

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURIAS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

Letícia Frizzo Ferigolo

INTERAÇÕES ENTRE FERRO E ZINCO EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN: PARÂMETROS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS

Santa Maria, RS
2017

Letícia Frizzo Ferigolo

**INTERAÇÕES ENTRE FERRO E ZINCO EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata*
(SPRENG.) PEDERSEN: PARÂMETROS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**

Orientador: Prof. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS
2017

Letícia Frizzo Ferigolo

INTERAÇÕES ENTRE FERRO E ZINCO EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata*
(SPRENG.) PEDERSEN: PARÂMETROS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agrobiologia

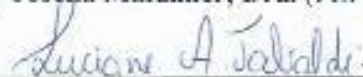
Aprovado em 10 de fevereiro de 2017:



Fernando Teixeira Nicoloso, Dr.
(Presidente/Orientador)



Joseila Maldaner, Dra. (FEPAGRO)



Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

OFEREÇO à minha família e amigos, esteios da minha caminhada. Sem vocês eu não conseguiria ter dado tantos passos importantes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder saúde e determinação, fundamentais para seguir em frente diante dos obstáculos da vida.

À minha família, em especial meus pais, Daniela Piccinin Frizzo e Mardeoni Ferigolo e minha tia Clarissa Frizzo, que sempre deram todo suporte para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Obrigado por todo apoio, amor, compreensão e por não me deixarem desistir.

Aos meus amigos, irmãos que a vida me deu, Bruno, Elisa, Débora, Ingrid, Mariana, Pedro, Regis pelos bons momentos que passamos juntos, paciência e ajuda nos momentos difíceis.

Agradeço ao Prof. Fernando Teixeira Nicoloso pela orientação, disponibilidade, atenção e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório Aniélen, Anderson, Bianca, Camila C., Camila T., Darlene, Jover, Mirian, Márcio, Melissa, Nassif, Ruziele, Mariane e Raíssa agradeço muito mais que o auxílio nos experimentos e análises, agradeço a amizade e todos bons momentos que passamos juntos e que tornaram esse período muito especial.

Ao professor Felipe Ricachenevsky e a professora Luciane Almeri Tabaldi pelos ensinamentos que contribuíram para a realização deste trabalho e aos demais professores que de uma forma ou outra ajudaram no meu crescimento pessoal. A Dra. Júlia Farias pelas inúmeras contribuições e por me inspirar.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Agradeço também a CAPES/CNPQ por me conceder uma bolsa para realização da presente pesquisa.

EPÍGRAFE

*“Tenho a impressão de ter sido uma
criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma
pedrinha mais lisa ou uma concha
mais bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos”.*

Isaac Newton

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

INTERAÇÕES ENTRE FERRO E ZINCO EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN: PARÂMETROS MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS

AUTORA: LETÍCIA FRIZZO FERIGOLO

ORIENTADOR: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2017.

Apesar da ocorrência natural de metais pesados em baixas concentrações no solo, o aumento dessas concentrações causado, principalmente, por atividades antropogênicas como o uso de fertilizantes e pesticidas na agricultura, é extremamente nocivo, podendo causar danos à saúde humana e de animais pela ingestão. Apesar disso, poucos estudos relacionam os efeitos da interação entre metais pesados, situação de ocorrência comum na natureza. Nesse estudo, os efeitos da interação entre ferro (Fe) e zinco (Zn) foram estudados com o objetivo de avaliar sua influência na produção de massa seca, no sistema antioxidante, em parâmetros fotossintéticos e biométricos radiculares, bem como de classificar os acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen de acordo com seu nível de tolerância ao excesso de Zn, Fe e sua resposta à interação desses metais em sistema hidropônico. Os tratamentos consistiram da combinação trifatorial entre três níveis de Fe (50, 700 e 1400 μM), três níveis de Zn (2, 200 e 400 μM) e três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB), totalizando nove tratamentos. Dez plantas de cada acesso permaneceram em cultivo por 21 dias em contato com a solução nutritiva. Os três acessos apresentaram redução da massa seca de parte aérea de raízes, tanto devido ao excesso de Fe, quanto ao excesso de Zn. Notavelmente, o excesso de Fe apresentou um maior impacto na redução dos parâmetros radiculares e no aumento na peroxidação lipídica dos três acessos em relação ao excesso de Zn. No entanto, foi possível observar grande variabilidade entre os acessos. O acesso BRA mostrou-se mais sensível, tanto ao excesso de Fe quanto ao excesso de Zn, com redução de aproximadamente 90% no comprimento radicular na condição de excesso de Fe e sem resposta positiva à interação. A interação entre os altos níveis de Fe e Zn foi especialmente positiva para o acesso GD, que mesmo em condição de excesso desses foi capaz de manter a produção de massa seca e a robustez do sistema radicular, sugerindo a possibilidade de seu uso em áreas de contaminação.

Palavras chave: ginseng brasileiro, metais pesados, toxidez, biometria radicular, sistema antioxidante.

ABSTRACT

Master Dissertation
Agrobiology Graduate Program
Universidade Federal de Santa Maria

IRON AND ZINC INTERACTIONS IN ACCESSIONS OF *Pfaffia glomerata* (Spreng.) PEDERSEN: MORFOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS

AUTHOR: LETICIA FRIZZO FERIGOLO

ADVISER: FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO

Date and Place of Presentation: Santa Maria, February 10 2017.

Despite the natural occurrence of heavy metals in low concentrations in the soil, the increase in these concentrations caused mainly by anthropogenic activities such as the use of fertilizers and pesticides in agriculture, is extremely harmful and can cause damage to human and animal health by ingestion. Despite this, few studies have related the effects of the interaction between heavy metals, a situation of common occurrence in nature. In this study, the effects of the interaction between iron (Fe) and zinc (Zn) were studied with the aim of evaluating their influence on dry matter production, antioxidant system, photosynthetic parameters and root biometric parameters, as well as to classify *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen according to their level of tolerance to Zn, Fe excess and their response to the interaction of these metals in hydroponic system. The treatments consisted of three levels of Fe (50, 700 and 1400 μM), three Zn levels (2, 200 and 400 μM) and three accessions of *P. glomerata* (GD, BRA and JB), totaling nine treatments. Ten plants of each access remained in cultivation for 21 days in contact with the nutrient solution. The three accessions presented a reduction of the dry mass of root shoot, both due to the excess of Fe and to the excess of Zn. Notably, the excess of Fe presented a greater impact in the reduction of the root parameters and in the increase in the lipid peroxidation of the three accessions in relation to the excess of Zn. However, it was possible to observe great variability between the accesses. BRA access was more sensitive to both Fe excess and Zn excess, with a reduction of approximately 90% in root length in the condition of Fe excess and no positive response to the interaction. The interaction between the high Fe and Zn levels was especially positive for the GD access, which even in the excess condition, was able to maintain the dry mass production and the robustness of the root system, suggesting the possibility of its use in areas of contamination.

Key words: Brazilian ginseng, heavy metals, toxicity, root biometry, antioxidant system.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Massa seca de parte aérea (A, B e C) e massa seca total da planta (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).38
- Figura 2** Área foliar (A, B e C) e comprimento da parte aérea (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).40
- Figura 3** Peroxidação lipídica (nM MDA/ mg proteína) de folhas de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe; e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).45
- Figura 4** Atividade da enzima superóxido dismutase ($U\ mg^{-1}proteína$) em raízes de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).48
- Figura 5** Taxa de transpiração ($mmol\ H_2O\ m^{-2}s^{-1}$) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe; e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$). 51
- Figura 6** Massa seca de parte aérea (A, B e C) e massa seca total da planta (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).64

Figura 7 Volume radicular (A, B e C) e diâmetro radicular da planta (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe; e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Massa seca de raízes (g planta^{-1}) de três acessos de <i>P. glomerata</i> (GD, BRA JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.	38
Tabela 2 Concentração de clorofila a (mg g^{-1} massa fresca) e concentração de clorofila total (mg g^{-1} massa fresca) em folhas de três acessos de <i>P. glomerata</i> (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.....	42
Tabela 3 Concentração de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ massa fresca) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de três acessos <i>P. glomerata</i> (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.....	44
Tabela 4 Peroxidação lipídica (nM MDA/ mg proteína) de raízes de três acessos de <i>P. glomerata</i> (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.	46
Tabela 5 Atividade da enzima superóxido dismutase (U mg^{-1} proteína) em folhas de três acessos <i>P. glomerata</i> (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.....	47
Tabela 7 Taxa de assimilação líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência do uso da água ($\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$) de três acessos de <i>P. glomerata</i> (GD, BRA e JB) cultivados em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.....	50
Tabela 8 Massa seca de raízes (g planta^{-1}) de três acessos de <i>P. glomerata</i> (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.	64
Tabela 9 Comprimento radicular (cm planta^{-1}) e área superficial ($\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$) de três acessos de <i>P. glomerata</i> (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três concentrações de Fe e Zn.	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	REFERÊNCIAS	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE <i>Pfaffia glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN ...	19
3.2	EFEITO DE METAIS EM <i>P. glomerata</i>	20
3.3	FERRO: FUNÇÕES NA PLANTA E INTERAÇÕES COM OUTROS METAIS	21
3.4	ZINCO: FUNÇÕES NA PLANTA E INTERAÇÃO COM OUTROS METAIS	23
3.5	INTERAÇÕES ENTRE FERRO E ZINCO	24
3.6	REFERÊNCIAS	25
4	EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FERRO E ZINCO NO CRESCIMENTO, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FOTOSINTÉTICOS DE TRÊS ACESSOS DE <i>Pfaffia glomerata</i>	32
4.1	INTRODUÇÃO	32
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.2.1	Material vegetal e condições de crescimento	34
4.2.2	Produção de massa seca	34
4.2.3	Comprimento das plantas e área foliar	35
4.2.4	Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio	35
4.2.5	Estimação da peroxidação lipídica	35
4.2.6	Atividade de enzimas antioxidantes	35
4.2.7	Parâmetros fotossintéticos	35
4.2.8	Concentração de clorofilas e carotenoides	36
4.2.9	Análise Estatística	36
4.3	RESULTADOS	36
4.3.1	Massa Seca	36
4.3.2	Área Foliar e comprimento da parte aérea	39
4.3.3	Concentração de clorofilas	40
4.3.4	Concentração de peróxido de hidrogênio	43
4.3.5	Peroxidação lipídica	45
4.3.6	Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	46
4.3.7	Parâmetros fotossintéticos	48
4.4	DISCUSSÃO	51
4.5	CONCLUSÃO	55
4.6	REFERÊNCIAS	55
5	EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FERRO E ZINCO EM PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E BIOMÉTRICOS DE RAÍZES DE TRÊS ACESSOS DE <i>Pfaffia glomerata</i>	59

5.1 INTRODUÇÃO	59
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	61
5.2.1 Material vegetal e condições de crescimento	61
5.2.2 Produção de massa seca e biometria radicular	62
5.2.3 Análise Estatística	62
5.3 RESULTADOS.....	62
5.3.1 Massa seca	62
5.3.4 Parâmetros biométricos radiculares	65
5.4 DISCUSSÃO	69
5.5 CONCLUSÃO	72
5.6 REFERÊNCIAS.....	72
6 CONCLUSÃO GERAL	76
7 APÊNDICES	77

1 INTRODUÇÃO GERAL

Mesmo que os metais pesados ocorram naturalmente nos solos, atividades antropogênicas como a agricultura, urbanização, industrialização e mineração contribuem para o aumento da concentração desses elementos (FACCHINELLI et al., 2001). Vários estudos confirmam que essas atividades antropogênicas são as principais fontes de contaminação por metais pesados (WEI & YANG, 2010).

A contaminação por metais pesados é disfarçada, persistente e irreversível (WANG et al., 2001). Esse tipo de poluição não afeta a qualidade do ar atmosférico, mas atinge corpos d'água e o cultivo de alimentos, o que ameaça a saúde e o bem-estar dos seres vivos (DONG et al., 2011; NABULO et al., 2010; WANG et al., 2001). Nas últimas décadas, a poluição por metais pesados tornou-se um grave problema em diversas partes do mundo (FACCHINELLI et al., 2001; SOLGI et al., 2012).

