizantes e pesticidas no solo, aliado ao aumento das atividades industriais e de mineração, são os principais responsáveis pela contaminação do solo, cursos de água e lençol freático por metais pesados (MALAVOLTA, 1994). Adubos utilizados para suprir micronutrientes, possuem uma composição, que além dos elementos desejáveis, também, em geral, contém metais pesados tóxicos como cádmio, chumbo e o cromo, que são indesejáveis à cadeia produtiva causando uma contaminação cumulativa nos solos.

A presença de metais pesados pode causar mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e estruturais nas plantas. A inibição do crescimento das raízes é um dos principais bioindicadores para estudos de fitotoxicidade de compostos orgânicos (CAMPBEL et al., 1995). Redução no conteúdo de clorofila em macrófitas aquáticas, cujas raízes foram expostas a substâncias potencialmente tóxicas demonstraram relação direta com a dose aplicada (POWELL et al., 1996).

Segundo ATSDR (2006), existe nos Estados Unidos, uma lista contendo 275 substâncias orgânicas e inorgânicas consideradas perigosas, que se baseia na combinação de sua freqüência, toxicidade e potencial de exposição humana. Nesta lista o chumbo está presente em segundo lugar.

O chumbo é um metal potencialmente tóxico para animais e plantas, pode ser adicionado aos solos por meio de fertilizantes fosfatados, calcários, resíduos industriais, compostos orgânicos provenientes da reciclagem de lixo urbano e lodo de esgoto (AMARAL SOBRINHO et al., 1992; KABATA PENDIAS; PENDIAS, 1992; CRAVO et al., 1998). No passado, este metal foi utilizado em encanamento

de água potável e soldas; ultimamente para cobrir cabos elétricos, isolante para equipamentos de raios-X, pigmento de tinta, componente de baterias, aditivo na gasolina e pesticidas (MAGNUS, 1994; ALLOWAY; AYRES, 1997; TAN, 2000). Além disso, é utilizado como munição para caça, e as balas depositadas no solo quando ingeridas pelos pássaros, os levam à morte por intoxicação (BAIRD, 2001). Pelo fato de não existir naturalmente em nenhum organismo, tão pouco desempenhar funções nutricionais ou bioquímicas em microorganismos, plantas, animais ou seres humanos, a presença desse metal no organismo é prejudicial em qualquer concentração. A população mundial vem enfrentando grave problema de contaminação do solo e do ar, causada pelo acúmulo deste metal. O chumbo pode ser ingerido por meio de alimentos sólidos e líquidos contaminados e sua tocixidade gera desde efeitos clínicos, até efeitos bioquímicos. Também, os sistemas gastrintestinais e reprodutivos são alvo da intoxicação pelo chumbo (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

A contaminação de solos com chumbo é um processo acumulativo praticamente irreversível aumentando, assim, os teores desse metal na superfície do solo (WALLACE; WALLACE, 1994). Suas concentrações no solo podem variar, sendo considerado como alerta valores próximos a 72mg kg^{-1} e de 180, 300 e 900mg kg^{-1} para intervenção de área agrícola, residencial e industrial, respectivamente (CETESB, 2007). Os valores de toxicidade também são bastante variáveis entre as espécies de plantas. Concentrações entre 30 e 300mg kg^{-1} de chumbo na massa seca são consideradas tóxicas para as plantas (KABATA-PENDIAS, 2000). Em plantas de girassol o acúmulo de 71mg kg^{-1} de chumbo causam sintomas de toxidez (PEREIRA, 2005).

A absorção do chumbo pelas plantas ocorre na forma bivalente (Pb^{2+}) e por mecanismo passivo, sendo absorvido por pêlos radiculares (KABATA-PENDIAS ; PENDIAS, 2000). Porém, a forma de distribuição do chumbo nas plantas é muito variável, dependendo da espécie e das condições do ambiente em que a planta está inserida. Por ser o metal pesado menos móvel há maior acúmulo nas raízes de plantas que crescem em solos ou soluções contaminadas, mas ocorrendo maior acúmulo na parte aérea de plantas que estão submetidas à poluição do ar contaminado por este metal.

O elevado acúmulo de chumbo nas raízes pode estar relacionado com a imobilização desse elemento por meio de polímeros orgânicos insolúveis (KAHLE,

1993). A parte da raiz em crescimento é coberta por uma mucilagem que é excretada pela coifa. A habilidade da mucilagem em se ligar aos metais pesados e consequentemente retardar sua entrada nas raízes depende diretamente da afinidade do metal com os grupos funcionais constituintes da mucilagem (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008). Os íons de chumbo possuem alta afinidade com esses grupos e a forte ligação desse metal com os compostos da mucilagem restringe seu influxo para as células das raízes, atuando como uma importante barreira ao metal (SEREGIN et al., 2004). Em *Picea abies*, o teor de chumbo nas raízes é cerca de dez vezes maior que no caule (MARSCHNER et al., 1996).

O chumbo liga-se fortemente a grupos carboxil da parede celular ou pode atravessar a membrana plasmática, através dos canais de cálcio (SINGH et al., 1997) e ser complexado por várias substâncias (fitoquelatinas e metalotioneínas), sendo estes os principais mecanismos de detoxificação para este metal (ANTOSIEWICZ; WIERZBICKA, 1999). Porém, quando estes mecanismos de defesa não são suficientes para evitar a toxicidade, podem ocorrer alterações no metabolismo da planta.

Dentre os sintomas de toxidez causados pelo chumbo estão incluídos redução na porcentagem de germinação, o qual depende da estrutura da semente, decréscimos no índice de velocidade de germinação e no crescimento inicial das plântulas (MISHRA; CHOUDHARI, 1998).

Em termos nutricionais, o chumbo reduz a concentração de vários elementos essenciais às plantas. Isto ocorre pelo fato deste metal competir com outros cátions, como cálcio, magnésio, cobre, ferro e potássio (SHARMA; DUBEY, 2005). Em plantas de milho o chumbo reduz o conteúdo de cálcio e potássio (HUANG; CUNNINGHAM, 1996). Também, os efeitos tóxicos de chumbo ocorrem nos processos de fotossíntese, mitose e absorção de água (MALAVOLTA, 1994). Além disso, causa inibição da atividade de diversas enzimas por bloquear a ligação de cofatores essenciais à sua ativação (ISLAM et al., 2008), mudanças hormonais e alterações na permeabilidade da membrana celular (WIERZBICKA, 1995; SHARMA; DUBEY, 2005; SINHA et al., 2006; GUPTA et al., 2009).

A exposição das plantas ao chumbo pode intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) o qual ocorre em diferentes locais na célula e que são responsáveis pela indução do estresse oxidativo (FOYER et al., 1994).

A principal fonte dessas moléculas são organelas que possuem grande fluxo de elétrons ou processos de oxirredução, como os cloroplastos (ASADA, 2006), mitocôndrias (MOLLER, 2001) e peroxissomos (DEL RIO et al., 2006).

As plantas possuem um eficiente mecanismo de defesa antioxidante, o qual é capaz de remover espécies reativas de oxigênio, como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), geradas em excesso quando as plantas estão expostas a algum tipo de estresse (GRATÃO et al., 2008). Algumas das enzimas antioxidantes incluídas nesse sistema são a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutationa redutase. A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), que é a conhecida como a primeira enzima a atuar, transforma o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2. A fim de evitar a conversão do H_2O_2 em radicais mais reativos, como o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), subsequentemente, este H_2O_2 pode ser metabolizado a H_2O e O_2 pela catalase (CAT, EC 1.11.1.6) ou pela ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) (GRATÃO et al., 2005). A APX, por sua vez, é uma enzima pertencente ao ciclo ascorbato glutationa, que ao degradar o H_2O_2, catalisa a oxidação de duas moléculas de ascorbato, resultando em monodeidroascorbato (MDHA) e H_2O. Para que a APX se mantenha ativa é necessária a regeneração do MDHA, que pode ser mediada indiretamente através da enzima glutationa redutase (GR) (APEL; HIRT, 2004). Em milho e arroz o chumbo causa o aumento na atividade da GR (VERMA; DUBEY, 2003).

No entanto, se houver acúmulo acelerado de EROs e/ ou este sistema antioxidante não atuar de maneira eficiente ocorre danos oxidativos com consequencias deletérias para as plantas (SCANDALIOS, 2005). A peroxidação lipídica é um dos principais efeitos ocasionados pelo aumento excessivo das EROs, que danifica a estrutura e funcionamento das membranas alterando a sua fluidez e permeabilidade (HALLIWELL, 2006). O chumbo causa injúrias nas membranas celulares de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (BHATTACHARYA; CHOUDHURI, 1995), arroz (MISHRA; CHOUDHURI, 1996; VERMA; DUBEY, 2003) e milho (ZACCHINI et al., 2003).

O aparelho fotossintético é extremamente sensível ao estresse ambiental. Plantas expostas ao chumbo apresentam declínio na taxa fotossintética que pode ser resultante de distorções na ultraestrutura dos cloroplastos ocasionada pela ação de radicais livres, inibição ou degradação na síntese dos pigmentos cloroplastídicos, redução da taxa de transporte de elétrons ou inibição da

atividade das enzimas do ciclo de Calvin (SHARMA; DUBEY, 2005). O padrão de emissão de fluorescência pela clorofila é um indicador sensível da integridade e da funcionalidade do aparelho fotossintético (LAGE PINTO et al., 2008). Assim, o uso de técnicas, como a fluorescência modulada da clorofila *a*, que avalia a eficiência fotossintética, mais especificamente a capacidade de absorção da energia luminosa pelo FSII e a transferência na cadeia de transporte de elétrons (KRAUSE; WEIS, 1991), além de avaliações de trocas gasosas, que fornecem informações a respeito do processo de assimilação do CO_2 na fase bioquímica da fotossíntese, podem ser utilizados para determinar o efeito tóxico do chumbo sobre o metabolismo fotossintético.

No decorrer dos últimos anos, devido ao avanço da degradação ambiental, aumentou a preocupação com os efeitos tóxicos de metais pesados, incrementando os trabalhos que avaliam o efeito do chumbo no desenvolvimento de plantas, porém são raras as pesquisas que buscam relacionar os danos ocasionados nos processos fisiológicos, bioquímicos, bem como nas alterações ultraestruturais.

Pelo fato de o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ser considerado um excelente modelo experimental, em virtude da sua sensibilidade a enorme gama de contaminantes (SINGH et al., 2004; DJEBALI et al., 2005; GRATÃO et al., 2009), esta espécie foi selecionada como objeto de estudo desta pesquisa.

Diante do exposto acima, este trabalho teve como objetivo avaliar alterações induzidas pelas diferentes concentrações de acetato de chumbo nas características bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais de sementes e plantas de tomate.

CAPÍTULO 1

MODIFICAÇÕES NA QUALIDADE DE SEMENTES E ULTRAESTRUTURAIS DE PLÂNTULAS DE TOMATE INDUZIDAS PELO CHUMBO

Changes in seeds quality and ultrastructural of tomato seedlings induced by lead

RESUMO - O objetivo desta pesquisa foi verificar alterações na qualidade fisiológica da semente e na ultraestrutura de plântulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) induzidas pelo acetato de chumbo. As sementes foram submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5 e 0,75mM) e submetidas aos seguintes testes: germinação, primeira contagem da germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea e das raízes e massa seca total de plântulas, emergência de plântulas em casa de vegetação, índice de velocidade de emergência das plântulas, teores de clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, área foliar, atividade da enzima α-amilase e fosfatase ácida e estudos ultraestruturais. Os resultados mostraram que a porcentagem de germinação e a emergência das plântulas nas concentrações de 0,5 e 0,75mM de acetato de chumbo decresceu em relação às concentrações zero e 0,25mM. A primeira contagem de germinação e o índice de velocidade de emergência das plântulas não foram afetados pelos tratamentos. No entanto, o índice de velocidade de germinação, o comprimento da parte aérea e das raízes e a massa seca total das plântulas diminuíram com o incremento da concentração de acetato de acetato. A atividade da enzima α-amilase decresceu e a da fosfatase aumentou em função das concentrações. Os teores de clorofila *a*, *b* e total, carotenoides e a área foliar aos 21 dias após a semeadura em casa de vegetação foram drasticamente afetados pelo acetato de chumbo. As análises ultraestruturais demonstraram que o acetato de chumbo alterou a estrutura dos cloroplastos, causando distorções no tilacoide e reduções na quantidade e tamanho dos grãos de amido caracterizando-se como metal nocivo à qualidade fisiológica de semente de tomate.

Palavras-chave: Acetato de chumbo. Germinação. Enzimas. Cloroplastos.

ABSTRACT - The purpose of this research was to evaluate the changes in seed physiological quality and on the ultrastructure of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.) induced by lead. The seeds were exposed to different concentrations of lead acetate (zero; 0,25; 0,5 and 0,75mM) and submitted the following tests: germination, first account germination, index of germination speed, seedling growth and seedling dry matter, emergence in a greenhouse, rate of seedling emergence, chlorophyll levels (chlorophyll *a* and *b*) and carotenoids, leaf area, activity of the enzyme α-amylase and acid phosphatase and studies ultrastructure. The results demonstrated that the percentage of germination and seedling emergence at concentrations 0,5 and 0,75mM lead acetate concentrations decreased in relation to zero and 0,25mM. The first germination and rate of seedling emergence were not affected by treatments. Therefore, index of germination speed, seedling growth, length of shoots and roots, and seedling total dry matter decreased with increasing on concentration of lead acetate. The enzyme activity decreased α-amylase and phosphatase increased as a function of concentrations. Chlorophyll a, b and total carotenoids, and leaf area at 21 days after sowing in greenhouse was drastically affected by lead acetate. Ultrastructural analyses showed that lead acetate altered the structure of chloroplasts, causing distortions and decreases in the thylakoid number and size of starch grains, characterizing as a metal harmful to the physiological quality in tomato seeds.

Keywords: Lead acetate. Germination. Enzymes. Chloroplasts.

1. INTRODUÇÃO

Na maioria dos solos contaminados com metais pesados, o chumbo (Pb) geralmente é encontrado em conjunto com outros metais, como o zinco (Zn) e cádmio (Cd) (HERNÁNDEZ-ALLICA et al., 2007). Entre os contaminantes, o chumbo representa grande preocupação devido sua ampla distribuição e problemas causados ao ambiente e à saúde humana (CENKCI et al., 2010).

A contaminação por chumbo ocorre por meio de atividades de mineração e fundição, utilização de tintas contendo o metal, resíduos industriais, gasolina e explosivos, bem como pelo descarte de lamas provenientes de esgotos municipais (SHARMA; DUBEY, 2005).

O chumbo é facilmente absorvido pelas plantas. Quando presente no solo penetra através do sistema radical, sendo translocado predominantemente via apoplasto e, de forma radial, atravessa o córtex acumulando-se próximo à endoderme, a qual funciona como uma barreira parcial diminuindo seu transporte das raízes para a parte aérea (SHARMA; DUBEY, 2005), fato que pode justificar maior acúmulo do chumbo nas raízes em relação à parte aérea (VERMA; DUBEY,

2003). Por outro lado, este metal provindo de poeiras e gases de escapamento de automóveis penetra diretamente na parte aérea.

A fitotoxicidade por chumbo depende da concentração e período de exposição ao metal, da espécie, bem como do órgão e tecido da planta (BENAVIDES et al., 2005). Pesquisas relacionadas à germinação de sementes demonstram que os efeitos dos metais pesados variam de acordo com as diferenças na estrutura da semente, principalmente no que diz respeito ao tegumento (WIERZBICKA; OBIDZINISKA, 1998), considerado a principal barreira à entrada de chumbo nos tecidos internos, evitando a contaminação do embrião. Uma vez que o tegumento é rompido, o chumbo é rapidamente absorvido e acumulado nas regiões meristemáticas das raízes e do hipocótilo (LANE; MARTIN, 1977). Dessa forma, a toxidez por chumbo pode comprometer o desenvolvimento vegetal e ocasionar diferentes respostas como diminuição da germinação, decréscimo no crescimento e no acúmulo de biomassa, indução ou supressão de várias enzimas, alterações na permeabilidade das membranas, distúrbios nutricionais, degradação e inibição da síntese de pigmentos fotossintéticos (MOUSTAKAS, 1994; MIRANDA; ILANGOVAN, 1996; SHARMA; DUBEY, 2005; KABIR et al., 2008; EKMEKÇI et al., 2009).

O fornecimento de metabólitos para a respiração e crescimento do embrião de sementes em germinação é baseado quase exclusivamente nas reservas existentes na semente. O amido é quantitativamente o material de armazenamento mais abundante na maioria das sementes e esta reserva é degradada predominantemente por enzimas hidrolíticas, como a α-amilase (DUA; SAWHNEY, 1991). Os metais pesados inibem a atividade da α-amilase, fato que poderia explicar reduções na porcentagem de germinação e no crescimento inicial das plântulas, como verificado em sementes de ervilha tratadas com cádmio e cobre (MIHOUB et al., 2005). Os íons chumbo também afetam a enzima-chave da biossíntese de clorofila, δ-aminolevulínico desidratase (ALA-D), impedindo a formação de porfobilinogenio (PBG), proveniente da condensação de duas moléculas de ácido δ-aminolevulínico (ALA), o qual forma o anel pirrólico na clorofila (PRASAD; PRASAD, 1987a; VAJPAYEE et al., 2000).

Cabe evidenciar que estudos ultraestruturais revelam que os metais pesados acumulam-se na parede celular, vacúolos e espaços intercelulares e que pequenos depósitos são encontrados em organelas como mitocôndrias, núcleos e

cloroplastos. Porém, mesmo em pequenas concentrações o chumbo é capaz de exercer efeito tóxico sobre estas organelas (SHARMA; DUBEY, 2005). Nas folhas os metais pesados, como cádmio e zinco, causam distorções nos tilacóides dos cloroplastos, desorganizações do grana, diminuição dos espaços intercelulares e das células do mesofilo e aumento no número de plastoglóbulos e peroxissomos (SANDALIO et al. 2001; ARAVIND; PRASAD, 2005; DJEBALI et al., 2005; GRATÃO et al., 2009).

Apesar de o chumbo ser considerado um metal potencialmente tóxico, poucos trabalhos são realizados avaliando seu efeito sobre o potencial fisiológico da semente e o crescimento inicial das plântulas. O tomate é uma espécie bastante sensível a uma variedade de estresses ambientais e, por isso, é considerado um excelente modelo em pesquisas, permitindo a realização de análises fisiológicas e bioquímicas (LIMA et al., 2004).

Nesse contexto, a presente pesquisa tem o objetivo de verificar alterações no potencial fisiológico da semente e na ultraestrutura de plântulas de tomate induzidas pelo chumbo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes e em Casa de Vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas. As sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cv. Santa Clara, utilizadas no experimento foram adquiridas no comércio local da cidade de Pelotas (RS), no ano de 2008. Para as avaliações do potencial fisiológico e da ultra-estrutura das sementes e plântulas de tomate induzidas pelo acetato de chumbo nas concentrações de zero; 0,25; 0,5 e 0,75mM de acetato de chumbo, foram realizados os seguintes testes:

Teste de germinação (G%): a determinação da porcentagem de germinação foi realizada com 200 sementes (quatro subamostras de 50 sementes), semeadas em caixas plásticas do tipo gerbox, sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecidas com 15mL das diferentes concentrações de acetato de chumbo zero; zero; 0,25; 0,5 e 0,75mM e mantidas em germinador a 25℃. A avaliação da germinação foi efetuada aos 14 dias após a semeadura e os resultados expressos

em porcentagem de germinação, conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Primeira contagem da germinação (PCG%): conduzida juntamente com o teste de germinação, sendo a primeira contagem realizada aos cinco dias, conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), sendo os resultados expressos em porcentagem de sementes germinadas.

Índice de velocidade de germinação (IVG): determinado em conjunto com o teste de germinação, sendo efetuadas contagens diárias a partir da protrusão da radícula até que o número de plântulas germinadas permanecesse constante. O resultado foi calculado pela média dos índices das repetições de acordo com Maguirre (1962) utilizando a seguinte fórmula: IVG = G1/N1 + G2/N2 + ... + Gn/Nn, onde: G1, G2, Gn = número de sementes com emissão da raiz primária, computadas na primeira contagem, na segunda e última contagem. N1, N2, Nn = número de dias de semeadura a primeira, segunda e última contagem.

Comprimento da parte aérea e das raízes e massa seca total de plântulas: os comprimentos foram obtidos pela média de 40 plântulas ao final do teste de germinação e expressos em mm plântula^{-1}. A massa seca total das plântulas foi determinada após secagem em estufa a 70 ± 1°C até massa constante e expressa em mg plântula^{-1}.

Determinação da atividade da enzima fosfatase ácida e α-amilase: foram determinadas conforme metodologia descrita por AOAC (1965), com algumas modificações. As extrações foram realizadas em sementes de tomate obtidas do teste de germinação, nos tempos zero, cinco e 14 dias após a semeadura (DAS) onde 500mg de sementes (tempo zero) e plântulas (aos cinco e 14 dias) foram maceradas em almofariz, utilizando 20mL do tampão acetato de potássio 0,1 M (pH 5,0) e centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, a 4℃. Após, o sobrenadante foi retirado e colocado em tubos de ensaio e mantidos em geladeira a 4ºC até a realização das análises. Para fosfatase ácida foram adicionados em todos os tubos de ensaio 0,5mL do extrato, 0,5mL de tampão acetato de potássio 0,1M (pH 5,0) e 0,1ml do substrato P-nitrofenil fosfato 0,018M. Os tubos foram incubados a 30℃ por cinco minutos. Posteriormente, foi adicion ado 1mL de hidróxido de sódio 0,5N e efetuada a leitura em espectrofotômetro a 400nm, sendo a atividade expressa em nmol p-NP min^{-1} g^{-1} MF. Para determinação da α-amilase o extrato foi colocado a 70℃ por 20min. A seguir, foi realiz ada a centrifugação por 15

minutos, obtendo o sobrenadante. Após, em cada tubo de ensaio foram adicionados 0,5mL de extrato, 0,5mL da solução tampão, 1mL de solução de amido e 1mL de I_2+KI. A leitura foi executada em espectrofotômetro a 620nm e os resultados expressos em µg de amido hidrolizado min^{-1} g^{-1} MF.

Condutividade elétrica (CE): realizada conforme metodologia descrita por Krzyzanowski et al. (1991), sendo utilizadas quatro subamostras de 50 sementes por repetição, com quatro repetições por tratamento. As sementes foram previamente pesadas e embebidas por duas horas nas diferentes concentrações de acetato de chumbo e, após, lavadas com água destilada, colocadas béquer com 80mL de água deionizada e mantidas em germinador com temperatura constante de 20°C. A condutividade elétrica foi medida em condutivímetro Digimed CD-21, nos tempos de três e 24 horas e os resultados expressos em µS cm^{-1} g^{-1} de sementes.

Emergência de plântulas em casa de vegetação (E%): foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, semeadas em bandejas de isopor com 200 células perfuradas, contendo areia lavada com água destilada, como substrato. A irrigação com as diferentes concentrações de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5 e 0,75mM) foi realizada logo após a semeadura e sete dias após semeadura. Durante os intervalos foi usada água destilada. Ao final dos 21 dias após a semeadura, foi efetuada a contagem final do número de plantas normais emersas e o resultado expresso em porcentagem (POPINIGIS, 1985).

Índice de velocidade de emergência das plântulas (IVE): estabelecido em conjunto com o teste de emergência, sendo a contagem do número de plântulas emersas efetuado diariamente até a estabilização. O resultado foi calculado de acordo com Maguirre (1962) utilizando a seguinte fórmula: IVE = E1/N1 + E2/N2 +...+ En/Nn, onde: E1, E2, En = número de sementes emergidas, computadas na primeira contagem, na segunda e última contagem. N1, N2, Nn = número de dias de semeadura a primeira, segunda e última contagem.

Teores de clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides: a extração de pigmentos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Arnon (1949) aos 21 dias após a instalação do teste de emergência de plântulas. Aproximadamente 500mg das primeiras folhas foi macerada em 10mL de acetona 80% e centrifugados a 3000rpm por 10min. Após o volume foi completado para 25

mL. A quantificação foi realizada conforme Lichtenthaler (1987), sendo os resultados expressos em mg de clorofila g^{-1} MF e mg de carotenoide g^{-1} MF.

Comprimento da parte aérea, do sistema radicular e massa seca da parte aérea e sistema radicular das plântulas: os dados de comprimento foram obtidos pela média de 40 plântulas ao final do teste de emergência e expressos em mm plântula^{-1}. A massa da matéria seca das plântulas foi determinada após secagem em estufa a 70 ± 1°C até massa constante e expressa em mg plântula^{-1}.

Área foliar: determinada aos 21 dias após a instalação do teste de emergência**,** em medidor de área foliar da marca Li-Cor 3000 e os resultados expressos em mm^2 plântula^{-1}.

Microscopia eletrônica de transmissão: amostras de raízes e folhas foram coletadas ao final do teste de emergência (21 DAS) para análise ultraestrutural, sendo fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965, modificado com a utilização de tampão fosfato em 0,2 M pH 7,2), pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1% por duas horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água tetradestilada, desidratadas em série etílica (30; 50; 70; 90 e 95%) seguidas de duas lavagens em acetona 100% e embebidas em resina Époxi e acetona 100% (1:1). A polimerização foi feita a 60^{o}C por 48h. As amostras foram seccionadas em ultramicrótomo (Leica Ultracut UCT). As secções semifinas (0,5 µm) foram coradas com azul de metileno, lavadas em água destilada, secas e montadas em resina sintética Entellan. As secções ultrafinas (1000 nm) foram coletadas em grades de cobre de 100 a 200 mesh e contrastadas com acetato de uranila (7%) (WATSON, 1958) e com citrato de chumbo (3%) (REYNOLDS, 1963) durante 30 minutos cada. Para as avaliações foi utilizado microscópio óptico Olympus BX51 e microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900 operado a 60 kV da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados relativos às variáveis mensuradas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de germinação (G%) das sementes de tomate quando expostas às concentrações de 0,5 e 0,75mM de acetato de chumbo decresceu em relação às concentrações de zero e 0,25mM as quais não diferiram entre si (Fig. 1A). Sementes de rabanete (*Raphanus sativus*), feijão (*Phaseolus* v*ulgaris*) e ervilha (*Pisum sativum*) têm sua porcentagem e velocidade de germinação reduzida quando expostas ao chumbo, enquanto em espécies como pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*), não houve efeito negativo significativo (WIERZBICKA; OBIDZINSKA, 1998). O chumbo na concentração de 100µM de chumbo reduz a porcentagem de germinação em sementes de arroz (MISHRA; CHOUDHURI, 1999). Portanto, é provável que o efeito do chumbo na germinação dependa da estrutura da semente, bem como do grau de permeabilidade do tegumento ao metal pesado (SHARMA; DUBEY, 2005).

A primeira contagem de germinação (PCG%) das sementes de tomate não foi afetada pelos tratamentos aplicados (Fig. 1B). No entanto, o índice de velocidade de germinação (IVG) diminuiu com o incremento das concentrações de acetato de chumbo (Fig. 1C), resultado similar foi verificado por Wierzbicka e Obidzinska, (1998). Esta redução na velocidade de germinação está provavelmente relacionada à diminuição da atividade de enzimas hidrolíticas, como a α-amilase, envolvida na mobilização de reservas para o crescimento do embrião e subseqüente protusão da radícula. Visto que, este decréscimo na atividade da α-amilase pode ocorrer em virtude de o chumbo competir e interagir com o mesmo sitio de ligação do íon Ca^{2+} (SHARMA, DUBEY, 2005), que é requerido para manutenção da estabilidade protéica e ativação enzimática (SABOURY; KARBASSI, 2000)

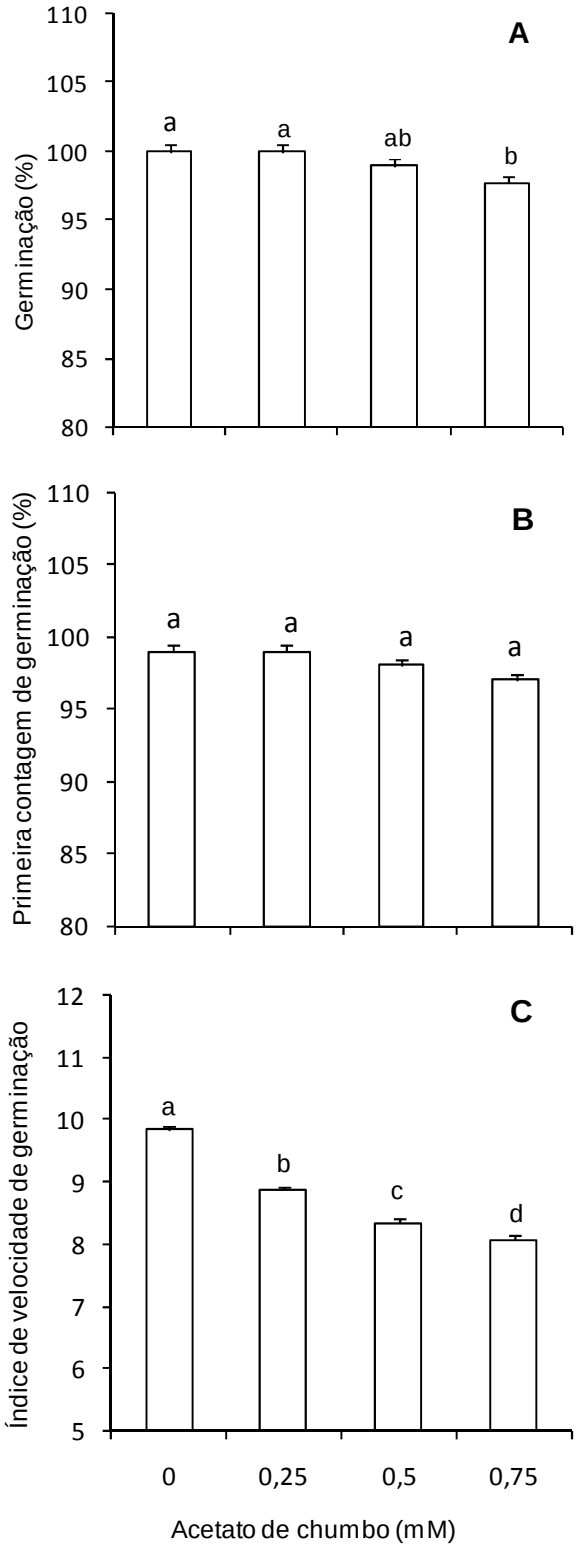


Figura 1- Porcentagem de germinação (A), primeira contagem de germinação (B) e índice de velocidade de germinação (C) de sementes de tomate, cv Santa Clara, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

O comprimento da parte aérea e das raízes de plântulas apresentou redução significativa quando expostas ao acetato de chumbo, sendo a parte aérea mais suscetível a danos do que o sistema radicular, para todas as concentrações deste metal (Fig. 2A e 2B). No entanto, em plântulas de pepino submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo a maior redução ocorre nas raízes (GONÇALVES et al., 2009). Em plântulas de arroz crescidas em 1mM de Pb há redução de 40% no comprimento das raízes e 31% no comprimento da parte aérea (VERMA; DUBEY, 2003). É importante ressaltar que as respostas das plantas aos metais pesados podem variar de acordo com diversos fatores como o tipo do metal, tempo de exposição, com as características específicas de cada espécie e sua fase de desenvolvimento (SEREGIN et al., 2004).

Em relação à massa seca total das plântulas de tomate expostas às diferentes concentrações de acetato de chumbo se observou padrão semelhante aos verificados para comprimento da parte aérea e raízes (Fig. 3). Estas reduções provocadas pelo chumbo (Fig. 2 e 3) pode ser devido à redução da divisão celular na zona meristemática da raiz (EUN et al., 2000), supressão do alongamento da célula, causado pela diminuição da plasticidade da parede celular (IVANOV et al., 1998; SHARMA; DUBEY, 2005) e diminuição da atividade de algumas enzimas envolvidas no crescimento inicial da plântula.

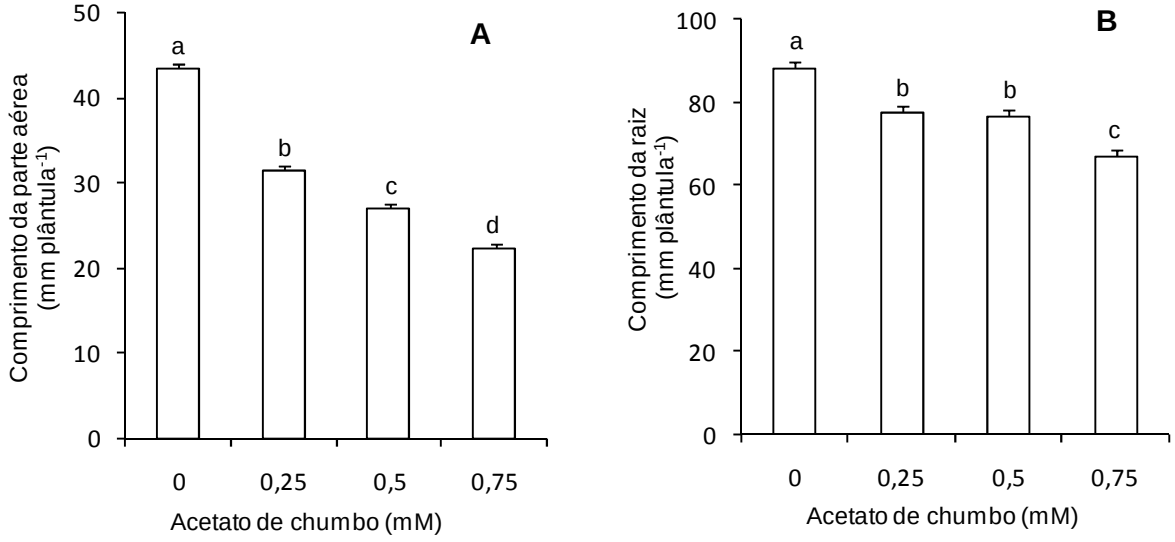


Figura 2 - Comprimento da parte aérea (A) e das raíz (B) de plântulas de tomate, cv Santa Clara, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetiçõe

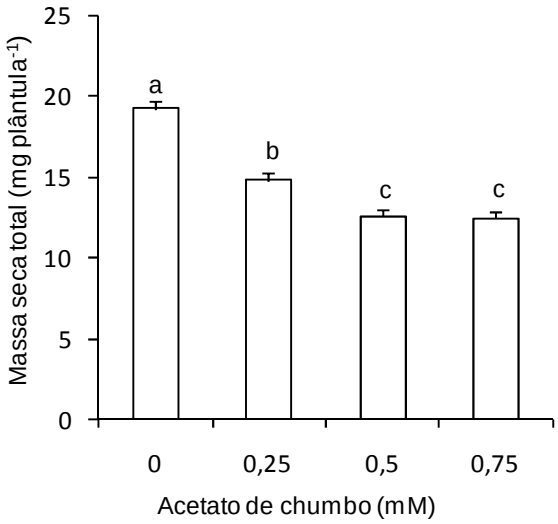


Figura 3 - Massa seca total de plântulas de tomate, cv Santa Clara, aos 14 DAS, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letra distinta diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

A atividade da enzima α-amilase decresceu em função das concentrações de acetato de chumbo nos tempos zero, cinco e 14 dias após a semeadura, enquanto a atividade da enzima fosfatase ácida aumentou (Fig. 4A e 4B). Nos níveis mais elevados de acetato de chumbo, houve alteração no padrão de expressão das enzimas durante os três períodos de avaliação, principalmente para a atividade da enzima α-amilase, onde houve reduções bastante acentuadas no quinto dia após a semeadura, período em que a atividade da enzima deveria ser máxima, ou seja, com alta degradação de amido. Lamhamdi et al (2011) avaliando a influência do chumbo em plântulas de trigo, verificaram que 3mM do metal reduz a atividade da enzima α-amilase. Sementes de ervilha (*Pisum sativum*) quando mantidas na concentração de 0,25mM de cádmio, mostram redução na atividade da α-amilase e diminuição do sistema radicular (CHUGH; SAWHNEY, 1995). Também, em sementes de trevo branco (*Trifolium repens*) expostas ao cádmio há redução na mobilização de reservas durante o processo de germinação, devido à ação direta do metal na atividade da α-amilase (LESPINAY, 2010). É possível que esta diminuição na atividade enzimática causada pelo acetato de chumbo seja devido ao deslocamento do íon Ca^{2+} (cátion de mesma valência) do sítio de ligação da enzima, visto que este íon tem como função a manutenção da estrutura da enzima α-amilase (ELARBI, et al., 2009), como citado anteriormente. Portanto, pode-se inferir que a diminuição da

atividade da α-amilase pode estar relacionada também com as diminuições ocorridas no crescimento inicial das plântulas de tomate, devido à menor mobilização de reservas necessária para o crescimento do eixo embrionário (Fig. 2 e 3). A fosfatase ácida participa em reações de hidrólise de ésteres e está envolvida também na manutenção do fosfato celular e sua atividade pode afetar o metabolismo do fosfato em sementes (CAMARGO et al. 2000). O aumento na atividade da enzima fosfatase ácida em todos os níveis de acetato de chumbo e períodos, após semeadura, pode ser justificado por maior necessidade de energia (liberação de fosfato) para o crescimento do embrião com a finalidade de reverter os efeitos nocivos do acetato de chumbo.