Dentre esses metais, o ferro (Fe) e o zinco (Zn) são essenciais às plantas, estando envolvidos em processos metabólitos diversos e em reações de oxidação-redução. Entre esses processos, possuem papel determinante na fotossíntese, biossíntese da clorofila e na formação de enzimas fundamentais a todos os processos vegetais, inclusive nos diversos sistemas de defesa contra o estresse (MARSCHNER, 1995; BROADLEY et al., 2007).

Nem todas as espécies vegetais possuem a capacidade de se desenvolverem em ambientes contaminados por metais pesados. Além disso, podem ocorrer diferentes níveis de tolerância entre genótipos de uma mesma espécie, portanto, é necessário conhecer o comportamento da espécie e seus genótipos quando expostos a um contaminante (MARQUES et al., 2011). Em geral essa diferença entre espécies ou genótipos tolerantes a toxidez está relacionada a eficiência do sistema detoxificante que essas possuem, eficiência essa que reflete na maior ou menor capacidade de produção de matéria seca. Essa resposta pode ser avaliada de diversas formas, como, por exemplo, a avaliação da capacidade de crescimento e produção de biomassa na presença de níveis crescentes do contaminante no solo (MARQUES et al., 2006; ROSA, 2006).

A *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, popularmente conhecida como ginseng brasileiro, é uma espécie medicinal amplamente estudada e promissora na indústria de fitoterápicos e suplementos alimentares, pois apresenta atividades parecidas com as do ginseng coreano (MAGALHÃES, 2000; ZIMMER et al., 2006). Essa espécie possui grande diversidade

genética em populações naturais, o que resulta em significativa variabilidade em relação ao nível de tolerância a diferentes metais (KAMADA et al., 2009).

Em relação à tolerância de *P. glomerata* para metais, pesquisas realizadas anteriormente demonstram que a espécie apresenta tolerância moderada a alta para metais como o alumínio, mercúrio e cádmio (MALDANER, 2008; CALGAROTO, 2009; SKREBSKY et al., 2008). Bernardy et al. (2016) relatou que um dos acessos estudados apresentou tolerância ao excesso de Zn.

Os estudos da nutrição mineral são de fundamental importância para a agricultura e para a saúde humana, uma vez que consideram algumas questões que são ainda pouco elucidadas, como o processo de acúmulo de metais pesados. Do ponto de vista nutricional, na presença de excesso de um elemento mineral pode ocorrer competição com os demais presentes no meio. Dessa forma, as plantas precisam coordenar a homeostase desses elementos para evitar desequilíbrios iônicos (PINEAU et al., 2012). Em *A. thaliana*, a toxidez por Zn causa redução na absorção e acúmulo do Fe, o que indica uma competição entre esses metais pela absorção radicular (FUKAO et al., 2011; SHANMUNGAM et al., 2011).

O excesso do Zn no solo pode causar redução no crescimento das plantas (ANDRADE et al., 2009), redução na quantidade e comprimento das raízes, indução de cloroses foliares (BROADLEY et al., 2007; WANG et al., 2009), redução da taxa fotossintética devido a inibição da biossíntese de clorofila e diminuição da assimilação de carbono (CHEN et al., 2008; DHIR et al., 2008). Além disso, o excesso de Zn aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais inibem ou aumentam a atividade enzimática (GRATÃO et al., 2005; LIN et al., 2005).

Sob a condição de toxidez de Fe há indução da formação de EROs (JUCOSKI et al., 2013; SILVEIRA et al., 2007) causando severas reduções no crescimento e na produtividade das plantas. As EROs apresentam diferentes níveis de reatividade, sendo a disponibilidade de Fe^{2+} livre na célula considerada como um determinante para a toxicidade de EROs. Isso está relacionado, principalmente, ao papel do Fe na reação de Fenton, a qual forma radicais hidroxila a partir do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Segundo Mittler et al. (2017) existe um nível basal de EROs que precisa ser mantido pela célula, pois é necessário para manter processos básicos como proliferação e diferenciação celular. No entanto, a produção de EROs em um nível superior ao basal causa a intensificação do estresse oxidativo. O acúmulo de EROs devido a estresses ambientais é uma das principais causas de perda de produtividade dos cultivos no mundo (MITTLER, 2002). O sistema enzimático de defesa antioxidativo é composto de enzimas como a superóxido dismutase

(SOD), catalase (CAT), peroxidases não específicas (POD) e ascorbato peroxidase (APX) que atuam eliminando EROs.

Os efeitos biológicos dos metais individualmente já são razoavelmente conhecidos, no entanto, as combinações de metais pesados são extremamente comuns na natureza e os efeitos dessas combinações ainda necessitam mais estudos (WILDE et al., 2006; CVJETKO et al., 2010). A interação negativa entre Fe e Zn pode ser explicada por suas características semelhantes em relação a solubilidade no solo e pela competição por transportadores e translocação (MARSCHNER, 2012).

Tendo em vista o aumento das contaminações ambientais pelo excesso de metais pesados como o Fe e o Zn, torna-se de extrema importância o estudo do excesso desses elementos sobre processos fisiológicos em espécies vegetais, bem como os possíveis efeitos da interação entre eles e outros mecanismos adotados para contornar essa situação de estresse. Sendo a *P. glomerata* já utilizada como planta modelo para estudos sobre o efeito de metais, com diversos relatos sobre o comportamento de diferentes acessos dessa espécie em relação a alguns metais pesados.

1.1 REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. A. L. et al. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. **Chemosphere**, v.75, n.10, p.1363–1370, 2009.

BERNARDY, K et al. Changes in root morphology and dry matter production in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions in response to excessive zinc. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 2, p. 613-620, 2016.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**. v.173, n.4, p.677-702, 2007.

CALGAROTO, N.S. **Efeitos fisiológicos do mercúrio em plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

CHEN, W. et al. Differential changes in photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, v.132, n.1, p.89-101, 2008.

CVJETKO, P.; TOLIC, S.; ŠIKIĆ, S.; BALEN, B.; TKALEC, M. et al. Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, p. 287–296, 2010.

DHIR, B.; SHARMILA, P.; PARDHA SARAD, P. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, n.1, p.61-70, 2008.

DONG, J.; YANG, Q. W.; ZENG, Q.; LIU, S. J.; PAN, J. et al. Assessing the concentration and potential dietary risk of heavy metals in vegetables at Pb/Zn mine site. **Environmental Earth Sciences**, v. 64, p. 1317-1321, 2011.

FACCHINELLI, A.; SACCHI, E.; MALLEEN, L. Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metals sources in soils. **Environmental Pollution**, v. 24, p. 114-313, 2001.

FUKAO, Y. et al. iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1893-1907, 2011.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.

KAMADA, T. et al. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.3, p.403-409, 2009.

JUCOSKI, G. O. et al. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. plants. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 35, p. 1645-1657, 2013.

LIN, C.; CHANG, H.; HUANG, H. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.963-968, 2005.

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para o cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J. V. et al. **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, p.323-332, 2000.

MALDANER, R. **Toxidez de alumínio em genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MARQUES, M., AGUIAR, C. C. R, Da SILVA, J. J. L. S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.1, p.1-11, 2011.

MARQUES, M.; ROSA, G. S.; AGUIAR, C. C. R. Plants with potential for phytoremediation of oil-contaminated soil based on germination and biomass growth. In: **workshop on management of industrial toxic waste**, 8 p., 2006.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 2v.

- MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 2012. 3v.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n.1, p. 11-19, 2017.
- NABULO, G.; YOUNG, S. D.; BLACK, C. R. Assessing risk to human health from tropical leafy vegetables grown on contaminated urban soils. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 5338-5331, 2010.
- PINEAU, C. et al. Natural Variation at the FRD3 MATE Transporter Locus Reveals Cross-Talk between Fe Homeostasis and Zn Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, 2012.
- ROSA, G. S. **Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo**. 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2006.
- SHANMUGAM, V. et al. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* – the role in zinc tolerance. **New Phytologist**, v. 190, n.1, p. 125-137, 2011.
- SILVEIRA, V. C. et al. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 12, p. 127-139, 2007.
- SKREBSKY, E. C. et al. Caracterização das exigências nutricionais de mudas de *Pfaffia glomerata* em Argissolo Vermelho distrófico arênico pela técnica do nutriente faltante. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.989-996, 2008.
- SOLGI, E.; ESMAILI-SARI, A.; RIYABI-BAKHTIARI, A.; HADIPOUR, M. Soil contamination of metals in the three industrial estates. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, p 634-638, 2012.
- WANG, C. et al. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v.75, n.11, p.1468–1476, 2009.
- WANG, Q. R.; DONG, Y.; CUI, Y.; LIU, X. Instances of soil and crop heavy metal contamination in China. **Soil and Sediment Contamination**, v. 10, p. 497-510, 2001.
- WEI, B. G.; YANG, L. S. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. **Microchemical Journal**, v. 107, p. 94-99, 2010.
- WILDE, K. L.; STAUBER, J. L.; MARKICH, S. J.; FRANKLIN, N. M.; BROWN, P. L. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). **Arch Environmental Contamination Toxicology**, v. 51, n. 22, p. 174–185, 2006.

ZIMMER, A. R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p.450-453, 2006.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito da interação de diferentes níveis de Fe e Zn em parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Distinguir três acessos de *P. glomerata* quanto ao nível de tolerância ao Zn e ao Fe;
- II) Caracterizar aspectos bioquímico-fisiológicos do excesso de Zn e de Fe e da interação entre esses metais em três acessos de *P. glomerata* em resposta à exposição de diferentes concentrações desses elementos;
- III) Avaliar os efeitos da interação entre Fe e Zn sobre a biometria radicular.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN

A família Amaranthaceae possui cerca de 170 gêneros e 2000 espécies. No Brasil são encontrados cerca de 20 gêneros e aproximadamente 100 espécies nativas (SOUZA & LORENZI, 2005). As espécies do gênero *Pfaffia* encontradas no Brasil são caracterizadas como ervas ou subarbustos eretos ou semiprostrados que ocorrem em cerrados, campos rupestres ou limpos, periferia de matas e beiras de rios (MARCHIORETTO et al., 2009).

Dentro do gênero *Pfaffia*, a espécie *P. glomerata*, conhecida como ginseng brasileiro, apresenta raízes com formatos variados, destacando-se as típicas formas humanoides, das quais deriva o nome “ginseng” que significa “imagem do homem”, em chinês (SCHENKEL et al., 2002).

A espécie pode ser naturalmente encontrada em locais de clima tropical ou subtropical úmido, apresentando grande adaptabilidade e rápido crescimento, no entanto, desenvolve-se melhor em regiões com temperatura mais elevada, sendo bastante sensível às geadas. Pode ser naturalmente encontrada em ambientes de mata ciliar, campos inundáveis à beira de rios e em orlas de matas de galeria, no Brasil sua ocorrência é mais comum nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul (MAGALHÃES, 2000; PACHECO et al., 2012; VIGO et al., 2004).

Os extratos das raízes de *P. glomerata* possuem componentes com atividade gastroprotetora (OTOFUJI, 2005), antiinflamatória, analgésica (NETO et al., 2005), antioxidante (SOUZA et al., 2005), tônica e afrodisíaca (MARQUES et al., 2004; FREITAS et al., 2004).

Shiobara et al. (1993) analisando a composição fitoquímica das raízes de *P. glomerata* encontrou substâncias com atividade adaptógena, como o ácido glomérico, ácido pfamérico, ecdisterona, rubresterona. Essa ação adaptógena da *Pfaffia* está relacionada, principalmente, à presença do ecdisteróide β -ecdisona (VIGO et al., 2003), utilizado como marcador químico da qualidade das plantas que são usadas como matéria-prima para produção de fitoterápicos (MAGALHÃES, 2000; ZIMMER et al., 2006).