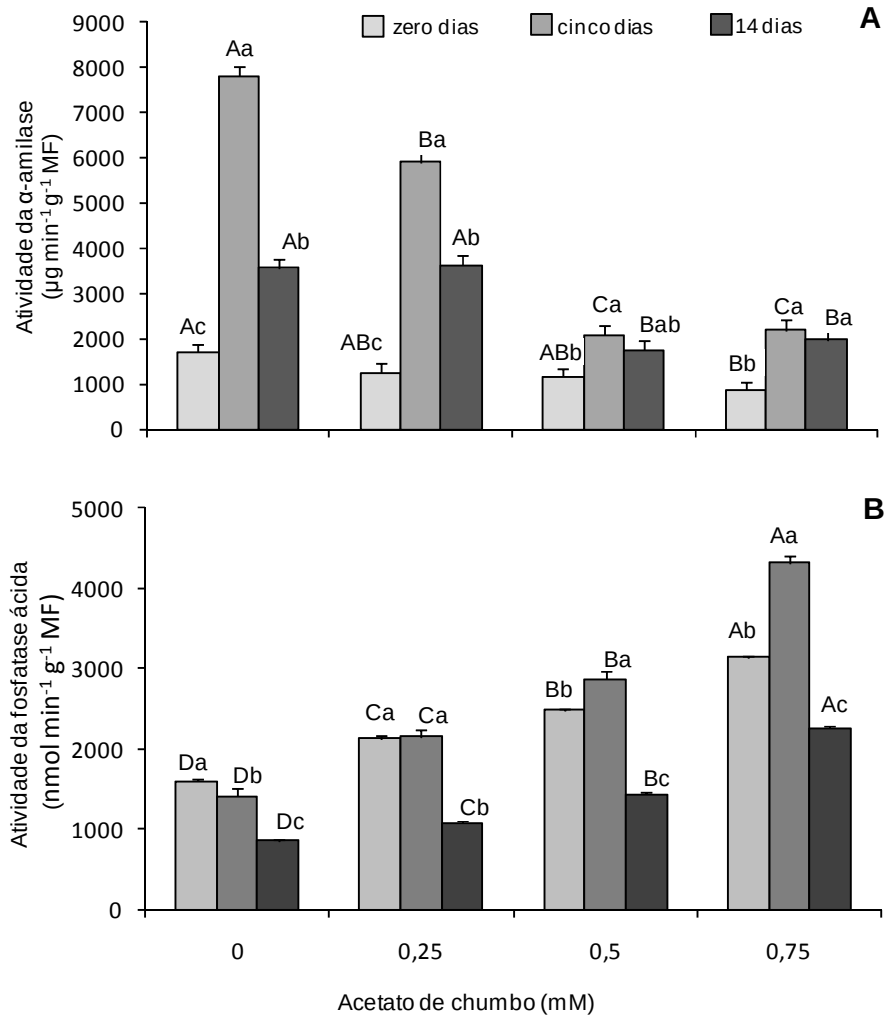


Figura 4 - Atividade da α-amilase (A) e fosfatase ácida (B), aos zero, cinco e 14 DAS de sementes de tomate, cv. Santa Clara, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam tratamentos e letras minúsculas comparam períodos de avaliação dentro de um mesmo tratamento, onde letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Os valores obtidos no teste de condutividade elétrica para as sementes de tomate expostas às diferentes concentrações de acetato de chumbo, após três e 24 horas de incubação, se mantiveram praticamente inalterados (Fig. 5) Este resultado demonstra que o acetato de chumbo não interfere na velocidade de reorganização do sistema de membranas celulares e, portanto não há maior exudação de solutos para o meio de incubação, indicando que este metal pesado, em sementes de tomate, não tem efeito nocivo no sistema de membranas.

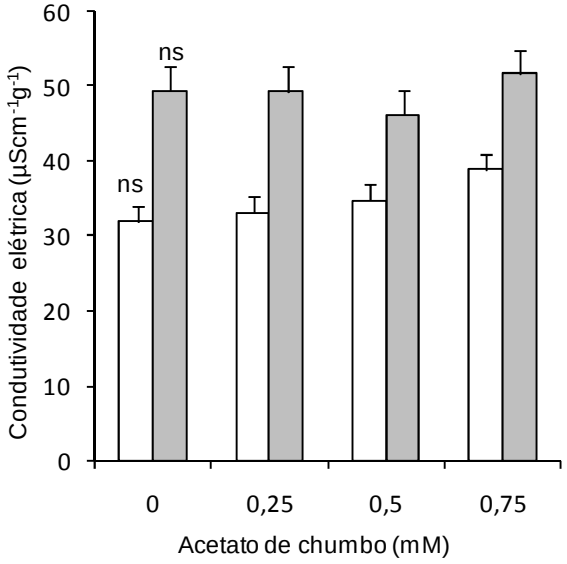


Figura 5 - Condutividade elétrica ($\mu Scm^{-1}\ g^{-1}$) em sementes de tomate, cv Santa Clara, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo, nos períodos de 3h (□) e 24h (■) de incubação. ns - diferenças não significativas pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

A porcentagem de emergência das plântulas em casa de vegetação (E%) apresentou comportamento semelhante ao verificado para a germinação, ou seja, o acetato de chumbo induziu um pequeno decréscimo nesta característica (Fig. 1A e 6A). Em contrapartida, o índice de velocidade de emergência das plântulas (IVE) não foi influenciado pelos diferentes tratamentos (Fig. 6B).

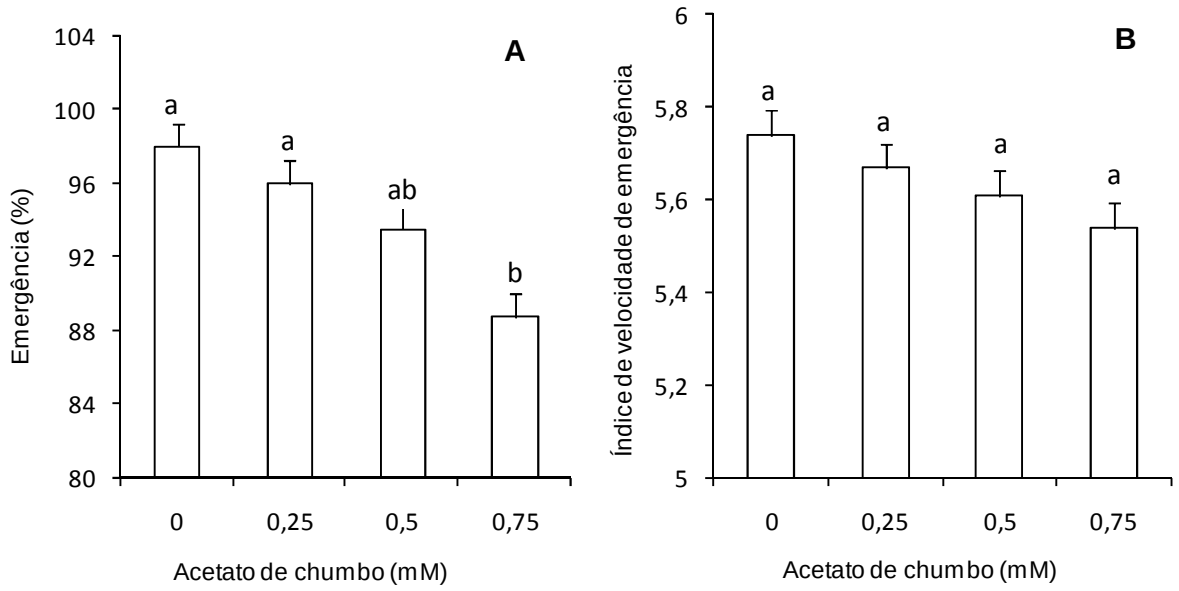


Figura 6 - Porcentagem de emergência (A) e índice de velocidade de emergência (B) de plântulas de tomate, cv Santa Clara, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Os teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas das plântulas de tomate, determinados aos 21 DAS no teste de emergência, diminuíram significativamente, expressando rápida resposta para todos os níveis de acetato de chumbo, sendo esta uma provável indicação de toxicidade deste metal nos processos da fotossíntese (Fig. 7A e 7B). A toxicidade por chumbo pode inibir a síntese de clorofila, devido à redução na atividade de enzimas envolvidas nestes processos (MORSCH et al., 2002), induzir deficiência na absorção de elementos essenciais como o ferro e o magnésio (BURZYNSKI, 1985) e promover a degradação destas moléculas pelo aumento na síntese de clorofilases (CHONGLING et al., 1998). Cenkci et al. (2010), avaliando a influência do acetato de chumbo em plântulas de nabo forrageiro, verificaram que o metal aumenta os níveis do ácido δ-aminolevulínico devido à inibição da atividade da enzima δ-aminolevulínico desidratase (ALA-D), ocasionando redução da biossíntese da clorofila. Resultado similar foi encontrado em plântulas de pepino (*Cucumis sativus*), onde o chumbo também diminui a atividade da ALA-D (GONÇALVES et al., 2009). Reduções dos conteúdos de clorofila por excesso de chumbo também foram encontrados em

Oryza sativa L. (CHEN et al., 2007), *Zea mays* L. (EKMEKCI et al., 2009), e *Arabis paniculata* Franch (TANG et al., 2009).

Também, houve redução nos teores de carotenóides quando as plântulas foram expostas ao acetato de chumbo (Fig. 7D). Carotenoides são pigmentos acessórios que protegem as clorofilas da destruição foto-oxidativa, evitando danos no fotossitema II (MIDDLETON; TERAMURA, 1993) e, portanto o decréscimo no conteúdo das clorofilas evidenciado neste trabalho pode estar diretamente relacionado à redução dos carotenóides.

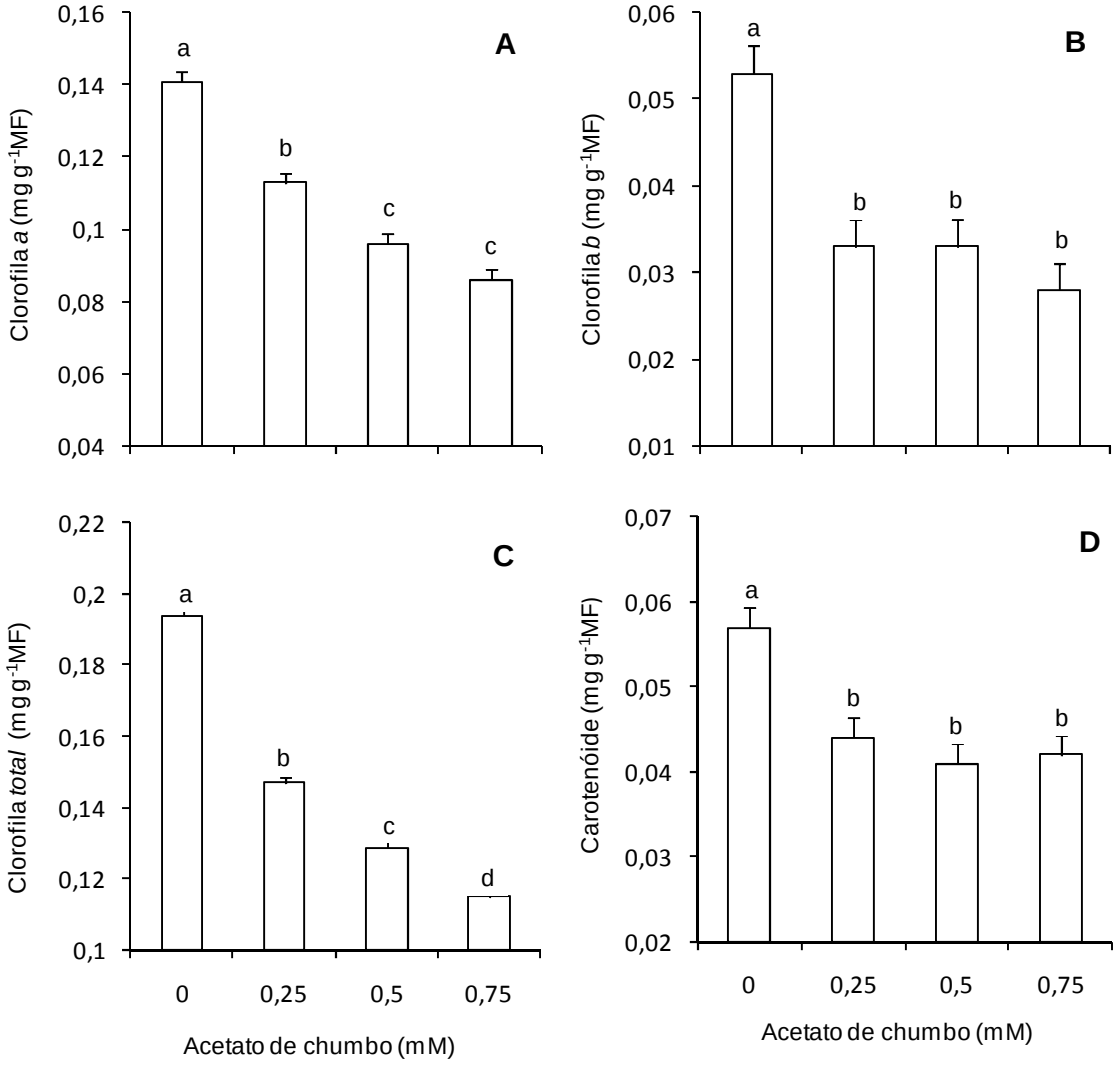


Figura 7 – Teor de clorofila *a* (A), *b* (B), total (C) e de carotenoides (D) em plântulas de tomate, cv Santa Clara, aos 21 DAS, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

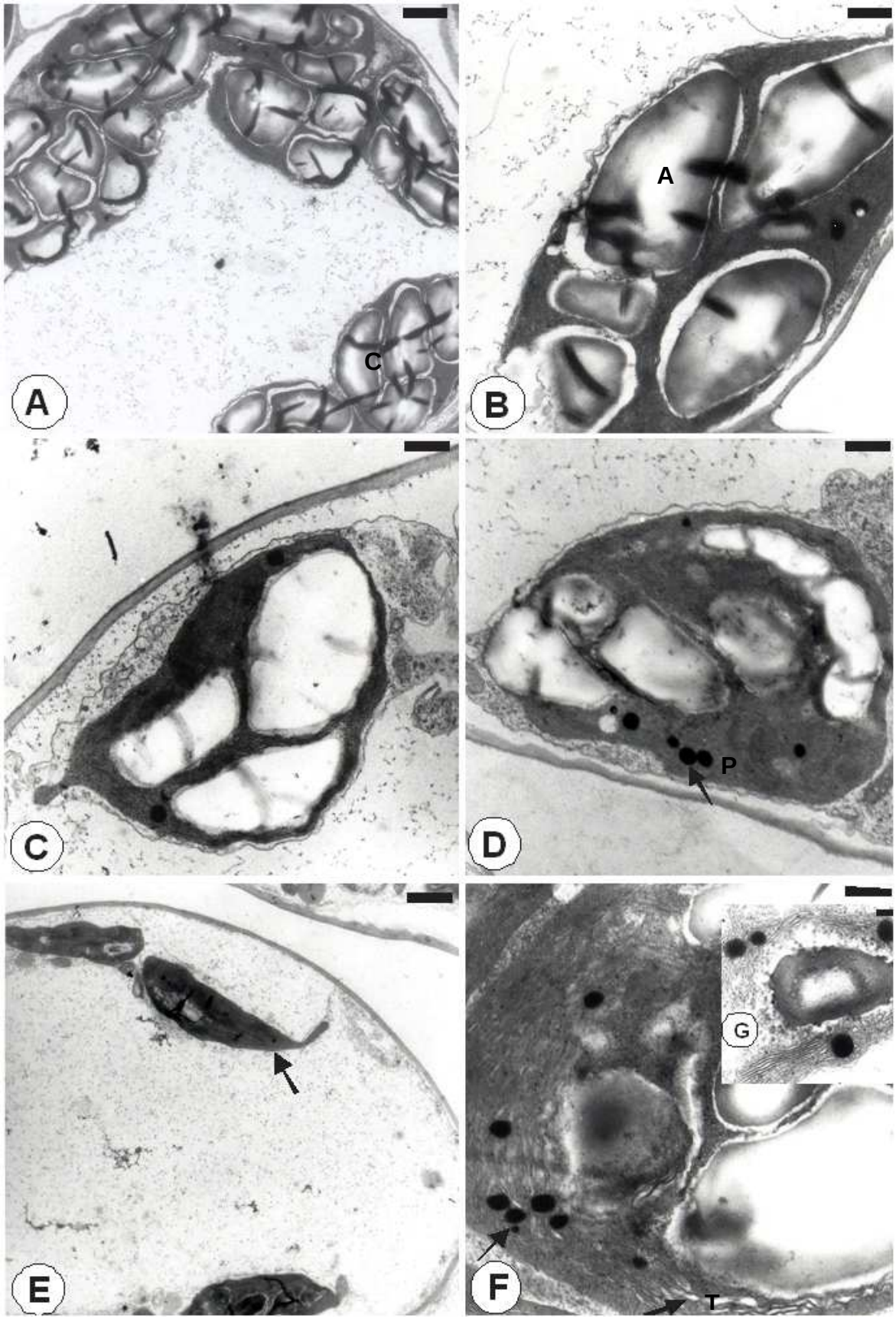
De fato, as análises ultraestruturais nas células do mesofilo das plântulas de tomate evidenciaram a ocorrência de alterações nos cloroplastos, o que compromete o processo fotossintético. A Figura 8B mostra grande concentração de cloroplastos na periferia das células do mesofilo e inúmeros grãos de amido. Contudo, o aumento na concentração de acetato de chumbo promoveu diminuição na densidade desses cloroplastos e na quantidade de grãos de amido (Figura 8E e 8F). Segundo Djebali et al. (2005), a ausência ou diminuição na quantidade de amido no estroma dos cloroplastos de plântulas de tomate crescidas sob concentrações de cádmio, podem estar relacionadas à inibição da fotossíntese e, provavelmente, à redução na fixação do carbono. Além disso, a presença de cloroplastos com formato alongado e as membranas dos tilacoides dilatadas evidenciam a desorganização desta organela quando as plântulas de tomate são submetidas à maior concentração de acetato de chumbo (0,75mM) (Figura 8E e 8G). Similarmente, plantas de *Taxithelium nepalense* quando expostas a 1000µM de acetato de chumbo mostram severas distorções nas membranas do tilacoides (CHOUDHURY; PANDA, 2005).

É importante ressaltar que, nas altas concentrações de acetato de chumbo (0,5 e 0,75mM), os cloroplastos apresentaram maior quantidade de plastoglóbulos (Fig. 8D, 8F e 8G). Resultados semelhantes a este também foram encontrados em plantas de tomate crescidas em 100µM e 1000 µM de $CdCl_2$ (DJEBALI et al., 2005; GRATÃO et al., 2009). O número e tamanho dos plastoglóbulos nos cloroplastos podem aumentar após a exposição ao estresse por metal pesado, influindo na biossíntese de corpos lipídicos que atuam na proteção do aparelho fotossintético contra radicais livres (AUSTIN et al., 2006; OLMOS et al., 2006). No seu interior ocorrem grandes quantidades de α-tocoferol, que atuam evitando danos no fotossistema II (VIDI et al., 2006); e ésteres de ácidos graxos contendo fitil, onde a cadeia fitil é derivada do fitol, porção hidrofóbica decorrente da degradação de clorofilas e considerada potencialmente tóxica quando encontrada na sua forma livre (ISCHEBECK et al., 2006; GAUDE et al., 2007). Portanto, o aumento desses glóbulos de lipoproteínas, os quais foram observados principalmente nas plântulas expostas às concentrações mais elevadas de acetato de chumbo, pode representar um mecanismo utilizado por esta espécie para evitar possíveis danos ao aparato fotossintético.

Os resultados apresentados nesta pesquisa mostraram que plântulas de tomate, quando crescidas nas maiores concentrações de acetato de chumbo, tiveram efeito tóxico semelhante, demonstrando que as alterações nos cloroplastos em conjunto com o decréscimo no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, podem ter comprometido o crescimento das plântulas, devido a possíveis reduções na taxa fotossintética. Entretanto, a influência deste metal na estrutura dos cloroplastos difere dos encontrados em trabalhos realizados com outros metais pesados como, zinco, cobalto e níquel que causam acúmulo de grãos de amido no interior dos cloroplastos, devido a distúrbios no transporte de carboidratos para outras partes da planta (RAUSER; SAMARAKOON, 1980; KUKKOLA; HUTTUNEN, 1998).

O acetato de chumbo causou redução drástica nos parâmetros de crescimento aos 21DAS (Fig. 9A, 9B, 9C e 9D). A massa seca da parte aérea e das raízes das plântulas de tomate foi altamente sensível a este metal, decrescendo acentuadamente, em torno de 64%, quando comparado ao controle (Fig. 9A e 9B). Este decréscimo no conteúdo de massa seca pode ser consequência da redução dos teores de clorofila que comprometem os processos fotossintéticos (Fig.7), bem como pelas alterações ultraestruturais ocasionadas pelo acetato de chumbo nos cloroplastos, como evidenciado anteriormente (Fig.8). O comprimento da parte aérea e das raízes de plântulas de tomate submetidas às diferentes concentrações de acetato de chumbo foram influenciados negativamente pela presença do metal (Fig. 9C e 9D). Plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*) tratadas com acetato de chumbo mostram diminuição do crescimento da parte aérea, sendo diretamente proporcional ao aumento da concentração de acetato de chumbo (ROMEIRO et al., 2007). Estes resultados sugerem que plântulas que crescem em solos contaminados por chumbo podem ter o crescimento da parte aérea e do sistema radical reduzido e, consequentemente diminuição da capacidade em absorver nutrientes e umidade do solo, prejudicando o subsequente crescimento. Geralmente o crescimento das raízes laterais é mais sensível ao chumbo do que o crescimento das raízes primárias (SHARMA; DUBEY, 2005). Em plântulas de milho (*Zea mays)* tratadas com chumbo, foi constatado redução do crescimento das raízes primárias e forte inibição da ramificação com maior impacto nas raízes laterais próximas a zona apical (OBROUCHEVA et al., 1998).

Figura 8 – Elétron-micrografias de cloroplastos observados nas células do mesofilo de plântulas crescidas sob diferentes concentrações de acetato de chumbo (**A,B**. controle; **C.** 0,25mM; **D.** 0,5mM; **E,F** e **G**. 0,75mM). **A.** Cloroplastos evidenciando os grãos de amido e ausência de modificações nas membranas dos tilacoides. **B.** Detalhe do cloroplasto observado em A. **C** e **D.** Presença de plastoglóbulos (setas). **E**. Os cloroplastos apresentam-se com formato alongado (seta) e com número e tamanho dos grãos de amido reduzidos. **F** e **G.** Detalhe do acúmulo de plastoglóbulos (setas) e desorganização das membranas dos tilacóides. A = amido; C = cloroplasto; P = plastoglóbulo; T = tilacoide. Barras: A,E = 1,7 µm; B,C,D = 0,6 µm; F = 0,4 µm; G = 0,15 µm.


A
C
B
A
C
C
D
P
E
F
G
T

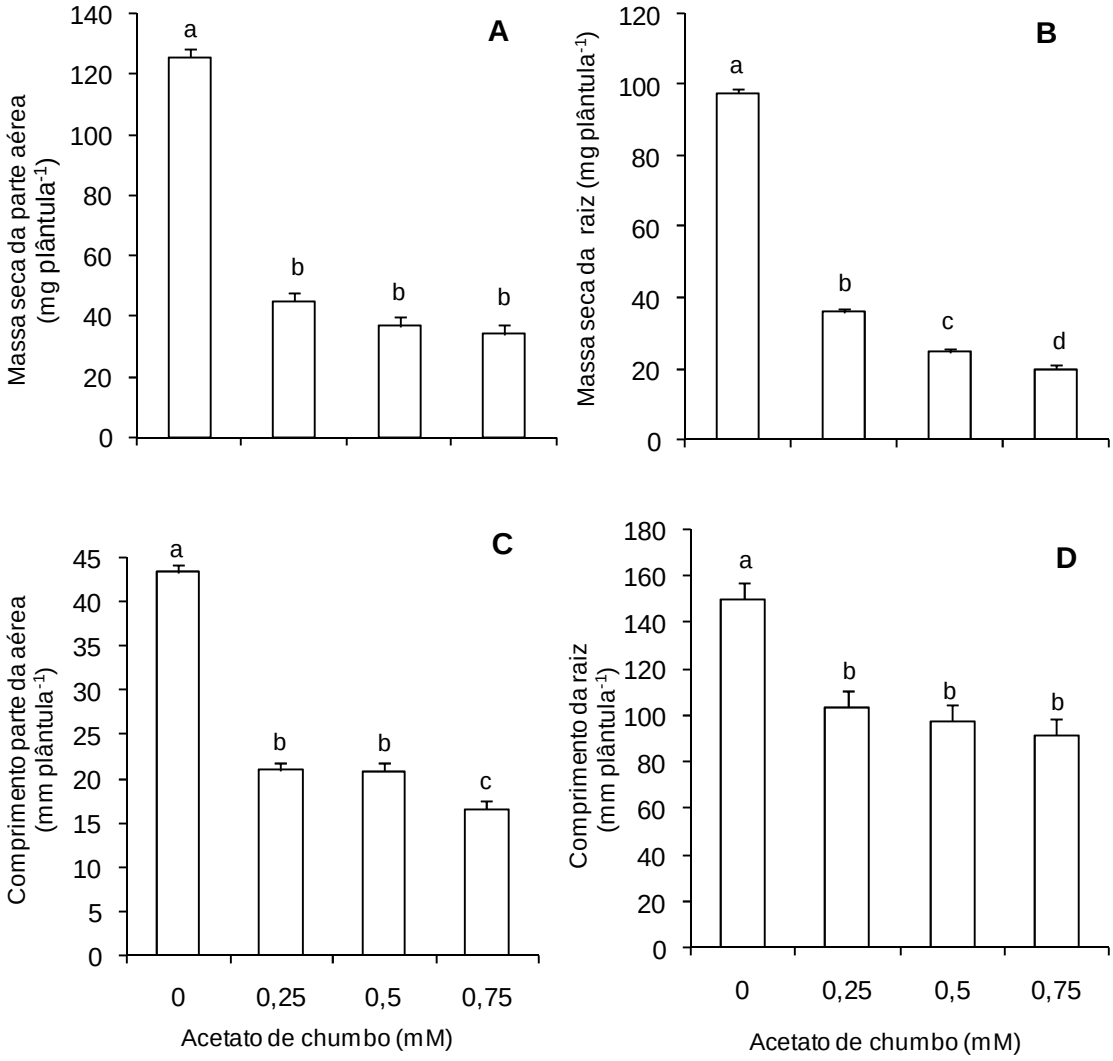


Figura 9 - Massa seca da parte aérea (A), massa seca da raiz (B), comprimento da parte aérea (C) e comprimento de raiz (D) de plântulas de tomate, cv Santa Clara, aos 21 DAS, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letra distinta diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

A área foliar também foi fortemente prejudicada pela exposição ao metal (Fig. 10). A partir da concentração de 0,25mM de acetato de chumbo ocorreu redução de 78% em relação ao controle. Resultados similares foram encontrados para plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) tratadas com acetato de

chumbo, onde há forte redução na área foliar e na massa seca da parte aérea e das raízes (ROMEIRO et al., 2007).

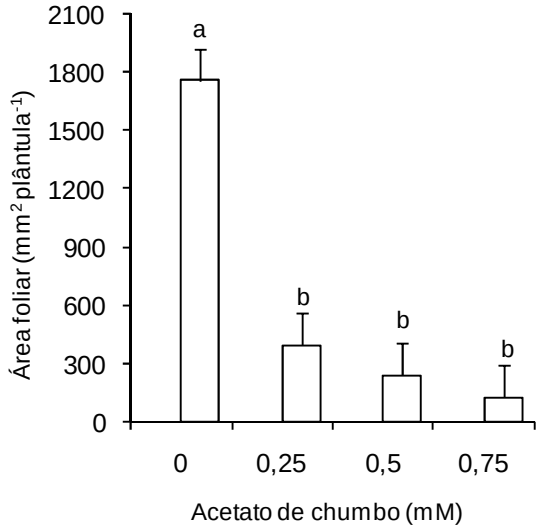


Figura 10 - Área foliar de plântulas de tomate, cv Santa Clara, aos 21 DAS, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letra distinta diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

No que se refere à análise ultraestrutural das raízes verificou-se, nas diferentes concentrações de acetato de chumbo, possível precipitação do metal nas células do floema (Fig. 11A, C e D). Essa difusão do chumbo para o interior das células pode ser decorrente de danos à membrana (SHARMA; DUBEY, 2005). Em tecidos radiculares de *Chamaecytisus palmensis* precipitações de chumbo ocorrem preferencialmente próximos à parede celular e nos espaços intercelulares, sugerindo transporte apoplástica. Nesta mesma pesquisa, pequenas partículas do metal também são encontradas em mitocôndrias, evidenciando a ocorrência de transporte simplástico (JARVIS; LEUNG, 2001).

Na Figura 11B é possível verificar estruturas aglomeradas muito semelhantes a proteínas do floema (proteínas P), as quais têm sido identificadas como proteínas envolvidas em reações de defesa, indicando uma importante função do floema na resposta das plantas contra estresses bióticos e abióticos (WALZ et al., 2004).

Entretanto, em plantas de trigo quando expostas ao Cádmio, essas pontuações são identificadas como estruturas semelhantes a microtúbulos (OUZOUNIDOU et al., 1997), que são componentes do citoesqueleto de células

eucarióticas atuando na divisão, expansão e organização celular (STAIGER, 2000, WASTENEYS; GALWAY, 2003). O mesmo é relatado em células de raízes de alho (*Allium sativum*) expostas ao chumbo (LIU, et al., 2009). Dessa forma, é necessário a realização de outras análises afim de confirmar a identificação correta dessas estruturas e chegar a uma conclusão definitiva da influência do acetato do chumbo no surgimento das mesmas.

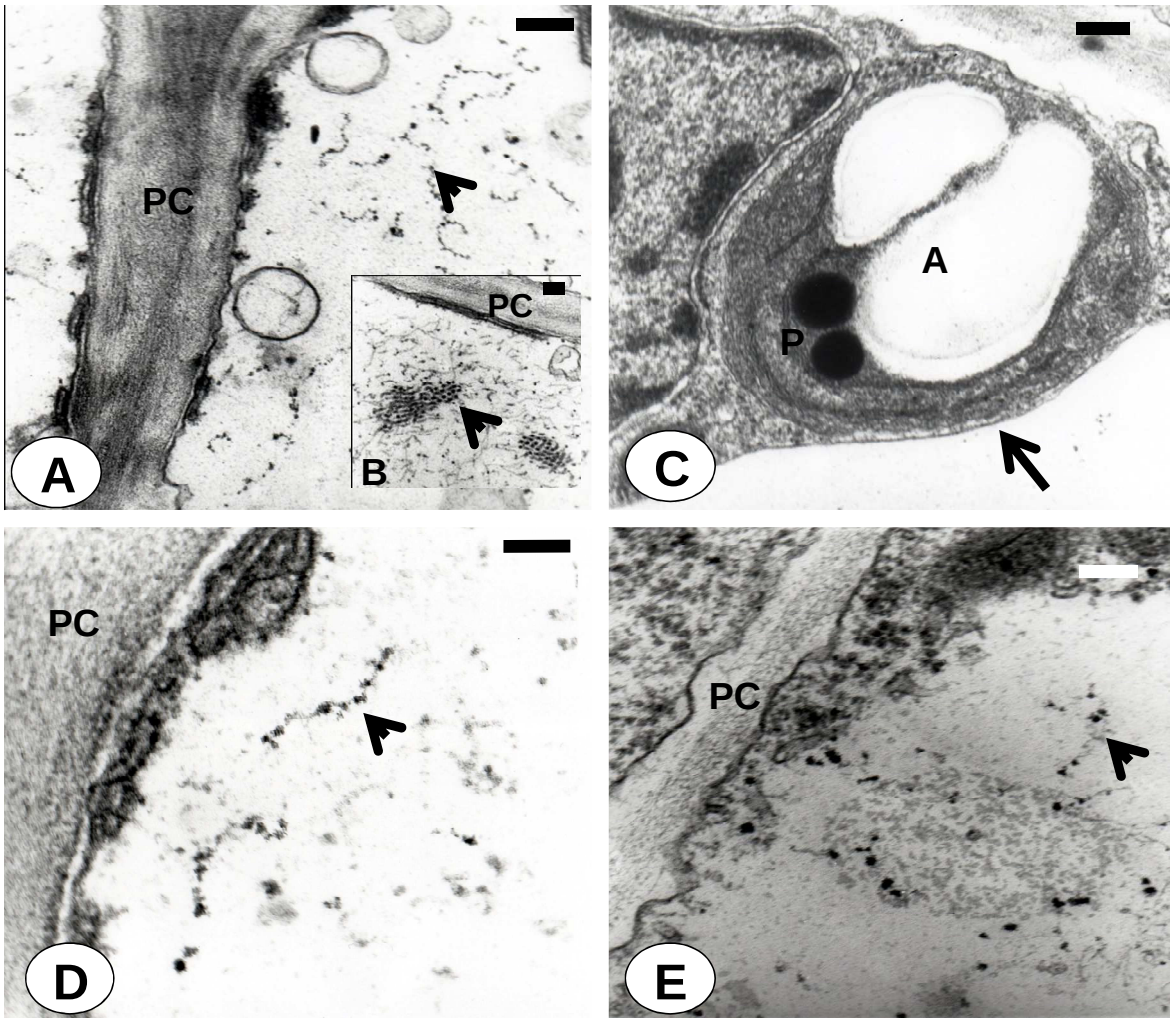


Figura 11 – Elétron-micrografias de células do floema de raízes evidenciando o acúmulo de chumbo. (**A, B,** e **C**. 0,25mM; **D**. 0,5mM; **E**. 0,75mM). **A, B, D e E**. As setas menores indicam possível acúmulo de chumbo. **C.** Detalhe de plastídio tipo S (Starch) (seta) nas células do floema com a presença de amido e plastoglóbulos. A = amido; PC = parede celular; P = plastoglóbulo. Barras: A,C= 0,25 µm; B,E = 0,15 µm; D = 0,09 µm.

4. CONCLUSÕES

O aumento na concentração de chumbo ocasiona redução na viabilidade e no vigor das sementes de tomate, além de reduções no crescimento inicial das plântulas e no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, como consequencia de alterações nos cloroplastos, evidenciados principalmente pela diminuição no número e tamanho dos grãos de amidos, bem como pela desestruturação dos tilacoides na concentração mais elevada do metal.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E ANTIOXIDANTE DE PLANTAS DE TOMATE EXPOSTAS AO CHUMBO

Photosynthetic activity and antioxidant of tomato plants exposed to lead

RESUMO - O objetivo da pesquisa foi avaliar o estresse ocasionado por chumbo (Pb) nas características de crescimento, trocas gasosas, fluorescência da clorofila e enzimas antioxidantes de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cv Santa Clara. Após o cultivo em casa de vegetação por 30 dias após a semeadura (DAS) as plantas foram transplantas para vasos plásticos e mantidas em sala de crescimento climatizada, com temperatura de 25±1℃ e radiação fotossinteticamente ativa de 120µmol $m^{-2}s^{-1}$. Foram realizadas quatro aplicações das diferentes concentrações de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5 e 0,75mM), as quais eram intercaladas com solução nutritiva. Quatro avaliações de trocas gasosas e fluorescência modulada da clorofila *a* foram determinadas e, ao final do experimento, avaliou-se a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutationa redutase, peroxidação lipídica e conteúdo de H_2O_2, bem como as características de crescimento. A assimilação de CO_2, condutância estomática e transpiração, das plantas expostas ao Pb, decresceram significativamente, bem como as características de crescimento, sendo o sistema radical mais sensível ao metal. Quanto à fluorescência da clorofila *a,* o Pb causou redução na taxa de transporte de elétrons (TRE) durante a segunda avaliação e uma menor redução no rendimento quântico efetivo do FS II (ΦPS2), após este período. Em relação às enzimas antioxidantes, em geral, houve aumento na atividade, porém não suficiente para impedir peroxidação lipídica das membranas. Portanto, se pode concluir que o acetato de chumbo, em plantas de tomate tem efeito direto na fase bioquímica da fotossíntese por diminuir a entrada de CO_2 para o interior do mesofilo devido ao fechamento estomático, limitando a fase fotoquímica, e o crescimento. Além de causar danos oxidativos em virtude do aumento de espécies reativas de oxigênio.