A partir das pesquisas sobre as propriedades farmacológicas dos compostos extraídos das raízes de *P. glomerata* surgiu o grande interesse comercial. Assim, houve uma intensificação da exploração predatória das populações naturais da espécie, tornando necessários estudos para viabilizar o manejo sustentável em áreas de ocorrência e projetos de produção comercial em quantidades suficientes para fornecer matéria-prima para a indústria farmacêutica, diminuindo assim, a pressão ecológica sobre a espécie (MONTANARI JR et al., 1999).

3.2 EFEITO DE METAIS EM *P. glomerata*

Alguns estudos já realizados demonstram o efeito de diferentes metais em acessos de *P. glomerata*. Carneiro et al. (2002) constataram a presença de quantidades significativas de Cd e Zn na parte aérea de uma espécie não identificada do gênero *Pfaffia* encontrada em uma área contaminada por minério em Minas Gerais, o que pode indicar que o gênero possui um potencial genético à tolerância a metais pesados.

Maldaner (2008) observou que em condições de cultivo em hidroponia, concentrações de Al acima de 100 mg L⁻¹ afetaram negativamente parâmetros de crescimento de dois acessos de *P. glomerata* (JB e BRA). Calgaroto (2009) observou uma redução na massa seca de parte aérea e raízes de plantas expostas ao Hg. Gomes et al. (2013) observaram que o conteúdo de

Cd de plantas de *P. glomerata* aumentou com o incremento nos níveis de Cd na solução nutritiva. Os mesmos autores também relataram que a produção de massa seca não foi afetada pelo aumento nos níveis de Cd, no entanto, as plantas apresentaram sintomas de fitotoxicidade. Bernardy et al. (2016) observou que em altos níveis de Zn (200 μM) houve decréscimo da produção de massa seca e dos parâmetros biométricos radiculares.

Em relação à peroxidação lipídica, Calgaroto (2009) observou aumento da concentração de MDA em plantas expostas ao Hg, indicando que houve dano aos tecidos. A mesma autora não encontrou alterações na peroxidação lipídica em plantas expostas ao Zn (50 μM). Maldaner (2008) observou que houve aumento de H_2O_2 na parte aérea de plantas de dois acessos de *P. glomerata* (BRA e JB). Já em relação a atividade do sistema antioxidante, Calgaroto (2009) observou que a atividade das enzimas antioxidantes aumentou na presença de Hg. Nesse estudo, a autora concluiu que na condição de alto Hg (50 μM), mesmo com a adição de Zn na solução nutritiva, o sistema antioxidantes de *P. glomerata* não foi suficiente para reverter o dano causado pelo excesso do metal.

3.3 FERRO: FUNÇÕES NA PLANTA E INTERAÇÕES COM OUTROS METAIS

O Fe é o micronutriente requerido em maior quantidade pelas plantas (KOBAYASHI & NISHIZAWA, 2012). Na constituição da crosta terrestre é menos abundante apenas que o alumínio, sendo os quelatos Fe^{+3} e ocasionalmente de Fe^{+2} as formas dominantes de Fe solúvel no solo e em soluções nutritivas (MARSCHNER, 2012). Os quelatos são uma forma especial de complexação capaz de manter os íons solúveis em ambientes químicos onde eles poderiam se precipitar (ALBANO et al., 1996; FERRAREZI, 2006).

O Fe está envolvido em diversos processos metabólicos fundamentais, como a fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e hormônios (BECANA et al., 1998; BRIAT & LOBRÁUX, 1997; SCHMIDT, 2003). Também é componente de muitas enzimas e proteínas incluindo citocromos, catalase, nitrogenase, enzimas envolvidas na biossíntese de clorofilas, bem como é componente fundamental das proteínas heme e ferredoxina, responsáveis pelo transporte de elétrons (KAMPFENKEL et al., 1995).

Existem duas estratégias para obtenção de Fe pelas plantas. A estratégia I é utilizada por plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, com exceção das gramíneas, e consiste em três etapas para absorção do Fe, acidificação da rizosfera pela H^+ -ATPase, redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} por uma NADH redutase e absorção do Fe por um transportador específico (RÖMHELD

e MARSCHNER, 1986). Os íons metálicos são absorvidos do solo pela raiz e são, então, distribuídos nas plantas, através das membrana celular e membranas das organelas (SHINGLES et al., 2002).

O Fe reduzido (Fe^{2+}) é absorvido para as células da epiderme e células corticais da raiz através de um transportador de membrana da família ZRT, IRT-LIKE PROTEIN (ZIP). Em *Arabidopsis thaliana*, o membro dessa família codificado pelo gene *IRT1* é o primeiro transportador induzido na deficiência de Fe. Trabalhos recentes mostraram que o *IRT1* sofre extensivo controle na pós-tradução, o que é essencial para evitar o hiperacúmulo e toxicidade do Fe (VERT et al., 2002). Outras famílias gênicas também parecem estar envolvidas no transporte de Fe, entre elas NRAMP e YSL. A família de genes NRAMP foi identificada em *Arabidopsis thaliana* e mostrou-se envolvida na homeostase do ferro, embora seu papel fisiológico permaneça pouco esclarecido (CURIE et al., 2003; THOMINE et al., 2000).

Apesar de haver um controle pelo sistema de absorção nas raízes as plantas podem acumular Fe em função de condições ambientais desfavoráveis. O excesso de Fe necessita ser compartimentalizado, prevenindo sua toxicidade (BRIAT & LEBRUN, 1999). Em relação a compartimentalização, mais de 90% do Fe nas células foliares está localizado nos cloroplastos. Outra forma de armazenamento de Fe é no estroma de plastídios na forma de ferritina, proteína armazenadora de Fe com capacidade de estocar mais de 4500 átomos de Fe (CURIE & BRIAT, 2003).

Devido a suas propriedades físico-químicas, o Fe em excesso pode causar um desbalanço das reações redox nas células, ocasionando o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2009). O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) causam danos oxidativos às células, e também podem reagir com o excesso de Fe^{2+} livre através da reação de Fenton e formar radicais hidroxilas (HO^{\cdot}), os quais causam um dano oxidativo mais intenso que $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (BECANA et al., 1998; HELL & STEPHAN, 2003; VANSUYT et al., 1997).

O excesso de Fe^{2+} livre nos sistemas vegetais acelera a oxidação, mediada pelo O_2 e H_2O_2 , de importantes metabólitos como o ascorbato, a glutatona e nucleotídeos (BECANA et al., 1998; KAMPFENKEL et al., 1995); inibe a atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática (SANTOS et al., 2001), reduz o teor de clorofilas (NEVES et al., 2009), contribuindo para o aparecimento de manchas cloróticas e marrons e para a diminuição na taxa fotossintética (KAMPFENKEL et al., 1995; NEVES et al., 2009) e, conseqüentemente, do crescimento da planta (NEVES et al., 2009).

A toxidez de Fe pode causar injúrias aos complexos fotossintéticos, reduzindo a eficiência quântica do PSII e a taxa de transporte de elétrons, aumentando a dissipação não

fotoquímica do excesso de energia (SUH et al., 2002; PEREIRA, 2009; CASTRO, 2010). Também ocorre a degradação dos pigmentos fotossintéticos e o somatório dessas respostas ocasionam a redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ (TERRY, 1980; MISHRA & DUBEY, 2005; ARAÚJO, 2012).

O desbalanço nutricional causado pelo excesso de Fe também pode gerar deficiência de outros nutrientes como P, Ca, K, Mg e Zn (SILVEIRA et al., 2007; BENCKISER et al., 1984). Em relação à interação do Fe com outros metais, em *A. thaliana* uma baixa concentração de Mg aumentou a tolerância ao excesso de Cd, juntamente com um aumento da concentração de Fe na parte aérea (HERMANS et al., 2011), o que sugere a influência do Mg no nível de tolerância ao Cd e na acumulação de Fe na parte aérea. O aumento na concentração de Fe é atribuído a proteção do aparato fotossintético em condição de excesso de Cd (HERMANS et al., 2011). Além disso, o excesso de Cd induz sintomas de deficiência de Fe em muitas espécies (SOLTI et al., 2008; SARVARI et al., 2011).

3.4 ZINCO: FUNÇÕES NA PLANTA E INTERAÇÃO COM OUTROS METAIS

O Zinco (Zn) é um micronutriente essencial em sistemas biológicos (ARVIND & PRASAD, 2003), desempenhando funções fundamentais em diversos processos celulares (BROADLEY et al., 2007; CHERIF et al., 2011). Está relacionado com a função catalítica de várias enzimas e na estabilidade estrutural de proteínas celulares (VALLEE & FALCHUK, 1993). Além disso, possui um importante papel na estabilização e proteção de membranas biológicas contra danos oxidativos e peroxidativos, perda da integridade da membrana plasmática e alterações na permeabilidade (ARVIND & PRASAD, 2003).

Esse elemento encontra-se nos solos em concentrações entre 25 e 58 mg L⁻¹ (ALLOWAY, 1995) e é absorvido pelas plantas na forma de Zn²⁺ ou na forma de quelato. Alguns autores consideram em seus estudos o Zn como um elemento móvel, enquanto outros atribuem uma mobilidade intermediária (CARNEIRO et al., 2002, LI et al., 2011). Contudo, Zn em excesso no substrato causa desordens nutricionais (MARSCHNER, 2012; REICHMAN, 2002).

A contaminação com Zn geralmente está ligada a atividades de mineração e ao uso inadequado de fertilizantes e pesticidas (REICHMAN, 2002). O acúmulo excessivo de Zn pelas plantas causa inibição de diversos processos metabólicos, o que resulta na inibição do crescimento e desenvolvimento radicular e induz a planta à senescência (PARLAK & YILMAZ, 2012; WANG et al., 2009). Além disso, causa redução do conteúdo de clorofilas,

inibição enzimática, redução da taxa fotossintética, alteração da integridade das membranas e indução da formação de EROs (CARNEIRO et al., 2002; STOYANOVA & DONCHEVA, 2002; LIN et al., 2005; LI et al., 2011; LI et al., 2013).

O Zn é um metal não-redox e, portanto, é incapaz de produzir EROs diretamente pela reação de Fenton, no entanto, gera estresse oxidativo pela interferência no sistema antioxidante, causando um desequilíbrio entre o aumento de EROs e respostas antioxidantes. (GRATÃO et al., 2005). As enzimas antioxidantes superóxido dismutase, peroxidase e catalase têm sua atividade aumentada pela presença do Zn, desempenhando papel importante na remoção dos radicais superóxido (O_2) e, portanto, na proteção das membranas e proteínas contra a oxidação (CUYPERS et al., 2001).

Arvind & Prasad (2003) reportaram em um estudo sobre os efeitos da interação entre o cádmio (Cd) e o Zn, que as enzimas antioxidantes apresentaram incremento em suas atividades nas plantas tratadas com Cd e suplementadas com Zn em relação àquelas tratadas com Cd somente. Hart et al. (2002) atribuiu a competição interativa entre Cd e Zn à existência de um sistema comum de transporte na membrana plasmática. Resultados parecidos foram encontrados na interação entre o Zn e o mercúrio (Hg), onde houve maior sobrevivência das plantas expostas ao Hg associado ao Zn, indicando que o Zn alivia o dano oxidativo induzido pelo Hg (CALGAROTO et al., 2011).

3.5 INTERAÇÕES ENTRE FERRO E ZINCO

Os efeitos biológicos dos metais individualmente já são mais ou menos conhecidos, no entanto, as combinações de metais pesados são extremamente comuns na natureza e os efeitos dessas combinações ainda necessitam ser estudados (WILDE et al., 2006; CVJETKO et al., 2010). Devido as suas semelhanças químicas, o Fe e o Zn são absorvidos pelas plantas na forma de cátions divalentes. Estudos mais antigos já reportavam que a presença do Zn inibia, por competição, outros íons como o Fe, esse fato era atribuído à semelhança em seus raios iônicos (0,083 nm) (MALAVOLTA et al., 1991).