Palavras- chave: Trocas gasosas. Fluorescência. Enzimas antioxidantes. Acetato de chumbo.

ABSTRACT - The purpose of this research was to evaluate the impact of stress caused by lead in growth parameters, gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant systems of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cv Santa Clara. After cultivation in a greenhouse for 30 days after sowing (DAS), plants were transplanted to plastic pots and kept in a growth chamber heated at a temperature 25±1 ℃ and photosynthetic active radia tion of 120 mol $m^{-2}s^{-1}$. There were four applications of different concentrations of lead acetate (zero; 0,25; 0,5; and 0,75mM), which were interspersed with nutrient solution. Four assessments of exchange and chlorophyll a fluorescence were determined, and at the end of the trial, we evaluated the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, lipid peroxidation, H_2O_2 content and growth parameters. The CO_2 assimilation, stomatal conductance and transpiration of plants exposed to lead acetate suffered significant decline as well as growth parameters. The root system was more sensitive to extreme metal. In relation to fluorescence of chlorophyll *a*, lead caused a reduction in the rate of electron transport (TER) during the second evaluation and a slight reduction in the effective quantum yield of the FS II (ΦPS2) after this period. Regarding the role of the antioxidant enzymes, in general, there was an increase in the activity, but was not sufficient to prevent lipid peroxidation of membranes. Therefore, lead has direct effects on the biochemical phase of photosynthesis considerably reducing the input of CO_2 into the interior mesophyll caused by stomatal closure in tomato plants, limiting the phase photochemistry, furthermore, it causes oxidative damage due to the increase of reactive oxygen species.

Keywords: Gas exchange. Fluorescence. Antioxidant enzymes. Lead acetate.

1. INTRODUÇÃO

A crescente industrialização nas últimas décadas tem exposto os vegetais e animais a muitos elementos potencialmente tóxicos. O chumbo é um metal pesado cada vez mais presente no meio ambiente e que não está incluído nos elementos essenciais às plantas. A contaminação dos solos por chumbo é resultante de atividades antropogênicas, como, queimas de combustíveis, indústria de mineração e fundição de minérios de chumbo, uso de fertilizantes e pesticidas contendo chumbo, entre outros (EICKI et al., 1999).

O chumbo pode causar efeitos adversos na produtividade dos vegetais e mesmo em baixas concentrações pode inibir processos vitais para a planta. No entanto, a intensidade dos danos dependerá da concentração do metal, tempo de exposição e espécie da planta (PATRA et al., 2004).

Logo, quando presente, este metal pode inativar a atividade de enzimas que contém grupos sulfidrílicos, causar distorções na estrutura dos cloroplastos,

reduzir a taxa fotossintética e inibir a síntese de pigmentos fotossintéticos (MOLAS, 2002; MISHRA et al., 2006). Consequentemente, como resultado da redução da fotossíntese o efeito tóxico do chumbo pode ser percebido pelo decréscimo na produção de biomassa (KOSOBRUKHOV et al., 2004).

Ao penetrar nas células o chumbo induz ao estresse e promove aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como, radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), oxigênio singlet ($^1O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), as quais podem causar danos oxidativos em diferentes partes de plantas (VERMA; DUBEY, 2003; SHARMA; DUBEY, 2005). No entanto, as plantas possuem um complexo sistema de defesa antioxidante capaz de remover e neutralizar radicais livres (PAOLLETI et al., 2008). Este sistema é compreendido por uma série de enzimas dentre as quais se destacam a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX) e Glutationa redutase (GR) e, por constituintes não-enzimáticos, como o ascorbato (AA) e glutationa reduzida (SHAH et al., 2001). O monitoramento da atividade de enzimas antioxidantes pode, portanto, ser utilizado como indicativo de estresse oxidativo em plantas.

Em relação ao processo fotossintético, o efeito tóxico do chumbo pode ocorrer em apenas uma das fases da fotossíntese ou em ambas, fotoquímica e bioquímica (SHARMA; DUBEY, 2005). Por isso, a avaliação de trocas gasosas, que fornece informações sobre a taxa de assimilação de CO_2, condutância estomática e taxa de transpiração têm mostrado ser bom parâmetro na identificação de danos ocasionados em plantas expostas a metais pesados.

Outro método bastante utilizado é a técnica de fluorescência da clorofila. Esta técnica permite estimar de forma rápida e não invasiva a eficiência do transporte de elétrons no fotossistema II (FSII), ou seja, a capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons, fornecendo assim, informações sobre os processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos (ROHÁCEK, 2002; YUSUF et al., 2010).

Muitas pesquisas foram realizadas avaliando a influência do chumbo em várias espécies (KOSOBRUKHOV et al., 2004; CHOUDHURY; PANDA, 2005; CENKCI et al., 2010). Entretanto, em virtude da complexidade dos efeitos tóxicos e das diversas respostas das plantas ao chumbo, é importante a realização de pesquisas que envolvam os mecanismos antioxidativos e fotossintéticos, a fim de

elucidar a maneira que as plantas respondem ao estresse ocasionado por este metal.

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) foi a espécie selecionada como planta teste devido a sensibilidade a enorme gama de contaminantes (SINGH et al., 2004; DJEBALI et al., 2005; GRATÃO et al., 2009).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de acetato de chumbo, em plantas de tomate, por intermédio de características relacionadas à fotossíntese, crescimento e atividade de enzimas antioxidantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Condições de crescimento: o experimento foi conduzido com mudas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cv. Santa Clara, com 30 dias após a semeadura (DAS), estabelecidas em casa de vegetação. Após foram levadas para sala de crescimento climatizada, com temperatura de 25±1℃ e radiação fotossinteticamente ativa de 120µmol $m^{-2}s^{-1}$, e transplantadas para potes plásticos, contendo como substrato areia lavada e irrigadas com 50mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938) três vezes por semana. As plantas permaneceram nessas condições por um período de 14 dias. Após o período de aclimatização cada grupo de seis vasos (contendo uma planta por tratamento) receberam quatro aplicações das diferentes concentrações de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5; e 0,75mM, sendo a concentração zero utilizada como controle) as quais eram intercaladas com solução nutritiva. As avaliações de trocas gasosas, fluorescência modulada da clorofila *a* e índice de clorofila foram realizadas 24h após a primeira aplicação de acetato de chumbo, totalizando quatro avaliações, sempre nas mesmas folhas completamente expandidas. Aos 52 dias após a semeadura (última avaliação) as plantas foram coletadas e o crescimento determinado, bem como a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutationa redutase), peroxidação lipídica e quantificação de peróxido de hidrogênio.

A avaliação do efeito das diferentes concentrações de acetato de chumbo sob as características de crescimento, massa seca da parte aérea e de raízes, comprimento da parte aérea e área foliar foram aferidas. A massa seca das

plantas foi determinada gravimetricamente após secagem em estufa a 70 ± 1°C até massa constante e os resultados expressos em mg. Plântula^{-1}. Os dados de comprimento foram obtidos empregando régua graduada e os resultados expressos em mm plântula^{-1}. A área foliar foi estimada em medidor de área foliar (Marca Li-cor, modelo LI-3100) e os resultados expressos em mm^2 plantula^{-1}.

Para as análises das atividades antioxidantes, quatrocentos miligramas de folhas e raízes foram macerados em N_2 líquido com 20% de polivinilpolipirolidona (PVPP) e homogeneizado em 1,8mL do tampão de extração o qual continha fosfato de potássio 100mM (pH 7,8), EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 20mM. Após centrifugação a 13.000*g* por 20 minutos, a 4^{o}C, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLIS; REIS, 1977), em meio de reação composto por fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), metionina 14mM, EDTA 0,1µM, NBT 75µM e riboflavina 2µM. Os tubos com o meio de reação e o extrato (20µL) foram iluminados por 10 minutos, em uma caixa adaptada com lâmpada fluorescente de 15W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado e, como branco foi utilizado tubo com meio de reação mantido no escuro. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560nm, sendo uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998), com pequenas modificações. Sua atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240nm, durante um minuto e meio, em reação contendo tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0), H_2O_2 12,5mM e mais 100µL do extrato enzimático. Os resultados foram expressos em µmol de H_2O_2 min^{-1} mg^{-1} de proteína.

A atividade da Ascorbato peroxidase (APX) foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando a taxa de oxidação do ascorbato (ASA) a 290nm. O meio de reação incubado a 28^{o}C foi composto de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) ácido ascórbico 0,5mM e H_2O_2 0,1mM e 100µL do extrato enzimático. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um período

de um minuto e meio, a partir do início da reação. Os resultados foram expressos e µmol ASA min^{-1} mg^{-1} de proteína.

Para determinação da atividade da Glutationa redutase (GR) foi utilizado o método descrito por Cakmak et al. (1993), monitorando a taxa de oxidação do NADPH pelo decréscimo na absorbância, a 340nm, durante um minuto. O meio de reação foi incubado a 28 ^{o}C, constituído de tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8) glutationa oxidada 1mM, NADPH 0,075mM e 100µL do extrato enzimático. Os resultados foram expressos em µmol NADPH min^{-1} mg^{-1} de proteína.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica foram determinadas em amostras de aproximadamente 400mg de folhas e raízes de tomate, congeladas em N_2, sendo maceradas em 2mL da solução de extração contendo ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 12.000*g*, durante 20 minutos, sendo o sobrenadante obtido transferido para microtubos de 2mL.

Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados de acordo com Velikova et al. (2000), com algumas modificações. Em tubos de ensaio contendo 0,7mL de tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,0) e 1mL de KI 1M, foram adicionados 0,3mL do sobrenadante, e incubado por 10 minutos a 30℃. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390nm, sendo a concentração de H_2O_2 expressa em µmol de H_2O_2 g^{-1} MF.

Os danos celulares avaliados por meio da peroxidação de lipídios, via acúmulo de malondialdeído (MDA), foi determinado seguindo metodologia descrita por Cakmak e Horst (1991), com algumas modificações. Em tubos de ensaio contendo 0,3mL do sobrenadante foram adicionados a 1mL do meio de reação (0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA, em seguida incubado a 90^{o}C, por 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e após, centrifugadas novamente a 10000*g* durante cinco minutos, a 4℃, com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600nm, e, a quantidade do complexo MDA-TBA foi expressa em nmol MDA g^{-1} de MF.

Os teores de clorofila foram estimados utilizando medidor de clorofila portátil (modelo CL-01, Hansatech) e expressos como índice de clorofila (CASSOL et al., 2008).

As trocas gasosas foram medidas sempre pela manhã, entre 8 e 9h, utilizando um sistema portátil de trocas gasosas IRGA (LICOR, modelo LI-6400) . As determinações das trocas gasosas foram determinadas em um sistema aberto com densidade de fluxo de fótons fotossintético (PPFD) mantida a 1200 µmol $m^{-2}s^{-1}$, e concentração interna de CO_2 na câmara fixada em 380 µmol mol^{-1}. Os parâmetros determinados foram: taxa fotossintética líquida em luz saturante (*A*, µmol $m^{-2}s^{-1}$), a taxa de transpiração (*Tr*, mmol $m^{-2}s^{-1}$) e a condutância estomática (*g*s, mol m^{-2} s^{-1}).

Os parâmetros de fluorescência modulada das clorofilas em estado adaptado à luz foram medidos utilizando um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (modelo FMS-2, Hansatech). As medidas foram realizadas no período da manhã, à temperatura ambiente. Os parâmetros avaliados foram a intensidade de fluorescência no equilíbrio (steady-state) (FS), definida como sendo a intensidade de fluorescência quando os processos de transporte de elétrons acoplados às reações bioquímicas de redução do carbono estão equilibrados e a fluorescência máxima em estado adaptado à luz (FM'), obtida após a aplicação de um flash saturante de luz. A partir desses parâmetros foi calculado o rendimento quântico fotoquímico atual em estado adaptado a luz [φPS2 = (FM' - FS'/FM')] e a taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (TRE).

Os dados foram analisados em um delineamento experimental completamente casualizado. Análise de contraste de polinômios ortogonais foi utilizada para determinar o efeito das diferentes concentrações de chumbo sob os parâmetros de crescimento, sistema antioxidante, índice de clorofila, trocas gasosas e fluorescência modulada da clorofila *a* (STEEL; TORRIE, 1980). No modelo estatístico foi incluída a interação tratamentos x períodos de avaliação para o índice de clorofila e para as variáveis referentes às trocas gasosas e fluorescência, por se tratarem de análises não destrutivas.

3. RESULTADOS

A massa seca das raízes e parte aérea foram altamente sensíveis às diferentes concentrações utilizadas (Fig. 1A e 1B), apresentando tendência linear (p=0,005 e p=0,006, respectivamente). Com o aumento na concentração do metal a massa seca das raízes decresceu cerca de 45% e, na parte aérea, a redução foi

em torno de 29%, em relação ao controle. Comportamento semelhante foi observado para a área foliar (p<0,00001) e comprimento da parte aérea (p=0,0005), onde os decréscimos, quando comparados ao controle, foram de aproximadamente 55% e 21%, respectivamente (Fig. 1C e 1D).

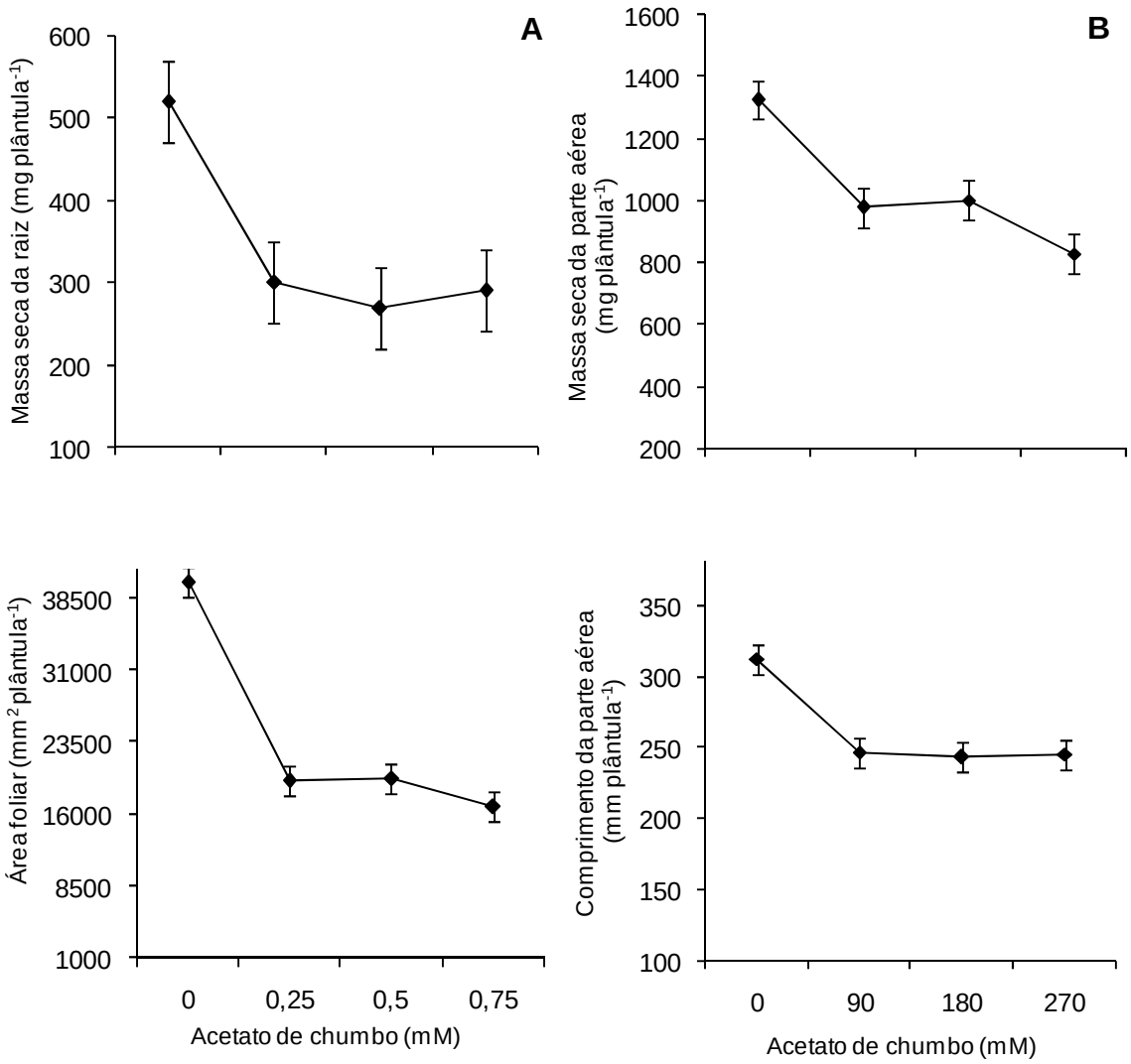


Figura 1. Massa seca da raíz (A) e da parte aérea (B), comprimento da parte aérea (C) e área foliar (D) de plantas de tomate, aos 52 DAS, em função das diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Barras representam o erro padrão da média de cinco repetições.

O índice de clorofila total das plantas de tomate não apresentou interação significativa entre as concentrações de acetato de chumbo e os períodos de avaliação (p=0,12). Apesar do fator tempo (período de avaliação) não ter influenciado significativamente no índice de clorofila, foi possível verificar decréscimo linear (p=0,0009), com reduções mais expressivas na última

avaliação, chegando a uma média de 34%, quando expostas às diferentes concentrações de acetato de chumbo (Fig. 2A).