A interação negativa entre Fe e Zn pode ser explicada por suas características semelhantes em relação a solubilidade no solo e pela competição pela absorção e translocação (MARSCHNER, 2012). Soares et al. (2001) observou que a translocação do Fe é altamente inibida pelo excesso de Zn e considerou que esta deficiência induzida de Fe é uma das possíveis causas dos sintomas de toxidez em condição de excesso de Zn em eucalipto.

Alguns estudos também procuraram observar a relação das diferentes interações de metais com o processo de estresse oxidativo. Foi, então, reportada a habilidade do Zn em interagir com o cobre (Cu) e o Fe, diminuindo seus conteúdos nos tecidos e por isso retardando o processo de estresse oxidativo, quando existe excesso desses micronutrientes (ZAGO & OTEIZA, 2001; SANTON et al., 2003; BROADLEY et al., 2007).

Em nível molecular essa hipótese é confirmada uma vez que o transportador IRT1 é permeável tanto por Fe quanto por Zn (KORSHUNOVA et al., 1999; VERT et al., 2002). Estudos recentes também comprovaram que o transportador FDR3 controla o carregamento do xilema tanto de Fe quanto de Zn, o que sugere que esses metais competem não só pela absorção, mas também pelo transporte das raízes para a parte aérea (DURRETT et al., 2007).

Ainda em relação a homeostase desses metais, o gene *AtFRD3* codifica um transportador de citrato para o carregamento do xilema e é importante pra a nutrição por Fe. Rogers & Guerinot (2002) identificaram que o FDR3 está envolvido na sinalização da deficiência de Fe. No referido estudo, o fenótipo das plantas mutantes *frd3* indicaram que ele é um componente importante no mecanismo homeostático do Fe em *A. thaliana*. Pineau et al. (2012) em seu estudo confirmaram a importância da coordenação da homeostase entre Fe e Zn para a tolerância ao excesso de Zn e que o FDR3 atua como principal regulador dessa homeostase cruzada (ROGERS & GUERINOT, 2002).

Shingles et al (2002) observaram que o Fe^{2+} e Zn^{2+} competem pelo transporte nas membranas internas dos cloroplastos, sendo que a adição de Zn^{2+} ao meio resultou em inibição do transporte de Fe^{2+} . Os autores sugerem que o transportador de Fe presente nessas membranas seja um transportador de cátions divalentes e que o Zn^{2+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} sejam substratos alternativos para esse transportador.

3.6 REFERÊNCIAS

ALBANO, J. P.; HALBROOKS, M. C.; MILLER, W. B. Iron toxicity stress causes bronze speckle, a specific physiological disorder of marigold (*Tagetes erecta* L.). **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 121, p. 430-437, 1996.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soil**. Blackie Academic and Professional: Glasgow, 368 p., 1995.

ARAÚJO, T. O. **Efeitos do ferro em *Setaria parviflora* (POIR) KERGUÉLEN e *Paspalum urvillei* STEUDEL (POACEAE)**. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

- ARVIND, P.; PRASAD, M. N. V. Zinc alleviates cádmium induced toxicity in *Ceratophyllum demersum*, a fresh water macrophyte. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 41, p. 391-397, 2003.
- BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron dependent oxygen free radical generation plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidante protection. **Plant and Soil**, v. 201, p. 137-147, 1998.
- BENCKISER, G. et al. Effect of iron fertilization on exudation activity, dehydrogenase activity, iron-reducing populations and Fe⁺⁺ formation in the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.) in relation to iron toxicity. **Plant and Soil**, v. 79, p. 305-316, 1984.
- BERNARDY, K et al. Changes in root morphology and dry matter production in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions in response to excessive zinc. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 613-620, 2016
- BRIAT, J. F.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 187-193, 1997.
- BRIAT, J. F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **C. R. Académie des Science**, v. 322, p. 43-54, 1999.
- BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; HAMMOND, J. P.; ZELKO I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytologist**, v.173, n. 15, p. 677-702, 2007.
- CALGAROTO, N.S. **Efeitos fisiológicos do mercúrio em plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- CALGAROTO, N. S. et al. Zinc alleviates Mercury-induced oxidative stress in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Biometals**, v.24, p. 959-971, 2011.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.37, n.11, p.1629-1638, 2002.
- CASTRO, L. N. **Avaliação ecofisiológica do impacto causado pelo aerossol marinho e pela dissipação do ferro particulado em *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**. 2010. 58 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- CHERIF, J.; MADIOUNI, C.; BEN AMMAR, W.; JEMAL, F. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 16, p. 837–844, 2011.
- CUYPERS, A.; VANGRONVELD, J.; CLIJSTERS, H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 657-664, 2001.
- CURIE, C.; BRIAT, J. F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 183-296, 2003.

- CVJETKO, P.; TOLIC, S.; ŠIKIĆ, S.; BALEN, B.; TKALEC, M. et al. Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, p. 287–296, 2010.
- DURRETT, T. P.; GASSMANN, W.; ROGERS, E. E. The FDR3-Mediated efflux of citrate into root vasculature is necessary for efficient iron translocation. **Plant Physiology**, v. 144, p. 197-205, 2007.
- FERRAREZI, R.S. **Fontes de ferro no desenvolvimento de porta-enxertos cítricos produzidos em substrato**. Instituto Agrônomo de Campinas (Dissertação). 103p. 2006.
- FREITAS, C. S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v.74, n.9, p.1167-1179, 2004.
- GOMES, P. M.; MARQUES, T. C.; SOARES, A. M. Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. **Biologia**, v.68, n.2, p.223-230, 2013.
- GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Funct. Plant Biol.**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.
- HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 46, n. 5, p. 531-542, 2009.
- HART, J. J. et al. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. **Physiology Plant**, v. 116, p. 73-78, 2002.
- HELL, R.; STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, p. 541-551, 2003.
- HERMANS, C.; CHEN, J.; COPPENS, F.; INZÉ, D.; VERBRUGGEN, N. Low magnesium status in plants enhances tolerance to cadmium exposure. **New Phytologist**, v. 192, p. 428-436, 2011.
- KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, 225: 165-167, 1995.
- KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron uptake, Translocation and Regulation in Higher Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131-152, 2012.
- KORSHUNOVA, Y. et al. The Irt1 protein from *Arabidopsis thaliana* is metal transporter with broad specificity. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 37-44, 1999.
- LIN, C.; CHANG, H.; HUANG, H. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.963-968, 2005.
- LI, T. et al. Rhizosphere characteristics of zinc hyperaccumulator *Sedum alfredii* involved in zinc accumulation. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, p.818-823, 2011.

- LI, X. et al. Zinc induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.89, n.1, p.150-157, 2013.
- MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para o cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J. V. et al. **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, p.323-332, 2000.
- MALAVOLTA, E.; BOARETTO, A. E.; PAULINO, V. T. Micronutrientes: uma visão geral. In: FERREIRA, M. E; CRUZ, M.C.P. Micronutrientes na agricultura. **Potafos**, 1991. p.1-34.
- MALDANER, R. **Toxidez de alumínio em genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- MARCHIORETTO, M. S.; MIOTTO, S. T. S.; SIQUEIRA, J. C. Padrões de distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Rodriguésia**, v.6, n.3, p.67-68, 2009.
- MARQUES, L. C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v.18, n.7, p.566-572, 2004.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Elsevier, 2012. 3v.
- MISHRA, S.; DUBEY, R. S. Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. In: Pessarakli. M. (ed) **Handbook of Photosynthesis**. 2 ed, 2005, cap. 45, 862p.
- MONTANARI JUNIOR, I.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of b-ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v.3, n.502, p.125-129, 1999.
- NETO, A. G. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p.87-91, 2005.
- NEVES, N. R. et al. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assesment. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3740-3745, 2009.
- OTOFUJI, G. M. **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastoprotetor das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. 167 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- PACHECO, A. C. et al. Efeito da aplicação de fosfato natural em plantas de fáfia cultivadas a campo. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.5, n.1, p.175-186, 2012.
- PARLAK, U. K.; YILMAZ, D. D. Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 85, n. 20, p. 52–58, 2012.

PEREIRA, E. G. **Efeitos tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológica em plantas cultivadas e de restinga**. 2009. 117f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

PINEAU, C. et al. Natural Variation at the FRD3 MATE Transporter Locus Reveals Cross-Talk between Fe Homeostasis and Zn Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, 2012.

REICHMAN, S. M. The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. **Australian Minerals, Energy and Environment Foundation**, v.14, 59 p., 2002.

ROGERS, E.; GUERINOT, M. L. FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 14, p. 1787-1799, 2002.

RÔMHELD, V.; MARSCHNER, H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. **Plant Physiology**, v. 80, p. 175-180, 1986.

SANTON, A. et al. Effect and possible role of Zn treatment in LEC rats an animal model of Wilsons disease. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1637, p. 91-97, 2003.

SANTOS, P. S.; RAMOS, R. S.; FERREIRA, S. T.; ALVES, P. C. C. Iron induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 1512, p. 357-366, 2001.

SÁRVARI, E. et al. Impacto f moderate Fe excesso under Cd stress on the photosynthetic performance of poplar (*Populus jacquemontiana*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 499-505, 2011.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed., p.301-330, 2002.

SCHMIDT, W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. **Plant Science**, v. 8, p. 188-193, 2003.

SHINGLES et al. Ferrous Ion Transport across Chloroplast Inner Envelope Membranes. **Plant Physiology**, v. 128, p. 1022-1030, 2002.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1527-1530, 1993.

SILVEIRA, V. C. et al. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 12, p. 127-139, 2007.

SOARES, C. R. F. S. et al. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvore em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 302-315, 2001.

SOLTI, Á. et al. Impact of iron supply on the kinetics of recovery of photosynthesis in Cd-stressed poplar (*Populus glauca*). **Annals of Botany**, v. 102, p. 771-782, 2008.

SOUZA, D. J. F. S. et al. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal Pharmacology**, v.37, n.3, p.174-78, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STOYANOVA, Z.; DONCHEVA, S. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, n.2, p.111-116, 2002.

SUH, H.; KIM, C. S.; LEE, J.; JUNG, J. Photodynamic effect of iron excesso on photosystem II functions in pea plants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, p. 513-518, 2002.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 79–118, 1993.

VANSUYT, G.; LOPES, F.; INZÉ, D.; BRIAT, J. F.; FOURCROY, P. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. **FEBS Letters**, v. 410, p. 195-200, 1997.

TERRY, N. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress control photochemical capacity *in vivo*. **Plant Physiology**, v. 65, p. 114-120, 1980.

THOMINE, S.; WANG, R.; WARD, J. M.; CRAWFORD, N. M.; SCHROEDER, J. I. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 4991-4996, 2000.

VERT et al. IRT1, na Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. **The Plant Cell**, v. 14, p. 1223-1233, 2002.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 46-49, 2003.

VIGO, C. L. S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.7-19, 2004.

WANG, C.; ZHANG, S. H.; WANG, P. F.; QIAN, J.; HOU, J. et al. Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Chemosphere**, v. 76, n. 21, p. 938–945, 2009.

WILDE, K. L.; STAUBER, J. L.; MARKICH, S. J.; FRANKLIN, N. M.; BROWN, P. L. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga

(*Chlorella* sp.). **Arch Environmental Contamination Toxicology**, v. 51, n. 22, p. 174–185, 2006.

ZAGO, M. P.; OTEIZA, P. I. The antioxidante properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. **Free radical Biology and Medicine**, v.31, p. 266-274, 2001.

ZIMMER, A. R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p.450-453, 2006.

4 EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FERRO E ZINCO NO CRESCIMENTO, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FOTOSINTÉTICOS DE TRÊS ACESSOS DE *Pfaffia glomerata*

RESUMO

Os efeitos do excesso de ferro (Fe) e do excesso de zinco (Zn) bem como de sua interação no crescimento, parâmetros bioquímicos e fotossintéticos em três diferentes acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen foram investigados em condições hidropônicas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, trifatorial 3 x 3 x 3, com três níveis de Fe (50, 700 e 1400 µM), três níveis de Zn (2, 200 e 400 µM) e três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB). Observou-se grande variabilidade entre os acessos, sendo que o acesso GD mostrou-se mais tolerante tanto ao excesso de Fe quanto ao excesso de Zn com menor redução da massa seca, área foliar e concentração de clorofila *a* e total. Também não apresentou incremento na concentração de H₂O₂ e peroxidação lipídica devido ao excesso de Zn. Já o acesso BRA mostrou grande sensibilidade com intensas reduções na massa seca e área foliar. Na condição de alto Zn (400 µM) e alto Fe (1400 µM), o acesso GD foi o único que respondeu à interação, diminuindo a produção de MSPA e aumentando a produção de MSR, indicando que esse acesso possui maior capacidade de adaptação à condição de estresse. Os acessos BRA e JB não apresentaram alterações nesses parâmetros nessa condição de estresse.

Palavras-chave: Metais pesados, ginseng brasileiro, excesso, crescimento, fotossíntese.

4.1 INTRODUÇÃO

O ferro (Fe) e o zinco (Zn) são metais essenciais às plantas, envolvidos em processos metabólitos diversos e em reações de oxidação-redução. Também estão relacionados com o processo fotossintético, sendo requeridos na biossíntese da clorofila, na forma de enzimas fundamentais nesse processo (MARSCHNER, 1995; BROADLEY et al., 2007). No entanto, ambos são tóxicos quando presentes em altas concentrações, sendo necessário que as plantas obtenham um balanço entre a absorção, utilização e armazenamento desses metais para manter a homeostase iônica (GROTZ e GUERINOT, 2006).

Apesar de existir uma ocorrência natural de metais pesados em baixas concentrações na maioria dos solos, o aumento de atividades industriais, agrícolas e da urbanização têm causado um acréscimo na poluição do solo com esses metais (REICHMAN, 2002; WUANA e OKIEIMEN, 2011). Quando presentes em excesso os metais podem ser extremamente danosos. Por exemplo, a toxidez por Manganês (Mn) e Fe é uma das principais limitações a agricultura em solos ácidos, os quais perfazem mais de 30% dos solos do planeta, enquanto a toxidez por Zn é observada em solos contaminados próximos a áreas de mineração (VON UEXHKULL e MUTERT, 1995; KRÄMER, 2010).

Do ponto de vista nutricional, na presença de excesso de um elemento mineral pode ocorrer competição com os demais presentes no meio. Dessa forma, as plantas precisam coordenar a homeostase desses elementos para evitar desequilíbrios iônicos (PINEAU et al., 2012). Em *A. thaliana*, a toxidez por Zn causa redução na absorção e acúmulo do Fe, o que indica uma competição entre esses metais pela absorção radicular (FUKAO et al., 2011; SHANMUNGAM et al., 2011).

Muitos estudos relatam a interação entre metais e como isso pode afetar parâmetros fotossintéticos. No entanto, não existe relato de um estudo dessa natureza feito com *P. glomerata*. *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, popularmente conhecida como ginseng brasileiro, é uma espécie medicinal brasileira largamente utilizada pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos fitoterápicos (MAGALHÃES, 2000; VIGO et al., 2004; ZIMMER et al., 2006). As raízes dessa planta são conhecidas por apresentarem efeitos tônicos, adaptógenos e afrodisíacos (MARQUES e FREITAS, 2004). Essa espécie possui grande diversidade genética em populações naturais, o que resulta em significativa variabilidade em relação ao nível de tolerância a diferentes metais (KAMADA et al., 2009). Estudos anteriores relatam que *P. glomerata* possui média a alta tolerância a metais como alumínio (Al), mercúrio (Hg) e cádmio (Cd) (MALDANER, 2008; SKREBSKY et al., 2008; CALGAROTO, 2009). Bernardy (2015) relatou que um dos acessos estudados apresentou tolerância ao excesso de Zn.

O estudo da interação entre metais é importante na elucidação das suas influências no acúmulo desses metais e de metabólitos nas plantas, os quais podem ter implicações para a saúde humana. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da interação entre Fe e Zn no crescimento, parâmetros fotossintéticos e acúmulo desses metais em três acessos de *P. glomerata*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi desenvolvido pelo Grupo de Pesquisas em Fisiologia de Plantas de interesse Agrobiológico, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria. Para esse experimento foram utilizados três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB). O acesso JB pertence a coleção do Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o acesso BRA foi obtido da coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e o acesso GD pertence a coleção de plantas medicinais da Universidade Federal de Grande Dourados (UFGD).

As plantas utilizadas nesse experimento são provenientes de cultura *in vitro* de segmentos nodais com 1 cm de comprimento e sem folhas, obtidos da porção mediana de plantas micropropagadas, cultivadas em meio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com 6 g L⁻¹ ágar, 30 g L⁻¹ sacarose, 0.1 g L⁻¹ mio-inositol, e com ausência de reguladores de crescimento como previamente descrito por Nicoloso et al. (2001).

Após 21 dias de crescimento em condições *in vitro*, plantas homogêneas foram selecionadas e aclimatadas em bandejas de plástico contendo 17 litros de solução nutritiva em sistema hidropônico aerado em casa de vegetação. As plantas foram fixadas em placas de poliestireno com espuma e foram submetidas a seguinte solução nutritiva (em µM) descrita por Tabaldi et al. (2007): 6090,5 N; 974,3 Mg; 4986,76 Cl; 2679,2 K; 2436,2 Ca; 359,9 S; 243,592 P; 0,47 Cu; Mn 2,00; 1,99 Zn; Ni 0,17; 24,97 B; 0,52 Mo; 47,99 Fe (FeSO₄ / Na EDTA).

Ao final de um período de aclimação de 7 dias, foram adicionados na solução nutritiva os tratamentos de 700 e 1400µM de Fe (FeSO₄ / Na EDTA) e de 200 e 400µM (ZnSO₄), bem como todas as combinações, totalizando 9 tratamentos. O tratamento controle foi feito apenas pelas concentrações originais de Fe e Zn presentes na solução nutritiva, sem adições. A troca de solução nutritiva foi feita a cada 7 dias e o pH ajustado a cada 2 dias para 5,5.

4.2.2 Produção de massa seca

Folhas, colmos e raízes foram coletadas e colocadas em sacos de papel e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante. Após foram pesadas e moídas.

4.2.3 Comprimento das plantas e área foliar

O comprimento das plantas foi determinado com o uso de uma régua graduada, na qual media-se o colmo principal da base até o ápice. Para a determinação da área foliar, foi utilizado um scanner Epson 11000 XL e as análises foram feitas com o suporte do software WinRhizo Pro.

4.2.4 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de H_2O_2 foi determinada de acordo com Loreto e Velikova (2001). Aproximadamente 0,1 g de tecido congelado foi homogeneizado em 1,5 ml de TCA 0,1% (w/v). Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante com 0,5 ml de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 ml de KI 1 M foi utilizado para determinar a concentração de H_2O_2 através da comparação da sua absorbância a 390 nm com uma curva de calibração padrão.

4.2.5 Estimação da peroxidação lipídica

O nível dos produtos da peroxidação lipídica foi estimado de acordo com o método de El-Moshaty et al. (1993), através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA) como produto da peroxidação lipídica através da reação com o ácido tiobarbitúrico. Foi realizada uma correção para turbidez através da subtração do valor obtido de absorbância a 600 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em nmoles de MDA (mg de massa fresca⁻¹).

4.2.6 Atividade de enzimas antioxidantes

Um grama de tecido congelado foi homogenizado com 3 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,8) incluindo 1 mM EDTA e Triton X 1% (w/v) (Zhu et al., 2004). O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD). A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972).

4.2.7 Parâmetros fotossintéticos

A assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*GS*), concentração de CO₂ interno (*Ci*) e a transpiração (*E*) foram obtidos através de um analisador portátil Li-Cor 6400XT. A eficiência do uso da água (*EUA*) e eficiência instantânea de carboxilação (*A/Ci*) foram obtidos através da razão entre o CO₂ fixado na fotossíntese e o total de água transpirada. Os parâmetros das trocas gasosas foram obtidos da porção mediana da lâmina foliar de uma folha completamente expandida, totalmente exposta a radiação solar, iniciando as análises as 8h da manhã. Foram analisadas quatro plantas por tratamento, uma folha por planta (a terceira folha expandida a partir do ápice em direção a base do colmo).

4.2.8 Concentração de clorofilas e carotenoides

As concentrações de clorofilas e carotenoides foram determinadas seguindo o método de Hiscox and Israelstam (1979) e estimadas com o suporte da formula de Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987). Amostras de 0,05 g de folha macerada e congelada (-80°C) foram incubadas a 65°C em dimethylsulfoxide (DMSO) até os tecidos ficarem completamente branqueados. A absorbância da solução foi mensurada em 470, 645 e 663 nm para determinar as concentrações de carotenoides, clorofila a e clorofila b, respectivamente.

4.2.9 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, usando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Massa Seca

No presente estudo, as variáveis massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca total da planta (MST) apresentaram interação dupla entre os níveis de Fe e Zn (Figura 1). Os três acessos (GD, BRA e JB) apresentaram reduções significativas na produção de MSPA e MST tanto pelo aumento do nível de Zn quando associado ao nível controle de Fe (50 µM), quanto pelo aumento dos níveis de Fe, junto a condição controle de Zn (2 µM). O acesso GD mostrou-

se tolerante ao aumento nos níveis de Fe e Zn, enquanto BRA mostrou-se o mais sensível, já JB mostrou uma resposta intermediária.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a MSPA e MST para os três acessos. No entanto, na presença de 1400 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 200 μM aumentou a produção de MSPA e MST para o acesso GD. Para os acessos BRA e JB, na presença de 700 e 1400 μM Fe, o aumento dos níveis de Zn não resultou em alteração na produção de massa seca.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe causou redução na produção de MSPA e MST para os três acessos. Já na presença de 200 μM Zn não houve alteração na produção pelo excesso de Fe para nenhum dos três acessos. Na mais alta concentração de Zn (400 μM), o aumento no nível de Fe reduziu a produção de MSPA e MST apenas para o acesso GD, nos demais não houve alteração na produção de MSPA e MST.

Já a variável massa seca de raízes (MSR) apresentou interação tripla entre os fatores (Tabela 1). Na condição controle de Fe e Zn na solução nutritiva os acessos GD e JB não diferiram na produção de MSR, enquanto o acesso BRA apresentou a menor média, diferindo dos demais.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a MSR para os três acessos. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 200 e 400 μM incrementou a MSR para o acesso GD, já para o acesso JB o aumento para 400 μM Zn causou redução na MSR e o acesso BRA não apresentou alteração. Já no maior nível de Fe (1400 μM), o aumento dos níveis de Zn aumentou a produção de MSR apenas para o acesso GD.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe reduziu a produção de MSR dos três acessos. No entanto, na presença de 200 μM Zn não houve alteração na produção de MSR pelo excesso de Fe para os acessos GD e BRA. Já para o acesso JB verificou-se aumento na produção de MSR pelo excesso de Fe (700 μM). Na mais alta concentração de Zn (400 μM), o aumento do nível de Fe aumentou a produção de MSR para o acesso GD, mas não causou alteração nos acessos BRA e JB.