A taxa assimilatória liquída (*A*) demonstrou ser altamente sensível ao Pb, apresentando efeito linear ($p<0,0001$) e interação entre os dias de avaliação e as concentrações testadas ($p<0,0001$) (Fig. 2B). Após a segunda determinação houve queda acentuada em *A* nos diferentes níveis de Pb, estabilizando entre a terceira e a quarta avaliação. No último período de avaliação estas reduções foram em torno de 25%, 42% e 55% nas concentrações de 0,25, 0,5 e 0,75mM respectivamente, quando comparado ao controle.

A condutância estomática (*g*s) mostrou interação entre tratamento e tempo de avaliação ($p=0,05$) (Fig. 2C), com decréscimo altamente significativo, (linear, $p<0,00001$), a partir da segunda avaliação para todos níveis do metal, sendo que na última coleta de dados, com o aumento do nível de acetato de chumbo de zero para 0,5 e 0,75mM houve redução em torno de 86% na condutância estomática.

Em relação à taxa de transpiração (*T*r), foi verificada interação entre tratamento e período de avaliação ($p=0,00002$), ocorrendo efeito linear ($p<0,00001$) entre os tratamentos aplicados, com leve decréscimo na segunda avaliação e queda bastante acentuada a partir desta, principalmente nas plantas expostas aos maiores níveis de acetato de chumbo (0,5 e 0,75mM) (Fig. 2D). Na quarta determinação, em comparação ao controle, estas reduções chegaram a 65% na concentração de 0,5mM e 72% no maior nível do metal (0,75mM).

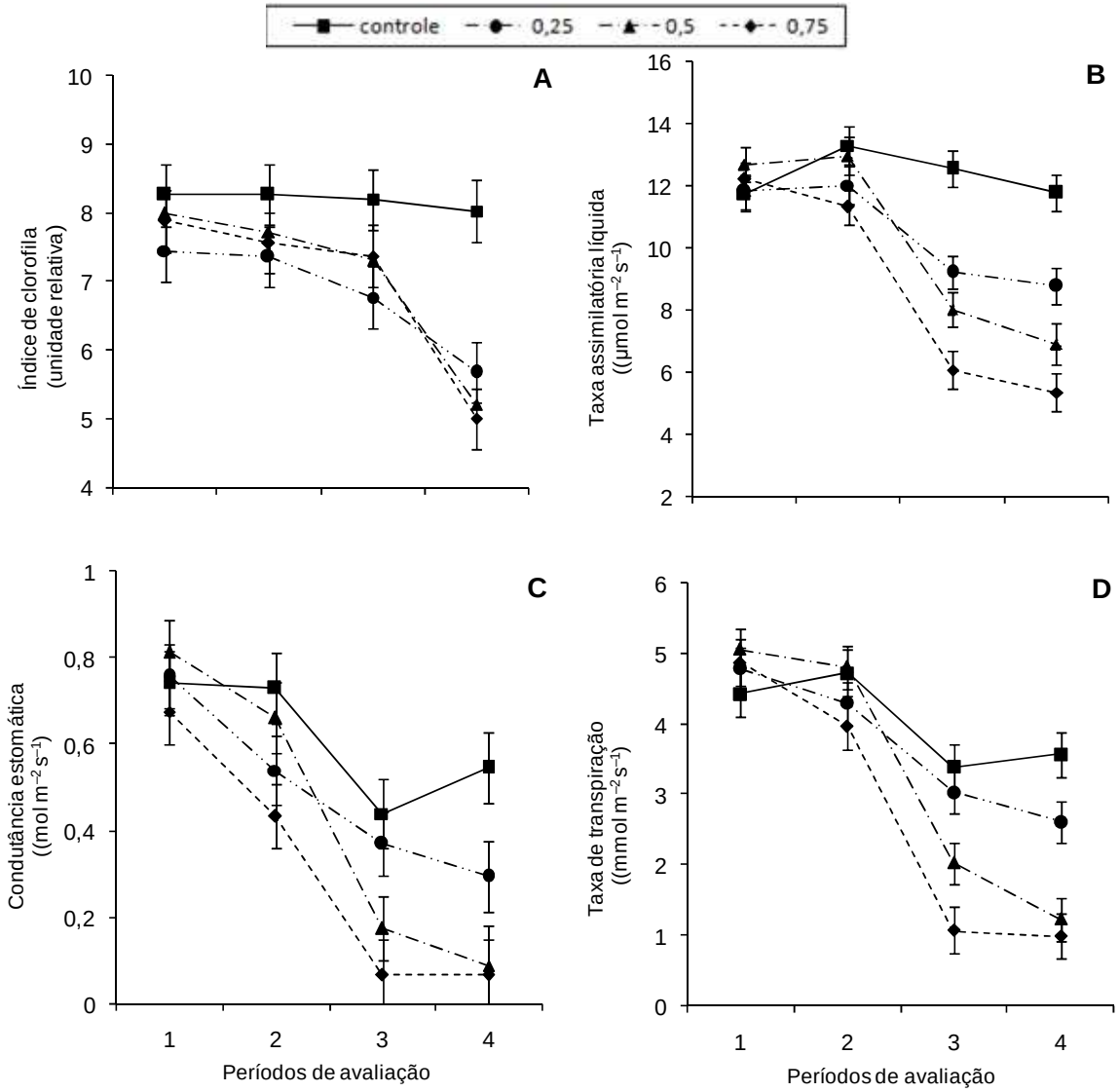


Figura 2. Índice de clorofila (A), taxa assimilatória líquida (B), condutância estomática (C) e taxa de transpiração (D) de plantas de tomate em função de quatro aplicações das diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Barras representam o erro padrão da média de cinco repetições.

As diferentes concentrações de acetato de chumbo, durante o transcorrer do experimento, não demonstraram efeito no rendimento quântico fotoquímico (ΦPS2) (p=0,08), no entanto foi detectada redução linear (p=0,01), onde no quarto período de análise as concentrações de 0,25 e 0,75 mM promoveram decréscimos em torno de 13%, quando comparado ao controle (Fig. 3A). Para a variável taxa de transporte de elétrons (TRE) foi observada interação entre tratamento e dias de avaliação (p=0,05), assim como um efeito linear (p=0,01), sendo o esperado, pois reduções também ocorreram no ΦPS2. Entretanto, essas reduções na TRE foram evidenciadas na segunda avaliação, chegando a 17% ao

final das análises na concentração de 0,75mM de acetato de chumbo, em relação ao controle (Fig. 3B).

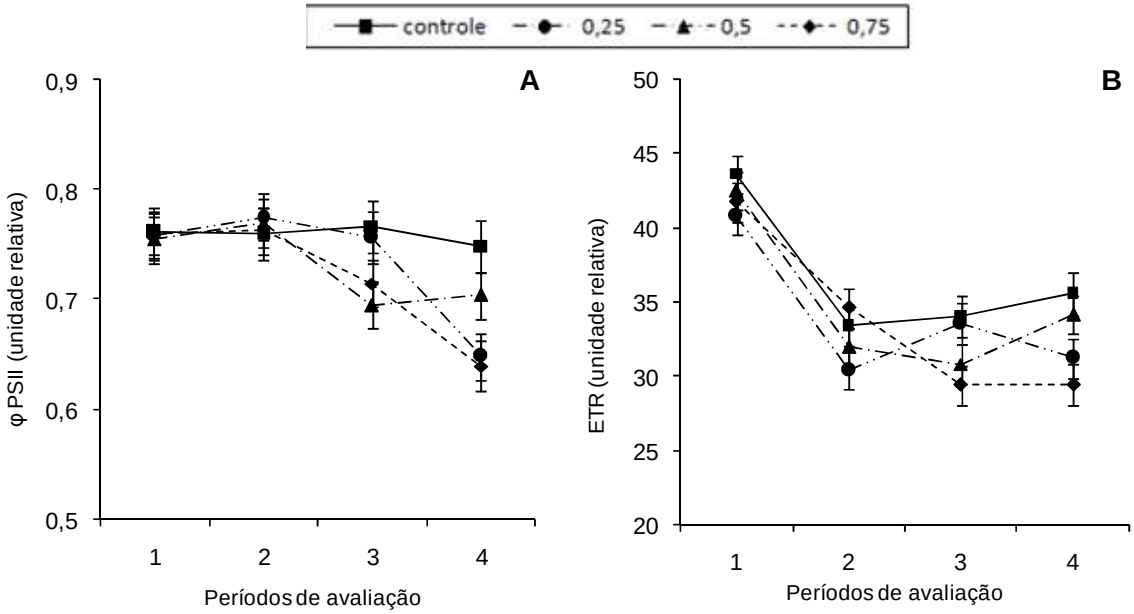


Figura 3. Rendimento quântico fotoquímico em estado adaptado a luz (ΦPSII) e taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR) de plantas de tomate em função de quatro aplicações das diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Barras representam o erro padrão da média de cinco repetições.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), nos tecidos foliares, aumentou linearmente (p=0,01) com o incremento das concentrações de acetato de chumbo, chegando a 54% na concentração mais elevada (Fig. 4A). Porém, nas raízes não foi verificado efeito significativo (p=0,4), sendo o maior aumento na atividade da enzima obtido na concentração de 0,5mM, na ordem de 32%, em comparação às plantas controle.

A atividade da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), nas folhas de tomate, diferiu significativamente entre os tratamentos, com tendências lineares (p<0,00001 e p=0,0005, respectivamente) (Fig. 4B e 4C). Ao final do experimento, a CAT teve sua atividade aumentada, em 78% no tratamento com 0,5mM de acetato de chumbo e 116% no tratamento com 0,75mM. O mesmo comportamento foi verificado para APX, ocorrendo incremento de aproximadamente 132% na concentração de 0,5mM e de 336% no tratamento com 0,75mM de acetato de chumbo, em comparação ao controle. Nas raízes a

CAT apresentou tendência cúbica (p=0,054), com aumento máximo, de 22%, obtido na concentração de 0,5mM de acetato de chumbo. No entanto, para APX a atividade praticamente não diferiu entre os tratamentos (p=0,29), com acréscimo máximo de 11% na concentração de 0,75mM de acetato de chumbo, quando comparado ao controle.

Em relação ao controle, as diferentes concentrações de acetato de chumbo elevaram significativamente a atividade da glutationa redutase (GR) nas folhas (linear, p=0,04), chegando a 66% na maior concentração do metal. Enquanto que nas raízes não houve efeito de tratamento (p=0,37), com pequeno decréscimo de 11%, quando comparado ao controle (Fig. 4D).

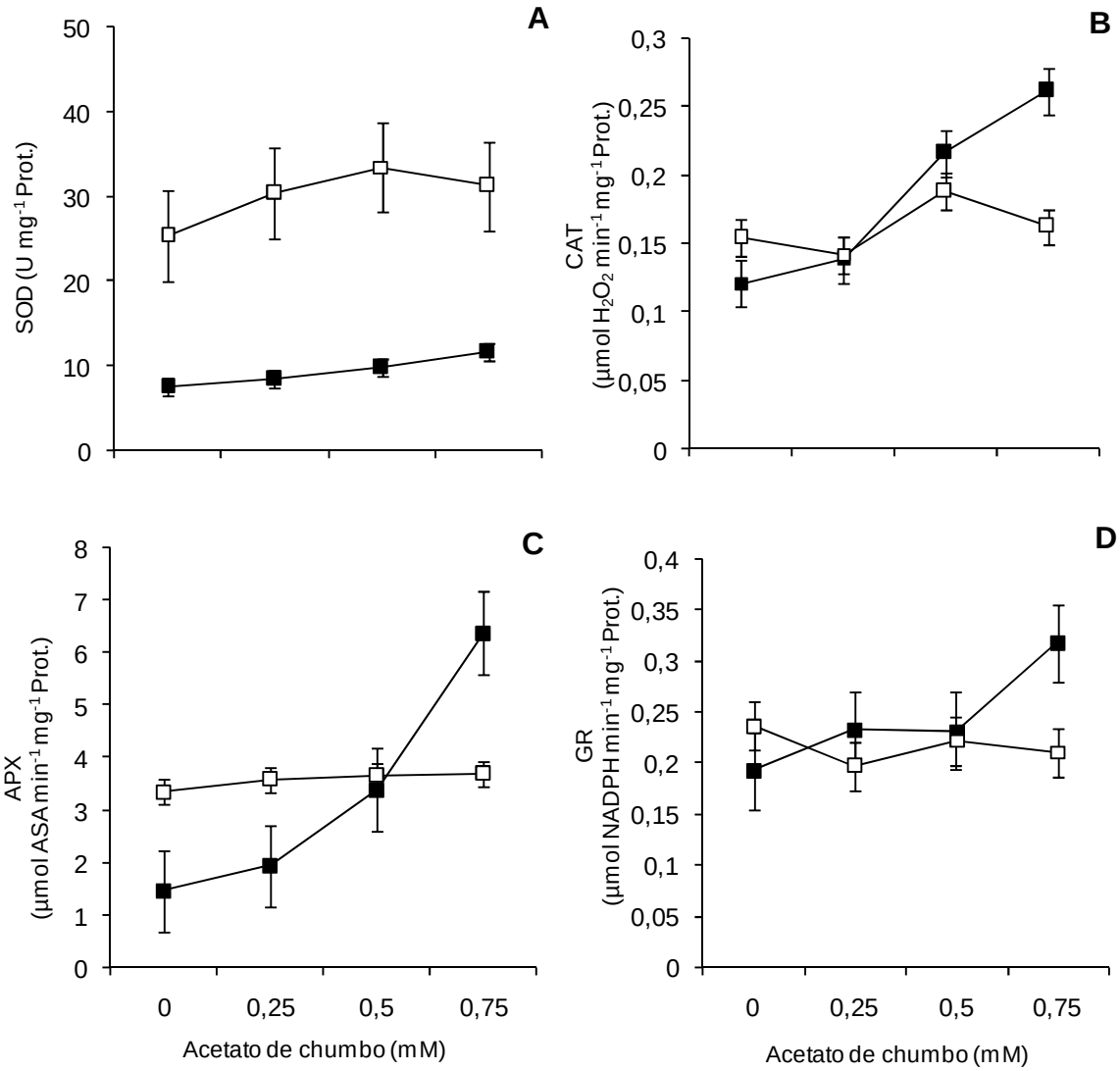


Figura 4. Atividade das enzimas SOD (A) CAT (B), APX (C) e GR (D) em folhas (■) e raízes (□) de plantas de tomate, aos 52 DAS, em função das diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Os teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas aumentou linearmente (p=0,0001) em torno de 77%, na concentração de 0,25mM chegando a 108% quando as plantas foram expostas à concentração 0,75mM de acetato de chumbo. Esta elevação no nível de H_2O_2 ocorreu também nas raízes (linear, p=0,02), embora de forma menos acentuada quando comparado às folhas. O maior acúmulo deste radical livre nas raízes foi verificado na concentração de 0,5mM, atingindo aumento significativo de 50%, em relação ao controle (Fig. 5A).

O grau de peroxidação de lipídeos, evidenciado pelo acúmulo de malonaldeído (MDA), nas folhas das plantas de tomate respondeu quadraticamente (p=0,01) quando expostas ao acetato de chumbo, com elevação em torno de 51% na concentração de 0,25mM, ocorrendo decréscimo nas demais concentrações, porém sempre com valores superiores ao controle. Enquanto, nas raízes o conteúdo de MDA aumentou continuamente (p=0,003), sendo que o maior acúmulo foi evidenciado na concentração mais elevada, onde houve acréscimo significativo de 307%, quando comparado ao controle (Fig. 5B).

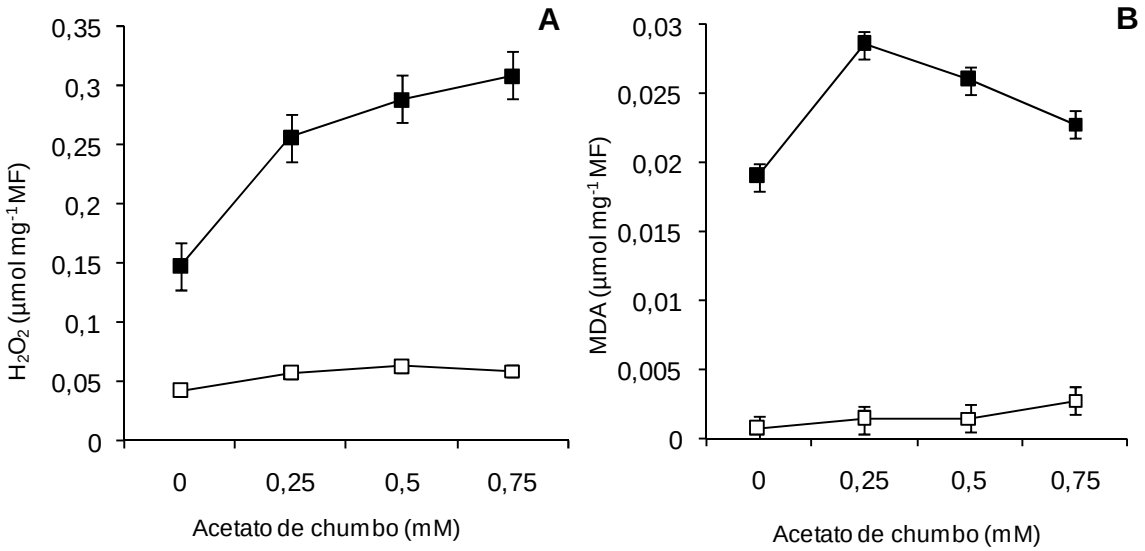


Figura 5. Conteúdo de H_2O_2 (A) e de MDA (B) em folhas (■) e raízes (□) de plantas de tomate, aos 52 DAS, em função das diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

4. DISCUSSÃO

O chumbo é considerado um dos elementos tóxicos mais abundantes exercendo efeitos adversos no processo fotossintético, na morfologia e crescimento de plantas, além de causar alterações na permeabilidade das membranas (SINGH et al., 1997; SHARMA; DUBEY, 2005)

No presente trabalho, o acetato de chumbo promoveu considerável redução em todos os parâmetros de crescimento (Fig. 1A, 1B, 1C e 1D), sendo o sistema de raízes mais comprometido pelas concentrações do metal do que a parte aérea, confirmando os resultados encontrados em plantas de arroz (*Oryza sativa*), pepino (*Cucumis sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) expostas ao Pb (VERMA; DUBEY, 2003; GONÇALVES et al., 2009; LAMHAMDI et al., 2011). A razão para a maior sensibilidade das raízes ao Pb, pode estar relacionada com o fato da raiz ser o primeiro órgão a entrar em contato com o metal e, consequentemente, acumular maior quantidade quando comparado a parte aérea (ROMEIRO et al., 2006). Ao penetrar nas células das raízes o Pb causa distúrbios na divisão celular, danos nos microtúbulos e/ou alterações no alongamento das células meristemáticas (EUN et al., 2000; SHARMA; DUBEY, 2005; SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008).