Figura 1 Massa seca de parte aérea (A, B e C) e massa seca total da planta (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

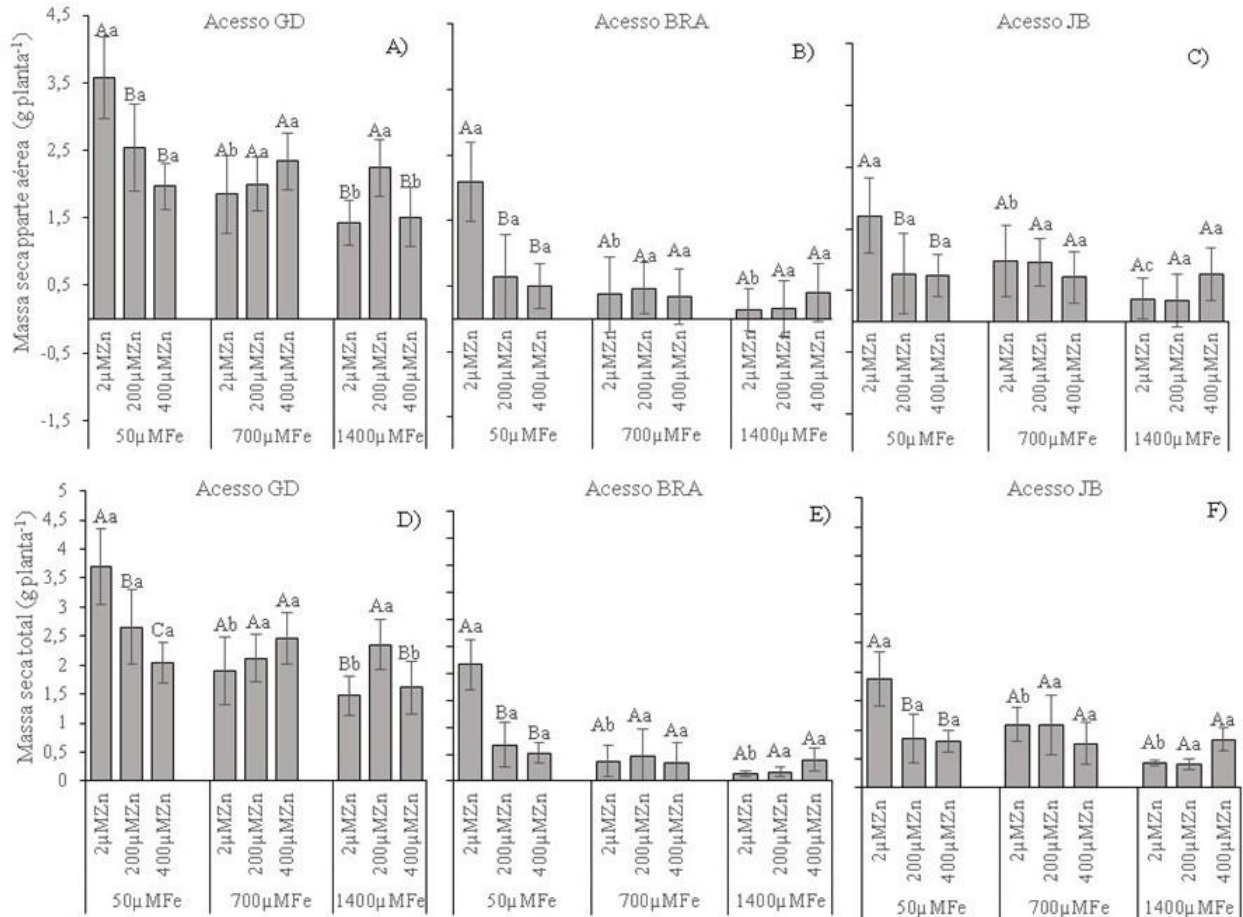


Tabela 1 Massa seca de raízes (g planta⁻¹) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.

ACESSO	Massa seca de raízes (g planta ⁻¹)								
	50μMFe			700μMFe			1400μMFe		
	2μMZn	200μMZn	400μMZn	2μMZn	200μMZn	400μMZn	2μMZn	200μMZn	400μMZn
GD	0,14Aaα	0,11Aba	0,07Acβ	0,05Bbβ	0,12Aaα	0,11Aaα	0,04Abβ	0,11Aaα	0,10Aaα
BRA	0,06Baα	0,03Cba	0,02Bba	0,01Caβ	0,01Baα	0,01Caα	0,01Baβ	0,01Caα	0,01Caα
JB	0,16Aaα	0,08Bbβ	0,06Aba	0,10Aaβ	0,12Aaα	0,05Bba	0,06Aaγ	0,05Baβ	0,07Baα

Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe; e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

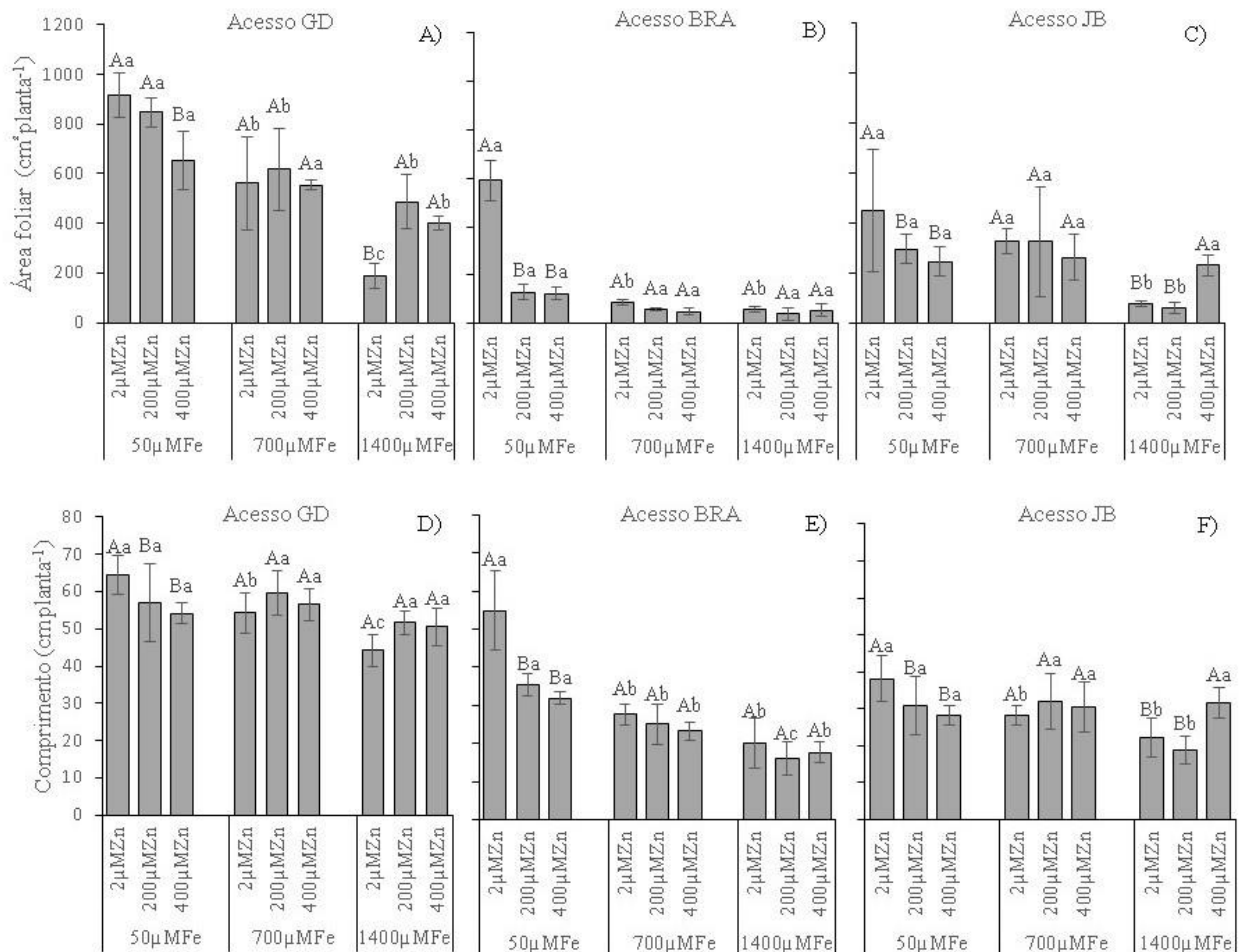
4.3.2 Área Foliar e comprimento da parte aérea

Houve interação dupla entre os níveis de Fe e Zn para as variáveis área foliar e comprimento da parte aérea das plantas (Figura 2). A redução mais significativa (90%) da área foliar ocorreu no acesso BRA na condição controle de Zn ($2 \mu\text{M}$) com o aumento do nível do Fe para $1400 \mu\text{M}$.

Na presença do nível de controle de Fe ($50 \mu\text{M}$), o aumento do nível de Zn ($400 \mu\text{M}$) ocasionou uma redução na área foliar de 29%, 79% e 45% nos acessos GD, BRA e JB, respectivamente. Nessa mesma condição, houve redução também do comprimento da parte aérea dos três acessos. No entanto, na presença de $700 \mu\text{M}$ Fe não houve alteração nesses parâmetros pelo excesso de Zn em nenhum dos acessos. Já no maior nível de Fe ($1400 \mu\text{M}$), o aumento dos níveis de Zn aumentou a área foliar do acesso GD (200 e $400 \mu\text{M}$) e JB ($400 \mu\text{M}$). O acesso JB também apresentou aumento no comprimento da parte aérea nessa mesma interação, já o acesso BRA não apresentou alteração.

Na presença do nível controle de Zn ($2 \mu\text{M}$), o aumento dos níveis de Fe reduziu a área foliar em 79%, 90% e 83% para GD, BRA e JB, respectivamente; e também o comprimento da parte aérea dos três acessos. Já na presença de $200 \mu\text{M}$ Zn, o aumento dos níveis de Fe causou redução da área foliar dos acessos GD e JB e redução no comprimento da parte aérea para BRA e JB. Na concentração mais alta de Zn ($400 \mu\text{M}$), o aumento no nível de Fe ($1400 \mu\text{M}$) causou redução apenas na área foliar do acesso GD e redução também do comprimento da parte aérea do acesso BRA, o acesso JB não apresentou alteração pelo excesso de Fe.

Figura 2 Área foliar (A, B e C) e comprimento da parte aérea (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).



4.3.3 Concentração de clorofilas

As concentrações de clorofila *a* e de clorofila total apresentaram interação tripla entre os níveis de Fe, Zn e acessos (Tabela 2). Na condição controle de Fe e Zn na solução nutritiva apenas o acesso JB diferiu dos demais. A concentração de clorofila *b* e carotenoides não respondeu de forma significativa aos tratamentos.

Na condição controle de Fe (50 µM), o aumento dos níveis de Zn causou redução na concentração de clorofila *a* e clorofila total do acesso JB. Já o acesso GD apresentou redução da concentração de clorofila *a* apenas na presença de 200 µM Zn e o acesso BRA não apresentou alteração nas concentrações pelo excesso de Zn. Na presença de 700 µM Fe, o

aumento do nível de Zn para 400 μM aumentou a concentração de clorofila *a* e clorofila total para o acesso JB. No maior nível de Fe (1400 μM), o aumento dos níveis de Zn causaram acréscimo nas concentrações do acesso GD, já os acessos BRA e JB, nessa condição, não apresentaram alteração nas concentrações de clorofila *a* e clorofila total.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe reduziu a concentração de clorofila *a* e clorofila total apenas do acesso JB. Enquanto os acessos GD e BRA não apresentaram alteração. Já na presença de 200 μM Zn não houve alteração em nenhum dos acessos pelo excesso de Fe. No mais alto nível de Zn (400 μM) houve aumento da concentração de clorofila *a* do acesso GD na combinação com o mais alto nível de Fe (1400 μM) e do acesso JB na presença de 700 μM Fe. Nessa mesma condição (400 μM Zn) o acesso JB foi o único que apresentou aumento na concentração de clorofila total com o aumento dos níveis de Fe.

Tabela 2 Concentração de clorofila *a* (mg g⁻¹ massa fresca) e concentração de clorofila total (mg g⁻¹ massa fresca) em folhas de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.

Concentração de clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ massa fresca)									
ACESSO	50μMFe			700μMFe			1400μMFe		
	2μMZn	200μMZn	400μMZn	2μMZn	200μMZn	400μMZn	2μMZn	200μMZn	400μMZn
GD	1,03Aαα	0,50Abα	0,87Aαβ	1,20Aαα	0,65Abα	0,97Aαβ	0,95Abα	0,72Abα	1,23Aαα
BRA	0,77Aαα	0,56Aαα	0,72Aαα	0,84Bαα	0,70Aαα	0,66Bαα	0,97Aαα	0,79Aαα	0,68Bαα
JB	1,30Bαα	0,73Abα	0,74Abβ	0,83Bbβ	0,86Abα	1,22Aαα	0,89Aαβ	0,80Aαα	1,00Aαβ
Concentração de clorofila total (mg g ⁻¹ massa fresca)									
ACESSO	50μMFe			700μMFe			1400μMFe		
	2μMZn	200μMZn	400μMZn	2μMZn	200μMZn	400μMZ	2μMZn	200μMZn	400μMZn
GD	2,21Aαα	1,25Abα	1,73Abα	2,44Aαα	1,61Abα	2,12Aαα	1,93Abα	1,56Abα	2,35Aαα
BRA	1,71Aαα	1,21Aαα	1,67Aαα	1,78Bαα	1,45Aαα	1,22Bαα	2,02Aαα	1,58Aαα	1,53Bαα
JB	2,83Bαα	1,38Abα	1,47Abβ	1,74Bbβ	1,75Abα	2,62Aαα	1,98Aαβ	1,59Aαα	2,16Aαα

Os dados representam a média ± S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn ; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe; e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn (P <0.05)

4.3.4 Concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) das folhas de *P. glomerata* apresentou interação tripla entre os fatores Fe, Zn e acessos (Tabela 3A). O acesso GD foi o que apresentou a maior concentração de H_2O_2 em todas as combinações dos níveis de Fe e Zn.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn aumentou a concentração de H_2O_2 dos acessos BRA e JB e não causou alteração da concentração do acesso GD. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 200 μM reduziu a concentração de H_2O_2 dos acessos GD e BRA. Já no maior nível de Fe (1400 μM), o aumento nos níveis de Zn causou redução na concentração de H_2O_2 apenas do acesso GD e aumentou para os acessos BRA e JB.

Na condição controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe aumentou a concentração de H_2O_2 dos três acessos. Na presença de 200 μM Zn também houve aumento na concentração de H_2O_2 nos três acessos com o aumento para o nível mais alto de Fe (1400 μM). Já no mais alto nível de Zn (400 μM), o aumento do nível de Fe para 700 μM causou redução na concentração de H_2O_2 dos acessos BRA e JB; e o aumento para 1400 μM Fe causou um incremento na concentração de H_2O_2 dos três acessos.

Já para as raízes não houve diferença na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entre os acessos de *P. glomerata* na presença dos níveis controle de Fe e Zn (Tabela 3B). No entanto, os acessos diferiram tanto com o aumento nos níveis de Zn, quanto com o aumento nos níveis de Fe.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento nos níveis de Zn causou aumento na concentração de H_2O_2 para os três acessos. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 200 μM causou redução para o acesso GD e aumento para o acesso JB. Já na maior dose de Fe (1400 μM), a elevação no nível de Zn para 200 μM resultou em aumento na concentração de H_2O_2 para os acessos GD e BRA e a elevação para 400 μM causou redução para os acessos GD e JB.

Na condição controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe causou acréscimo na concentração de H_2O_2 para os três acessos. Já na presença de 200 μM houve decréscimo para os acessos GD e BRA e nenhuma alteração para o acesso JB. Na mais alta concentração de Zn (400 μM), o aumento do nível de Fe para 1400 μM reduziu a concentração de peróxido para os três acessos.

Tabela 3 Concentração de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ massa fresca) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de três acessos *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.

A) H_2O_2 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca)									
ACESSO	50 μMFe			700 μMFe			1400 μMFe		
	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn
GD	0,04Aa γ	0,04Aa β	0,05Aa β	0,07Aa β	0,06Ab α	0,05Ab β	0,09Aa α	0,06Aa α	0,08Ab α
BRA	0,02Bb β	0,02Bb β	0,03Ba β	0,02Ba β	0,01Bb β	0,02Ba γ	0,03Bb α	0,05Ba α	0,05Ba α
JB	0,02Bb β	0,02Bb β	0,03Ba β	0,02Ba β	0,02Ba β	0,02Ba γ	0,03Bb α	0,04Ca α	0,04Ba α
B) H_2O_2 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca)									
GD	0,014Aby	0,033Aa β	0,040Aa α	0,028Aa β	0,014Bby	0,012Aby	0,041Ab α	0,049Aa α	0,030Ac β
BRA	0,012Aby	0,026Ba β	0,029Ba α	0,021Ba β	0,014Bay	0,015Aa α	0,036Ab α	0,045Aa α	0,034Ab β
JB	0,008Aby	0,024Bay	0,024Ba α	0,016Bb β	0,024Aa γ	0,013Ab β	0,023Ba β	0,027Bay	0,015Bb β

Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

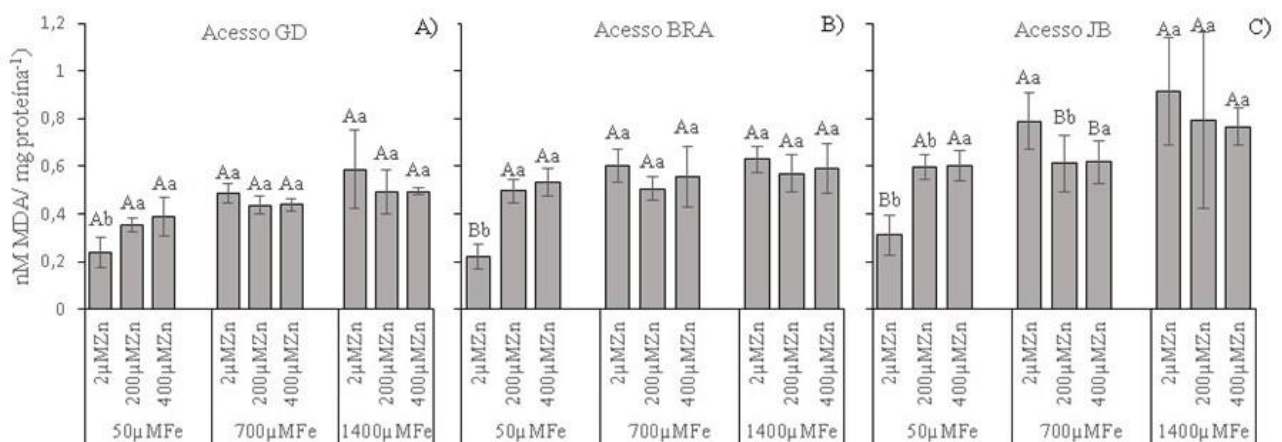
4.3.5 Peroxidação lipídica

A quantificação da peroxidação lipídica em folhas de *P. glomerata* foi feita em nM MDA/ mg proteína e apresentou interação dupla entre os níveis de Fe e Zn, não apresentando diferença significativa entre os acessos (Figura 3).

Na presença do nível controle de Fe (50 μ M), o aumento dos níveis de Zn aumentou a peroxidação lipídica dos acessos BRA e JB, chegando a 142% e 93% na presença de 400 μ M Zn, respectivamente. O acesso GD não apresentou alteração da peroxidação lipídica pelo excesso de Zn. Já na presença de 700 μ M Fe, o aumento do nível de Zn reduziu a peroxidação lipídica apenas do acesso JB; e no maior nível de Fe (1400 μ M), o aumento dos níveis de Zn não causou alteração da peroxidação lipídica de nenhum dos acessos.

Na condição controle de Zn (2 μ M), o aumento dos níveis de Fe aumentou a peroxidação lipídica dos três acessos. Na presença de 1400 μ M Fe esse aumento chegou a 106% para o acesso GD, 188% para BRA e 193% para o acesso JB. No entanto, na presença de 200 μ M Zn não houve alteração na peroxidação lipídica dos acessos GD e BRA em decorrência do excesso de Fe, apenas no acesso JB que apresentou aumento nessa condição na presença do nível mais alto de Fe (1400 μ M). Já no mais alto nível de Zn (400 μ M) não houve alteração da peroxidação lipídica devido ao excesso de Fe para nenhum dos três acessos.

Figura 3 Peroxidação lipídica (nM MDA/ mg proteína) de folhas de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe; e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).



Para as raízes, na presença dos níveis controle de Fe e Zn os três acessos não diferiram entre si (Tabela 4). Apenas na condição de alto Zn (400 μM) o acesso GD apresentou maior peroxidação lipídica, diferindo dos acessos BRA e JB.

Na condição controle de Fe (50 μM), com o aumento nos níveis de Zn apenas para o acesso GD apresentou aumento na peroxidação lipídica. Na presença de 700 μM Fe, o aumento nos níveis de Zn não alterou a peroxidação lipídica para nenhum dos três acessos. Já na maior dose de Fe (1400 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a peroxidação lipídica dos três acessos.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe causou um acréscimo significativo na peroxidação lipídica dos três acessos. No entanto, na presença de 200 μM houve alteração na concentração apenas para o acesso GD, para os acessos BRA e JB não houve alteração na peroxidação lipídica. Na mais alta concentração de Zn (400 μM), o aumento no nível de Fe aumentou a peroxidação lipídica para os acessos BRA e JB.

Tabela 4 Peroxidação lipídica (nM MDA/ mg proteína) de raízes de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.

ACESSO	Concentração de MDA (nM MDA/ mg proteína)								
	50 μM Fe			700 μM Fe			1400 μM Fe		
	2 μM Zn	200 μM Zn	400 μM Zn	2 μM Zn	200 μM Zn	400 μM Zn	2 μM Zn	200 μM Zn	400 μM Zn
GD	0,62A $\beta\gamma$	2,06A $\alpha\beta$	2,81A $\alpha\alpha$	2,92A $\alpha\beta$	2,99A $\alpha\alpha$	2,63A $\alpha\alpha$	4,01A $\alpha\alpha$	2,92A $\beta\alpha$	2,16A $\beta\alpha$
BRA	1,31A $\alpha\gamma$	1,98A $\alpha\alpha$	1,77B $\alpha\beta$	2,92A $\alpha\beta$	1,92A $\alpha\alpha$	2,30A $\alpha\beta$	3,86A $\alpha\alpha$	2,41A $\beta\alpha$	3,11A $\beta\alpha$
JB	1,18A $\alpha\gamma$	2,18A $\alpha\alpha$	1,85B $\alpha\beta$	2,30A $\alpha\beta$	2,78A $\alpha\alpha$	3,01A $\alpha\alpha$	4,36A $\alpha\alpha$	2,63A $\beta\alpha$	2,86A $\beta\alpha$

Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn ; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn (P <0.05).

4.3.6 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Não houve diferença na atividade da SOD entre folhas dos acessos de *P. glomerata* na presença dos níveis controle de Fe e Zn na solução nutritiva (Tabela 5). O aumento do nível de Fe para 1400 μM , na presença de 2 μM Zn, apenas diminuiu a atividade da SOD para o acesso JB.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn aumentou a atividade da SOD. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 400

μM reduziu a atividade da SOD dos acessos GD e JB. Já na maior dose de Fe (1400 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a atividade da SOD dos acessos GD e BRA.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe aumentou a atividade da SOD dos três acessos. No entanto, na presença de 200 μM Zn não houve alteração na atividade da SOD pelo excesso de Fe. Já para os acessos BRA e JB verificou-se aumento na atividade da SOD pelo excesso de Fe (700 μM). Na mais alta concentração de Zn (400 μM), o aumento do nível de Fe reduziu a atividade da SOD de modo mais marcante no acesso JB.

Tabela 5 Atividade da enzima superóxido dismutase (U mg^{-1} proteína) em folhas de três acessos *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.