A redução significativa na área foliar das plantas expostas ao acetato de chumbo verificada neste estudo (Fig. 1D), também foi detectada em plantas de tansagem (*Plantago major*), as quais apresentam decréscimo de 61% na área foliar, quando expostas a 500mg kg^{-1} de Pb (KOSOBRUKHOV et al., 2004). Além disso, a diminuição da área foliar reduz a interceptação da energia luminosa refletindo negativamente no processo fotossintético e no crescimento.

Quanto ao índice de clorofila, o acetato de chumbo causou diminuição significativa nos seus valores no último dia de avaliação para todas as concentrações do metal (Fig. 2A). O declínio no conteúdo de clorofila em plantas crescidas em meio contendo Pb pode ocorrer devido à inibição de enzimas associadas a sua biossíntese, como a ALAD (δ-aminolevulínico desidratase), bem como pela ativação de clorofilases (CENKCI et al., 2011). Decréscimos no conteúdo de clorofila de plantas expostas ao Pb são descritas em arroz (*Oryza sativa*) (CHEN et al., 2007), e milho (*Zea mays*) (EKMEKC et al., 2009). Enquanto,

em plantas de pepino o chumbo não altera os níveis dos pigmentos cloroplastídicos (GONÇALVES et al., 2009).

Em virtude de uma pequena porção deste metal ser translocada para a parte aérea, acredita-se que os efeitos deletérios nesta parte da planta sejam indiretos que, no entanto, levam também a produção de espécies reativas de oxigênio. A produção dessas espécies reativas durante o processo fotossintético é estimada, indiretamente, pela variação de parâmetros de fluorescência e trocas gasosas (LIDON et al., 1999).

As plantas de tomate quando expostas ao acetato de chumbo, apresentaram reduções na condutância estomática (*g*s) e na taxa de transpiração (*T*r) (Fig. 2C e 2D). Segundo Romeiro et al. (2006), o declínio na taxa de transpiração em plantas expostas ao chumbo ocorre devido à redução da área foliar e/ou pelo decréscimo na condutância estomática. Resultados estes que confirmam os dados encontrados nesta pesquisa (Fig. 1D e 2C). As reduções na *g*s podem ter contribuído para a queda da taxa assimilatória líquida (*A*) (Fig. 2B), pois com o fechamento dos estômatos ocorre menor disponibilidade de CO_2 para a realização do processo fotossintético, devido ao incremento na resistência ao fluxo deste gás da atmosfera para o interior da folha.

Assim, a redução na taxa de assimilação do CO_2 decorrente da diminuição da condutância estomática, possivelmente levou ao acúmulo de energia (ATP) e poder redutor (NADPH), promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio, causada pelo desvio de elétrons para o oxigênio molecular, que gera oxigênio singleto ($^1O_2$) ou radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e pode danificar o aparato fotossintético (APEL; HIRT, 2004; CHEN et al., 2005). As análises enzimáticas do sistema antioxidante realizadas nesta pesquisa podem confirmar essa hipótese.

Somado a isto, a baixa utilização de ATP e NADPH no ciclo de Calvin, em virtude da diminuição da capacidade do metabolismo de carbono, pode fazer com que a energia luminosa absorvida pela clorofila no complexo antena do fotossitema II (FSII) não seja aproveitada na fase fotoquímica, tendo como consequência um aumento da sua reemissão na forma de fluorescência ou dissipação térmica, resultando na redução da eficiência fotoquímica do FSII (KITAO et al., 1997; SUBRAHMANYAM; RATHORE, 2000).

Neste contexto, a técnica de fluorescência da clorofila *a* pode ser usada para medir a eficiência do FSII, na fase fotoquímica da fotossíntese. O rendimento

quântico fotoquímico (ΦPS2) é um parâmetro utilizado para medir a proporção de luz absorvida pela clorofila associada ao FSII e utilizada nos processos fotoquímicos e, como tal fornecer uma estimativa da taxa de transporte de elétrons linear, indicando a fotossíntese como um todo (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

A taxa de transporte de elétrons (TRE) apresentou decréscimo já na segunda análise, porém essa redução não estaria ainda relacionada com o ΦPS2, pois até a segunda avaliação, este parâmentro se manteve praticamente inalterado. Essas reduções nos valores de TRE pode ser devido a alguma alteração na capacidade de oxirredução ao longo da cadeia. Provavelmente, as plantas de tomate apresentaram nessa fase, um eficiente sistema de dissipação de energia em excesso, possibilitada pelo ciclo da xantofila, cuja ação fotoprotetora ocorre nos complexos coletores de luz do FSII (HORTON et al., 1996).

No entanto, durante as avaliações finais, a redução na TRE, verificada principalmente na concentração de 0,75mM de acetato de chumbo, acompanhou o padrão de resposta do ΦPS2 (Fig. 3A e 3B), indicando danos no FSII, como reflexo de uma provável alteração estrutural nas membranas dos tilacoides induzidas por espécies reativas de oxigênio (KONRAD et al., 2005).

Ainda, considerando no último periodo de avaliação, o pequeno decréscimo tanto do ΦPS2 (13%) como da TRE (17%) e a redução substancial de *A* (55%), quando as plantas foram expostas a concentração mais elevada de acetato de chumbo, pode-se inferir que tenha ocorrido aumento do ciclo fotorrespiratório, atuando como dreno alternativo do poder redutor gerado pelas reações fotoquímicas. Em plantas C3 a fotorrespiração pode ser uma alternativa para ajudar a consumir parte considerável do fluxo de elétrons quando a disponibilidade de CO_2 nos cloroplastos está limitada, protegendo o aparato fotossintético (HEBER et al.,1996). No entanto, este processo ocasiona aumento no conteúdo de H_2O_2 nos peroxissomos, fato que pode ser verificado pela análise de conteúdo desta espécie reativa de oxigênio nos tecidos foliares das plantas de tomate (Fig.5A).

Estes resultados mostraram que o FSII não foi o principal sítio afetado pelo estresse por chumbo e sim, a fase de assimilação do CO_2, devido ao seu baixo nível no mesofilo ocasionado pela redução na condutância estomática. Logo,

decréscimos na eficiência fotoquímica do FSII pode ser consequência da redução na atividade bioquímica da fotossíntese, em virtude da baixa exigência por poder redutor, formados na fase fotoquímica, para a manutenção das reações no estroma.

Padrão de resposta semelhante é encontrado em plantas de ervilha após 24 horas de exposição ao chumbo, onde a significativa redução da taxa assimilatória líquida está diretamente relacionada com a diminuição da condutância estomática (PARYS et al., 1998). Além disso, esses mesmos autores afirmam que o chumbo causa pequena redução na eficiência quântica do FSII, confirmando o resultado ocorrido nas plantas de tomate. Entretanto, em plantas de pepino o chumbo não tem efeito nocivo na condutância estomática (BURZYŃSKI; KŁOBUS, 2004).

Como o excesso de metais pesados promove estresses oxidativos, a ativação do sistema antioxidante pode ser uma estratégia adotada pelas plantas para tentar superar possíveis danos gerados pelo estresse (MALECKA et al., 2001; CHOUDHURY; PANDA, 2005). Porém, tanto os danos como a ativação, ocasionada por metais pesados, ainda é um pouco contraditória e depende do tipo de metal, bem como do tempo de exposição e da espécie da planta (EDERLY et al., 2004)

A superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SINHA, 2006). Neste estudo, a atividade da SOD nas folhas aumentou gradualmente com o incremento na concentração de acetato de chumbo (Fig. 4A). Possivelmente, devido ao aumento nos níveis de $O_2^{\bullet -}$ ocasionado pelo estresse por acetato de chumbo, o que promoveu aumento na expressão do gene para biossíntese da SOD. Resposta semelhante foi encontrada em plantas de trigo e pepino crescidas em meio contendo chumbo (DEY et al., 2007; GONÇALVES et al., 2009).

O aumento no conteúdo de H_2O_2, oriundo da dismutação dos radicais superóxidos pela ação da SOD ou por outros processos como a fotorrespiração (DEY, et al., 2007; IGAMBERDIEV; LEA, 2002), com o incremento no nível do metal, causou elevação da atividade da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) nas folhas (Fig. 4B e 4C), com o intuito de tentar manter baixo o conteúdo desta espécie reativa de oxigênio. Também, em plantas de pepino o chumbo

eleva significativamente a atividade da CAT, entretanto o mesmo não é observado para APX nessa espécie (GONÇALVES et al., 2009).

A CAT está presente nos peroxissomos e age decompondo o H_2O_2 em oxigênio molecular e água (MOLLER et al., 2007). A APX e GR são enzimas que pertencem ao ciclo ascorbato-glutationa. A APX é também responsável pela degradação do H_2O_2, utilizando o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água, o que gera monodehidroascorbato que requer nova regeneração para que não ocorra a paralisação do ciclo metabólico da glutationa (FOYER; NOCTOR, 2005). Uma das enzimas responsável por esta regeneração é a GR, que restaura a glutationa reduzida (GSH), molécula necessária para manter a APX ativa (NOCTOR; FOYER, 1998; ASADA, 1999).

Em virtude de a CAT estar ausente nos cloroplastos, a degradação do H_2O_2 nesta organela é feito pela APX, associada às membranas do tilacoide (FOYER et al., 1994). Logo, a alta atividade de ambas as enzimas nos tecidos foliares, pode ser um indício do estresse ocasionado pelo acetato de chumbo, afetando também os cloroplastos das plantas de tomate.

A capacidade de manter a atividade da SOD, CAT e APX, em níveis elevados, sob condições de estresse ambiental, é essencial para que haja equilíbrio entre a formação e remoção de H_2O_2 do ambiente intracelular (ZHANG; KIRKAM, 1996; MATÉS, 2000). Por outro lado, sob condições estressantes a formação de radicais livres pode exceder a capacidade de sua remoção, culminando assim, em estresse oxidativo (YU; RENDEL, 1999; BENAVIDES et al., 2005). Nesta pesquisa, mesmo que a atividade da CAT e APX nos tecidos foliares, tenha sido significativamente aumentada sob estresse por acetato de chumbo (Fig. 4B e 4C), pode não ter sido suficiente para reduzir o H_2O_2 formado, uma vez que foi verificado aumento significativo no nível desta espécie reativa (Fig. 5A). Similarmente, em plântulas de tremoço (*Lupinus luteus*) foram detectados aumentos tanto da atividade de peroxidases como no conteúdo de H_2O_2 em todas as partes das plantas, quando estas são expostas ao chumbo. (PRZYMUSINSKI et al., 2007).

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana são altamente sensíveis ao ataque do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Logo, a peroxidação lipídica mediada, pela ação de radicais livres, pode ser utilizada como indicador da prevalência do estresse oxidativo (KAPPUS, 1985). Neste estudo, a peroxidação

lipídica foi significativamente aumentada (Fig. 5B). É importante ressaltar que, o decréscimo na assimilação do CO_2, relatado anteriormente, pode ter desviado o fluxo de elétrons para a redução do O_2 refletindo no aumento no grau de peroxidação lipídica (LEMOS FILHO, 2000). Nos tecidos foliares o pico no conteúdo de MDA foi detectado na menor concentração de acetato de chumbo utilizada (Fig. 5B), demonstrando que nas concentrações mais elevadas do metal, as enzimas antioxidantes atuaram na tentativa de limitar os danos oxidativos. Este resultado também é encontrado em plântulas de trigo após seis dias de exposição ao chumbo (DEY et al., 2007).

Entretanto, o mesmo não ocorreu nas raízes, onde a baixa atividade da SOD e CAT, principalmente na concentração mais elevada de acetato de chumbo (0,75mM) pode estar relacionada com o aumento bastante acentuado no nível de MDA (Fig. 5B) (VERMA; DUBEY, 2003). Ainda, segundo Cakmak e Horst (1991), a redução na atividade da CAT indica que, em plantas mantidas sob condições de estresse, o H_2O_2 gerado é mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo. Isso porque em células aeróbicas, via reação de Fenton ou Haber-weiss os radicais superóxidos e H_2O_2 reagem formando radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), que por sua vez atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados das membranas ocasionando a peroxidação dessas moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Além da SOD e CAT, a atividade da APX nas raízes também foi bastante limitada, o que provavelmente ocorreu devido ao decréscimo na atividade da GR, restringindo o conteúdo de GSH (Fig. 4C e 4D). Diferente do ocorrido nos tecidos foliares, onde houve aumento de 66% na atividade da GR (Fig. 4D) mantendo o pool de GSH e a atividade da APX.

Uma provável explicação para a redução na atividade da GR nas raízes, é a ligação do chumbo aos seus grupos sulfidrílicos (SH). Segundo Sharma e Dubey (2005), o chumbo tem alta afinidade com grupamentos SH formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre. Logo, a atividade da GR pode ser alterada se ocorrer interação deste metal com SH presente no sítio ativo da enzima. Resposta semelhante é encontrada em plântulas de arroz cv. Jaya, crescidas em meio contendo chumbo, ocorrendo aumento na atividade da GR nas folhas e redução nas raízes (VERMA; DUBEY, 2003). Ainda, neste mesmo trabalho, 1000µM de chumbo reduz a atividade da CAT indicando um retardo na

remoção de H_2O_2 e consequente aumento da peroxidação lipídica. Em experimento realizado por Gratão et al. (2008), também com plantas de tomate, a atividade da GR é reduzida tanto nas folhas como nas raízes quando expostas ao Cádmio. Em contrapartida, aumento significativo na atividade da CAT e SOD é verificado nas raízes de plantas de ervilhas (*Pisum sativum*) quando expostas ao chumbo (MALECKA et al., 2001).

5. CONCLUSÕES

O acetato de chumbo, nas concentrações utilizadas, possui efeito tóxico sobre plantas de tomate com redução significativa em ambas as partes da planta, sendo mais pronunciado nas raízes, bem como pela atuação do sistema antioxidante, o qual não é suficiente para impedir danos oxidativos ocasionados pelo metal, promovendo peroxidação lipídica das membranas. Além disso, a fase bioquímica da fotossíntese é mais sensível ao chumbo do que a fase fotoquímica, devido ao efeito direto do metal na condutância estomática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O chumbo é um metal pesado sem função conhecida e por este motivo pode ser tóxico para uma grande variedade de espécies. Nesta pesquisa, as concentrações de acetato de chumbo testadas demonstram efeito tóxico afetando o teor de clorofila, qualidade fisiológica das sementes e consequentemente seu crescimento inicial. Pelas análises ultraestruturais dos tecidos foliares e radiculares, os resultados verificados nesta pesquisa demostram que o Pb causa maiores alterações na parte aérea do que nas raízes. As altas concentrações de chumbo comprometem a ultraestrutura dos cloroplastos, evidenciado pela redução dos grãos de amido e distorções nos tilacoides, quando as plantas foram expostas a concentração mais elevada no metal. O fechamento estomático, de fato, representa a causa primária da redução na taxa fotossintética, na taxa de transpiração, e da produção de biomassa, sendo essas reduções consequencia da diminuição do suprimento de CO_2 no interior das folhas, limitando, desta forma, a fase fotoquímica em virtude da baixa necessidade de formação de poder redutor. Somado a isto, as enzimas antioxidantes atuam de maneira diferenciada nas folhas e raízes, fato este que explica o maior grau de peroxidação lipídica no sistema radical. Local onde a atividade dessas enzimas é baixa ou até mesmo reduzida, como no caso da glutationa redutase. Cabe ressaltar que, mesmo com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos foliares, ocorre peroxidação e acúmulo no conteúdo de H_2O_2 formado, excedendo a capacidade do sistema antioxidante, ocasionando danos oxidativos nas plantas de tomate.

REFERÊNCIAS

ABDEL-BASSET, R.M.; ISSA, A.A.; ADAM, M.S. Chlorophyllase activity: effect of heavy metals and calcium. **Photosynthetica**, v.31, p.421–425, 1995.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; COSTA, L.M.; OLIVEIRA, C.; VELOSO, A.C.X. Metais pesados em alguns solos e corretivos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.16, p. 271-276, 1992.

ANTOSIEWICZ, D.; WIERZBICKA, M. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. **Journal of Microscopy**, v.195, p.139-146, 1999.

ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C. **Chemical priciples of environmental pollution**, 2.ed. London: Chapman &Hall, 1997.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, **Journal of Experimental Botany**, v.53 p.1331-1341, 2002.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, Official methods of analysis. 10. ed. Washington: Editorial Board, 1965. 909p.

ARAVIND, P.; PRASAD, M.N.V. Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic systemusing *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, p.3-5, 2005.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chlroplast. Polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-14, 1949.

ASADA, K. The water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons.**Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v.50, p.601-639, 1999.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant physiology**, v.141, p.391-396, 2006.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY. Disponível em: http://www.atsdr.cdc.gov. Acesso em: junho, 2009.

AUSTIN, J.R.; FROST, E.; VIDI, P.A.; KESSLER, F.; STAEHELIN, L.A. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contains biosynthetic enzymes. **The Plant Cell**, v.18, p.1693-1703, 2006.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R.M.; SMITH, R. J.; LEA, P.J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type anda a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p. 280-292, 1998.

BAIRD, C. **Environental Chemestry**. 2.ed. New York: W.H. Freedman & Company, 2001.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, p.21-34, 2005.

BHATTACHARYA, M.; CHOUDHURI, M.A. Heavy metal ($Pb^{2+}$and Cd^{2+}) stress induced damages in Vigna seedlings and possible involvement of phytochelatin-like substances in mitigation of heavy metal stress. **Indian Journal Experimental Biology**, v.33, p.236-238, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.48-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 365p.

BURZYŃSKI, M.; KLOBUS, G. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. **Photosynthetica**, v.42, p.505-510, 2004.

CAMARGO, M.LP.; MORI, E.S.; MELLO, E.J.; ODA,S.; LIMA,G.P. Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, v.10, n.2, p.113-122, 2000.

CAMPBEL, A.G.; ZHANG, X.; TRIPEPI, R.R. Composting and evaluating a pulp and paper sludge for use as a soil amendment/ mulch. **Compost Science and Utilization**, v.84, p.84-95, 1995.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantatun**, v.83, n.3, p.463-468, 1991.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 260, p. 127-132, 1993.

CASSOL, D.; SILVA F.S.P.; FALQUETO, A.R.; BACARIN, M.A. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. **Photossynthetica**, v.46, p.634-636, 2008.

CENKCI, S.; CIGERCI, I.H.; YILDIS, M.; OZAY, C.;BOZDAG, A.; TERZI, H. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. **Environmental and Experimental Botany,** v.67, p.467-473, 2011.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Disponível em:http://www.cetesb.sp.gov.br .Acesso em: julho, 2009.

CHEN, L.S.; QI, Y.P.; LIU, X.H. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. **Annals of Botany**, v.96, p.35-41, 2005.

CHEN, J.; ZHU, C.; LI, L.P.; SUN, Z.Y.; PAN, X.B. Effects of exogenous salicylic acid on growth and H_2O_2 metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. **Journal of Environmental Sciences,** v.19, p.44-49, 2007.

CHOUDHURY, S.; PANDA, S.K. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. **Water, Air, Soil Pollution**, v.167, p.73–90, 2005.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Effect of cadmium on germination, almylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, v. 92, p.1-5, 1996.

CRAVO, M.S.; MURAOKA, T.; GINÉ, M.F. Caracterização química de compostos de lixo urbano de algumas usinas brasileiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, p. 547-553, 1998.

DEY, S.K.; DEY, J.; PATRA, S.; POTHAL, D. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. **Brazilian Journal Plant Physiolohy**, v.19, p.53-60, 2007.

DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant physiology**, v. 141, p. 330–335, 2006.

DEVI, R.; MUNJRAL, N.; GUPTA, A.K.; KAUR, N. Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p.167–174, 2007.

DJEBALI, W.; ZARROUK, M.; BROUQUISSE, R.; EL KAHOUI, S.; LIMAM, F.; GHORBEL, H.; CHAIB W. Ultra-structure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon sculentum*) chloroplast membranes. **Plant Biology**, v.7, p.358–368, 2005.

DUA, A.; SAWHNEY, S.K. Effect of chromium on activities of hydrolytic enzymes in germinating pea seeds. **Environmental and Experimental Botany**, v.31, p.133-139, 1991.

EDERLI, L.; LARA REALE, L.; FERRANTI, F.; PASQUALINI, S. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. **Physiologia plantarum**, v.121, p.66–74, 2004.

EICK, M.J.; PEAKBRADY, J.D.; P.V.; PESEK, J.D. Kinetics of lead absorption/desorption on goethite: residence time effect, **Soil Science**, v.164, p.28-39, 1999.

EKMEKC, I.Y.; TANYOLAC, D.; AYHAN, B. A crop tolerating oxidative stress induced by excess lead: maize. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.31, p.319–330, 2009.

ELARBI, M.B.; KHEMIRI, H.; JRIDI, T.; HAMIDA, J.B. Purification and characterization of α-amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds **Comptes Rendus Biologies**, v.332, p.426-432, 2009.

EUN, S.O.; YOUN, H.S.; LEE, Y. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*, **Physiologia Plantarum**, v.110, p.357-365, 2000.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 696 -717, 1994.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v.17, p.1866-1875, 2005.

GAUDE, N.; BREHELIN, C. TISCHENDORF, G. KESSLER F.; DORMANN P. Nitrogen deficiency in Arabidopsis affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. **The Plant Journal**, v. 49, p.729-739, 2007.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1997.

GONÇALVES, J.F.; BECKER, A.G.; PEREIRA, L.B.; ROCHA, J.B.T.; CARGNELUTTI, D.; TABALDI, A.L.; BATTISTI, V.;FARIAS, J.G.; FIORENZA, A.M.; FLORES, E.M.M.; NICOLOSO, F.T.; SCHETINGER, M.R.C. Response of Cucumis sativus L. seedlings to Pb exposure. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.21, p.175-186, 2009.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. **Functional plant Biology**, v.32 p.481-494, 2005.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZAVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium induced stress. **Annals of Applied Biology**, v.153, p.321-333, 2008.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; LÁZARO E.P.P.; MEDICI, L.O.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to Cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.387–394, 2009.

GUPTA D.K.; NICOLOSO F.T.; SCHETINGER M.R.; ROSSATO L.V.; PEREIRA L.B.; CASTRO G.Y.; SRIVASTAVA S.; TRIPATHI R.D. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *zea mays* seedlings under moderate lead stress. **Journal of hazardous materials**, v.172, p.479 – 484, 2009.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1999. FREE RADICALS IN BIOLOGY AND MEDICINE. OXFORD UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, USA.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006.

HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; GARBISU, C.; BARRUTIA, O.; BECERRIL, J.M. EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p.26–32, 2007.

HEBER, U.; BLIGNY, R.; STREB, P.; DOUCE, R. Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C3 plants against photoinactivation under sunlight. **Botanical Acta,** v.109, p.307-315, 1996.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils.** California Agricultural Experimental Station, 1938, circ.347, p.1-39.

HORTON P.; RUBAN, A.V.; WALTERS, R.G. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review of Plant Physiology an Plant Molecular Biology**, v.47, p.655-684, 1996.

HUANG, J.W.; CUNNINGHAM, S.D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. **The new phytologist**, v.134, p.75-84, 1996.

IGAMBERDIEV, A.U.; LEA P.J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. **Phytochemistry**, v.60, p.671-674, 2002.

ISCHEBECK, T.; ZBIERZAK, A. M.; KANWISCHER, M.; DORMANN, P. A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. **Journal Biological Chemistry**, v. 281, p.2470-2477, 2006.

ISLAM, E.; LUI, D.; LI, T.; YANG, X.; JIN, X.; MAHMOOD, Q.; TIAN, S. LI, J. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of Elsholtzia argyi. **Journal of Hazardous Materials**, v.154, p.914-926, 2008.

IVANOV, V.B.; BYSTROVA, E.I.; OBROUCHEVA, N.V.; ANTIPOVA, O.V.; SOBOTIK, M.; BERGMANN, H. Growth Response of Barley Roots as an Indicator of Lead Toxic Effects, **Angewandte Botanik**, v.72, p.140–143, 1998.

JARVIS, M.D.; LEUNG, D.W.M. Chelated lead transport in *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) link ssp. proliferus var. palmensis (H. Christ): an ultrastructural study. **Plant science**, v.161, p.433-441, 2001.

KABATA-PENDIAS, A., & PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 2.ed. New York: CRC PRESS, 365p. 1992.

KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 4.ed. Boca Raton, CRC Press, 2000. 331p.

KABIR, M.M.; IQBAL, Z.M.; SHAFIQ, Z.R.; FAROO, Q.I. Reduction in germination and seedling growth of Thespesia populnea L., caused by lead and cadmium treatments. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.2419-2426, 2008.

KAPPUS, H. Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance.In: Sies H (ed), Oxidative stress, Academic Press, London, 1985 p.273-310.

KAHLE, H. Response of roots of trees to heavy metals. **Environmental and Experimental Botany**, v.33, p.99-119, 1993.

KITAO, M.; LEI, T.T.; KOIKE, T. Effects of manganese toxicity on photosynthesis of white birch (*betula platyphylla* var. japonica) seedlings, **Physiologia Plantarum**. v.101, p.249-256, 1997.

KONRAD, M.L.; SILVA, J.A.B.; FURLANI, P.R.; MACHADO, E.C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v.64, p.339-347, 2005.

KOSOBRUKHOV, A. KNYAZEVA, I.; MUDRIK, V. Plantago major plants responses to increase content of lead in soil: Growth and photosynthesis. **Plant Growth Regulation,** v.42, p.145-151, 2004.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

KUKKOLA, E., HUTTUNEN, S. Structural observations on needles exposed to elevated levels of cooper and nickel. **Chemosphere**, v.36, p.727–732, 1998.

LAGE-PINTO, F.; OLIVEIRA, J.G.; DA CUNHA, M.; SOUZA, C.M.M.; REZENDE, C.E.; AZEVEDO, R.A. Chlorophyll a fluorescence and ultrastructural changes In chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.64 p.307-313, 2008.

LAMHAMDI, M.; BAKRIMA, A.; AARAB, A.; LAFONT, R.; SAYAH, F. Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth**. Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p.118-126, 2011.

LANE, S.D.; MARTIN, E.S. A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. **New Phytologist**, v.79, p.281-286, 1977.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. RiMa, São Paulo, 2000, 531p.

LEMOS–FILHO, J.P. Fotoinibição em três espécies de cerrado (*Annona crassifolia, Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e Na chuvosa. **Revista brasileira de botânica**, v. 23, p.45 –50. 2000.

LESPINAY, A.; LEQUEUX, H.L.N.; LAMBILLOTTE, B.; LUTTS, S. Protein synthesis is differentially required for germination in *Poa pratensis* and *Trifolium repens* in the absence or in the presence of cadmium*.* **Plant Growth Regulation**, v.61, p.205-214, 2010.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.

LIDON, F.C.; BARREIRO, M.G.; RAMALHO, J.C.; LAURIANO, J.A. Effects of aluminum toxicity on nutrient accumulation in maize shoots: implications on photosynthesis. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, p.397-416, 1999.

LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Micro Msk: a tomato genotype miniature size, short life cycle and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, v.167, p.753-757, 2004.

LIU, D.; XUE, E.P.; MENG, Q.; ZOU, J.; GU, J. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* L. **Plant Cell Reports,** v.28, p.695-702, 2009.

MAGNUS, F.B. **Toxic substances in the environment***.* New York: John Wiley & Sons Inc., 1994.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: metais pesados, mitos, mistificação e fatos.** São Paulo, Produquímica, 1994, 153 p.

MALECKA, A. JARMUSZKIEWICZ, W. TOMASZEWSKA, B. Antioxidant defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells, **Acta Biochimica Polonica**, v.48, p.687–698, 2001

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2nd edn. Academic press Inc., San Diego, CA, USA, 1995, 902 p

MARSCHNER, P.; GODBOLD, D.L.; JUTSCHHE, G. Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce (Picea abies (L.) karst.) **Plant Soil**, v.178, p.239-245, 1996.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83-104, 2000.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence – a pratical guide. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.659-668, 2000.

MIDDLETON, E.M.; TERAMURA, A.H.The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from UV-B damage. **Plant Physiology**, v.103, p.741-752, 1993.

MIHOUB, A.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (Pisum sativum L.). **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, p.33-41, 2005.

MIRANDA, M.G.; ILANGOVAN, K. Uptake of lead by *Lemna gibba* L. Influence on specific growth rate and basic biochemical changes. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.56, p.1000-1007, 1996.

MISHRA, A.; CHOUDHURI, M.A. Possible implications of heavy metals (Pb^{2+} and Hg^{2+}) in the free radical mediated membrane damage in two rice cultivars. **Indian Journal Plant Physiology**, v.1, p.40-43, 1996.

MISHRA, A.; CHOUDHURI, M. A. Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. **Biologia Plantarum,** v.41, p.469-473, 1998.

MISHRA, A.; CHOUDHURI, M. A. Monitoring of phytotoxicity of lead and mercury from germination and early seedling growth indices in to two rice cultivars. **Water, Air, and Soil Pollution** , v.114, p.339-346, 1999.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R. D.; KUMAR, R.; SETH, C. S.; GUPTA, D. K. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* l.) Involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere**, v.65, p.1027-1039, 2006.

MOLAS, J. Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic ni(ii) complex. **Environmental and Experimental Botany** v.47, p.115-126, 2002.

MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, nadph turnover and metabolism of reactive oxygen species. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 52, p. 561–591, 2001.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.;HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular co mponents in plants. **Annual review of plant biology**, v.58, p.459-481, 2007.

MOREIRA, F.R, MOREIRA, J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana Salud Pública**, v.15, p.119-29, 2004.

MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C.; MARTINS, A.F.; ROCHA, J.B.T. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on δ-aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. **Biology Plant**, v.45, p.85-89, 2002.

MOUSTAKAS, M.; LANARAS, T.; SYMEONIDIS, L.; KARATAGLIS, S. Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. **Photossynthetica**, v. 30, p.389-396, 1994.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascobate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione. Keeping active oxygen under control, Annual. **Review Plant Physiology**, v.499 p.249-279, 1998.

OBROUCHEVA, N.V.; BYSTROVA, E.I.; IVANOV, V.B.; ANTIPOVA, O.V.; SEREGIN, I.V. Root Growth Responses to Lead in Young Maize Seedlings. **Plant Soil**, v.200, p.55-61, 1998.

OLMOS, E., KIDDLE, G., PELLNY, T.K., KUMAR, S., FOYER, C.H. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1645–1655, 2006.

OUZOUNIDOU, G.; MOUSTAKAS, M.; ELEFTHERIOU, E. P. Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v.32, p.154-160, 1997.

PARYS; E., ROMANOWSKA, E.; SIEDLECKA, M.; POSKUTA, J.W. The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. **Acta physiologiae plantarum**, v.20, p. 313-322, 1998.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.52, p.199-223, 2004.

PAOLETTI, E.; RANIERI, A.; LAUTERI, M. Moving toward effective ozone flux assessment. **Environmental Pollution**, v.156, p.16-19, 2008.

PEREIRA, B.F.F. Potencial fitorremediador das culturas de feijão-de-porco, girassol e milho cultivadas em latossolo vermelho contaminado com chumbo. Campinas, 2005, 68p. Dissertação (mestrado) - Instituto Agronômico (IAC).

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, AGIPLAN, 1985. 289 p.

POWELL, R.L.; KIMERLE, R.A.; MOSER, E.M. Development of plant bioassay to assess toxicity of chemical stressors to emergent macrophytes. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.15, p.1570- 1576, 1996.

PRASAD, D.D.K.; PRASAD, A.R.K. Altered d-aminolevulinic acid metabolism in germinating seedling of Bajra (*Pennisetum typhoideum*). **Journal Plant Physiology**, v.127, p. 41–249, 1987a.

PRZYMUSIN´SKI, R; SOBKOWIAK R.R.; ILSKA, B.; GWO´Z´DZ, E.A. Organospecific responses of lupin seedlings to lead Localization of hydrogen peroxide and peroxidase activity. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.29, p.411-416, 2007.

RAUSER,W. E.; SAMARAKOON, A.B. Vein loading in seedlings of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nikel and zinc. **Plant Physiology**, v.65, p.578-583, 1980.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A.M.A.; FURLANI, P.R.; ABREU, C.A.; PEREIRA, B.F.F. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação De *Canavalia ensiformes* l. **Bragantia,** v.66, p.327-334, 2007.

ROHÁCEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v.40, p.13-29. 2002.

SABOURY, A.A.; KARBASSI, F. Thermodynamic studies on the interaction of calcium ions with alpha-amylase, **Thermochimica Acta**, v. 362, p.121-129, 2000.

SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RIO, L. A. Cadmium induced changes in growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal Experimental Botany**, v.52, p.2115-2126, 2001.

SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, p.104-114, 2005.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.38, p. 995-1014, 2005.

SHAFIQ, M.; IQBAL, M. Z. The toxicity effects of heavy metals on germination and seedling growth of *Cassia siamea*. Lamark. **Journal of New Seeds**, v.7, p.95-105, 2005.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, p.35-52, 2005.

SINHA, S.; SAXENA, R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside-a content in medicinal plant bacopa monnieri l. **Chemosphere**, v.62, p.1340-1350, 2006.

SINGH, R.P.; TRIPATHI, R.D.; SINHA, S.K.; MAHESHWARI, R., SRIVASTAVA, H.S. Response of higher plants to lead contaminated environment. **Chemosphere** v.34, p.2467–2493,1997.

SINGH, S.; SINHA, S.; SAXENA, R.; PANDEY, K.; BHATT, K. Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: evidence for involvement of antioxidants. **Chemosphere** , v.57, p.91-99, 2004.

SEREGIN, I.V.; IVANOV, V.B. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.48, p.523-544, 2001.

SEREGIN, I.V., SHPIGUN, L.K., AND IVANOV, V.B., Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots, **Russian Journal of Plant Physiology**, v.51, p. 525-533, 2004.

SEREGIN, A.D.; KOZHEVNIKOVA. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium, **Russian Journal of Plant Physiology**, v.55, p.1-22, 2008.

SHAH, K.; KUMAR, R.G.; VERMA, S.; DUBEY, R.S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, **Plant Science**, v.161, p.1135-1144, 2001.

SPINOLA, M.C.M.; CICERO, S.M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agricola**, v.57, p.263-270, 2000.

STAIGER, C.J. Signalling to the actin cytoskeleton in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant molecular Biology**, v. 51, p.257-288, 2000.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach**. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, NY, 1980.

SUBRAHMANYAM, D.; RATHORE, V.S. Influence of manganase toxicity on photosynthesis in ricebean (Vigna umbellata) seedlings. **Photosynthetica,** v.38, p.449-453, 2000.

TAN, K.H. **Environmental soil science**. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc. 2000, 452p.

TANG, Y.T., QIU, R.L., ZENG, X.W., YING, R.R., YU, F.M., ZHOU, X.Y. Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p.126-134, 2009.

VAJPAYEE, P.; TRIPATHI, R.D.; RAI, U.N.; ALI, M.B.; SINGH, S.N.; Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L.. **Chemosphere**, v.41, p.1075–1082, 2000

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v.151, p.59-66, 2000.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science,** v.164, p.645-655, 2003.

VIDI, P.A.; KANWISCHER, M.; BAGINSKY, S.; AUSTIN, J.R.; CSUCS, G.; DORMANN, P.; KESSLER, F.; BREHELIN, C. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. **Journal Biological Chemistry**, v.281, p.11225-11234, 2006.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p.1428-1438, 2010.

YU, Q.; RENDEL, Z. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutase in narrow-leafed lupines. **Plant Science**, v.142, p.1-11, 1999.

ZACCHINI, M.; REA, M.; TULLIO, M.; DE AGAZIO, M. Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.49-54, 2003.

ZHANG, J.; KIRKAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, v.149: p. 498-493, 1996.

WALLACE, G.A.; WALLACE, A. Lead and other potentially toxic heavy metals in soil. *Communications in* **Soil Science and Plant Analysis**, v.25, p.137-141, 1994.

WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of cucurbit phloem exudate reveals a network of defence proteins, **Phytochemistry** v.65, p.1795-1804, 2004.

WASTENEYS, G.O.; GALWAY, M.E. Remodelling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v.54, p.691-722, 2003.

WIERZBICKA , M. How lead loses its toxicity to plants**. Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.64, p. 81-90, 1995.

WIERZBICKA, M.; OBIDZIN´SKA, J. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. **Plant Science**, v.137, p.155-171, 1998.