ACESSO	Atividade superóxido dismutase (U mg^{-1} proteína)								
	50 μMFe			700 μMFe			1400 μMFe		
	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn
GD	1,74Aby	5,86Aaa	6,56Caa	6,59Aa β	6,43Aaa	3,89Bb β	10,39Aaa	5,84Bb α	6,95Ab α
BRA	1,15Ac β	3,83Bb β	8,12Baa	8,18Aaa	7,57Aaa	6,76Aaa	9,08Aaa	8,02Aaa	4,15Bb β
JB	2,36Ac β	4,55Bb β	10,25Aaa	7,09Aaa	6,44Aaa	4,67Bb γ	6,99Baa	6,54Baa	6,71Aa β

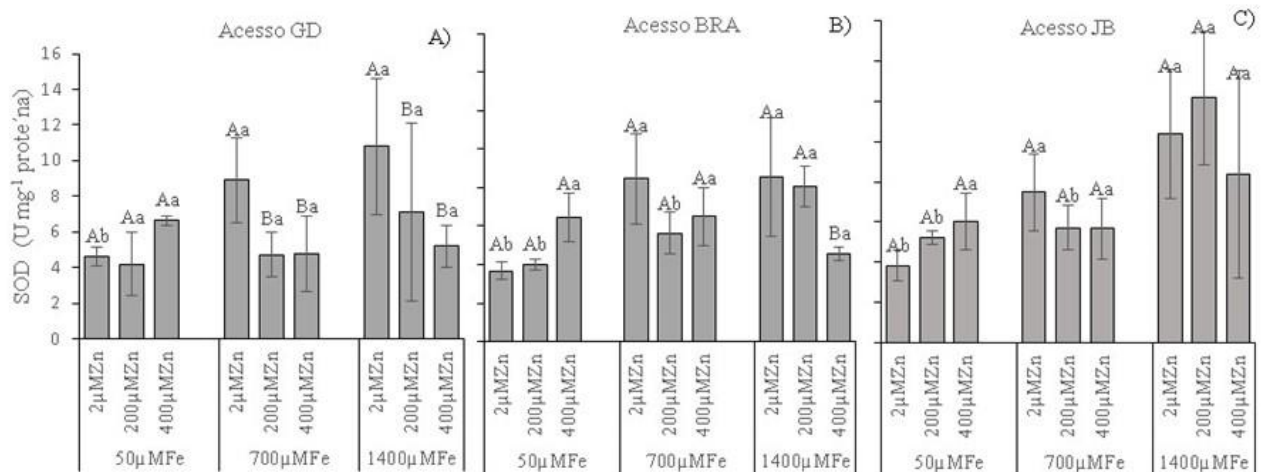
Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe; e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

Nas raízes houve interação dupla entre os níveis de Fe e Zn (Figura 4). A atividade mais alta da SOD foi observada para o acesso JB na presença de 1400 μM Fe e 200 μM Zn.

Na condição controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn não alterou a atividade da SOD para nenhum dos três acessos. No entanto, para o acesso GD, na presença de 700 μM Fe e 1400 μM Fe, o aumento dos níveis de Zn causou redução da atividade. Já os acessos BRA e JB não houve alteração da atividade com o aumento dos níveis de Zn na presença de 700 μM Fe e 1400 μM Fe.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe aumentou a atividade da SOD nos três acessos. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento do nível de Zn reduziu a atividade apenas para o acesso GD e não alterou a atividade para os demais acessos. Já na maior dose de Fe (1400 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a atividade da SOD dos acessos GD e BRA.

Figura 4 Atividade da enzima superóxido dismutase ($\text{U mg}^{-1}\text{ proteína}$) em raízes de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).



4.3.7 Parâmetros fotossintéticos

Os parâmetros fotossintéticos foram obtidos aos 21 dias após a adição dos tratamentos (DAT). Dentre esses, a taxa de assimilação líquida (A) e a eficiência do uso da água (EUA) apresentaram interação tripla entre os níveis de Fe, Zn e acessos (Tabela 7). A transpiração (E) apresentou interação dupla entre os níveis de Fe e Zn (Figura 5). Já os parâmetros condutância estomática (GS), concentração de CO_2 interno (Ci) e eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) não apresentaram efeito significativo devido a adição dos tratamentos.

Para a taxa de assimilação líquida (Tabela 7) houve diferença significativa entre os acessos de *P. glomerata*. Na presença do nível controle de Fe ($50 \mu\text{M}$), o aumento dos níveis de Zn causou redução para os acessos GD e BRA na taxa de assimilação líquida. No entanto, na presença de $700 \mu\text{M}$ Fe apenas o acesso JB apresentou redução com o aumento do nível de Zn para $400 \mu\text{M}$. Nessa mesma condição, aos 21 DAT, houve aumento na taxa de assimilação líquida do acesso GD e redução para os acessos BRA e JB. O acesso GD foi o único a apresentar aumento na taxa de assimilação líquida com excesso de Zn.

Na condição controle de Zn ($2 \mu\text{M}$), o aumento dos níveis de Fe reduziu a taxa de assimilação líquida dos três acessos. O acesso GD já apresentou redução com o aumento do nível de Fe para $700 \mu\text{M}$, chegando a 23% de redução com o aumento para o nível mais alto de Fe ($1400 \mu\text{M}$). Os acessos BRA e JB apresentaram redução apenas na condição mais elevada

de Fe (1400 μM). No entanto, na presença de 200 μM Zn, os acessos BRA e JB reduziram a taxa de assimilação líquida com o aumento dos níveis de Fe e o acesso GD não apresentou alteração devido ao excesso de Fe nessa condição. No nível mais alto de Zn (400 μM) houve redução da taxa de assimilação líquida apenas do acesso BRA na condição de alto Fe (1400 μM).

Para a eficiência do uso da água (Tabela 7) na condição controle dos níveis de Fe e Zn não houve diferença significativa entre os acessos GD e JB de *P. glomerata*, apenas o acesso BRA diferiu dos demais.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a eficiência do uso da água (EUA) para os três acessos. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 400 μM aumentou a EUA do acesso GD. Já na maior dose de Fe (1400 μM) e aumento dos níveis de Zn, os acessos BRA e JB não sofreram alteração e o acesso GD apresentou um aumento na presença de 200 μM Zn.

Na condição controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe reduziu a EUA dos três acessos. Contudo, na presença de 200 μM Zn, não houve alteração na EUA dos acessos GD e JB pelo excesso de Fe. No nível mais alto de Zn (400 μM), o aumento no nível de Fe não causou alteração para o acesso BRA, já os acessos GD e JB apresentaram aumento na EUA na presença de 700 μM Fe e um decréscimo com a elevação do nível para 1400 μM Fe.

Tabela 6 Taxa de assimilação líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e eficiência do uso da água ($\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.

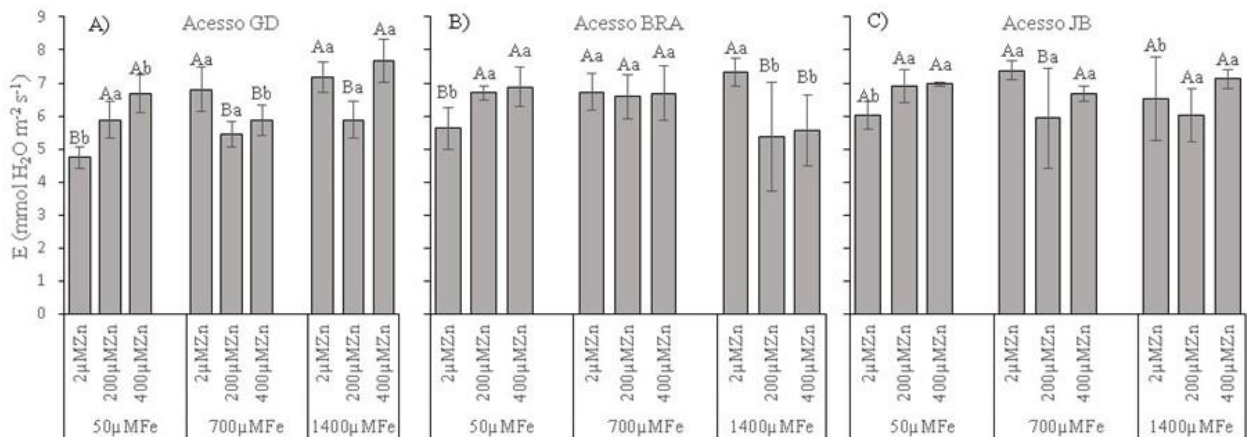
Taxa de assimilação líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)									
ACESSO	50 μMFe			700 μMFe			1400 μMFe		
	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn	2 μMZn	200 μMZn	400 μMZn
GD	15,44Ba α	15,70Aa α	14,01Aa β	13,60Bb β	15,13Aa α	16,31Aa α	11,93Bc γ	15,69Aa α	13,83Bb β
BRA	12,72Ca α	11,816Ba α	10,33Cb α	11,74Ca α	8,12Bb β	7,65Bb β	10,54Ba β	7,85Cb β	7,29Cb β
JB	17,59Aa α	15,40Cb α	12,57Bc β	18,63Aa α	14,30Ab β	15,58Cb α	15,97Aa β	12,66Bb β	16,38Aa α
EUA ($\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$)									
GD	3,270Aa α	2,560Ab α	2,112Ac β	2,018Bb β	2,786Aa α	2,820Aa α	1,670Bb β	2,688Aa α	1,796Ab β
BRA	2,297Ba α	1,763Bb α	1,516Bb α	1,743Ba β	1,240Bb β	1,144Cb α	1,449Ba β	1,689Ca α	1,325Ba α
JB	2,949Aa α	2,244Ab α	1,805Bc β	2,530Aa β	2,500Aa α	2,329Ba α	2,010Aa γ	2,142Ba α	1,741Aa β

Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe; e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

Para a taxa de transpiração (E) houve interação dupla entre os níveis de Fe e Zn (Figura 5). Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn aumentou a transpiração para os acessos GD e BRA, já o acesso JB não sofreu alteração na transpiração pelo excesso de Zn. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento dos níveis de Zn reduziu a transpiração dos acessos GD e JB. Já no maior nível de Fe (1400 μM), o acesso GD apresentou redução na taxa de transpiração com o aumento do nível de Zn para 200 μM e do acesso BRA na presença de 200 μM Zn e 400 μM Zn.

Na condição controle de Zn (2 μM), o aumento nos níveis de Fe causou acréscimo na transpiração dos três acessos. No entanto, para o acesso JB, esse acréscimo ocorreu apenas no nível de 700 μM Fe. Na presença de 200 μM Zn não houve alteração na transpiração dos acessos GD e JB devido ao excesso de Fe. O acesso BRA apresentou redução na transpiração pelo excesso de Fe (1400 μM). No maior nível de Zn (400 μM), o excesso de Fe (1400 μM) aumentou a transpiração do acesso GD e reduziu do acesso BRA.

Figura 5 Taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe; e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).



4.4 DISCUSSÃO

Muitos estudos realizados têm chamado a atenção para a importância da coordenação entre mecanismos homeostáticos entre diferentes metais. No presente estudo foi observado para

a maioria dos parâmetros analisados que a interação entre alguns níveis dos metais Fe e Zn na solução nutritiva resultou em melhorias das condições impostas pela toxidez desses metais. Em concordância com o exposto, Shanmugam et al. (2011) relataram que plantas de *A. thaliana* na presença de excesso de Zn reduziram o acúmulo de Fe na parte aérea e que em plantas de *A. halleri* um ajuste fino na homeostase do Fe contribuiu para a tolerância ao excesso de Zn.

No presente estudo, observou-se que o aumento dos níveis de Fe causou reduções mais severas que aquelas observadas para o aumento dos níveis de Zn para os três acessos de *P. glomerata*, indicando maior sensibilidade ao excesso desse metal. Também observou-se grande variabilidade entre os acessos no presente estudo. O acesso GD apresentou-se mais tolerante tanto ao excesso de Fe quanto ao excesso de Zn, com menor redução de parâmetros MSPA e MST (Figura 1), área foliar (Figura 2), menor diminuição na concentração de clorofila *a* e total (Tabela 2). Além disso, não apresentou alteração na concentração de H₂O₂ (Tabela 3A) e nem da peroxidação lipídica (Figura 3) devido ao excesso de Zn. Já o acesso BRA apresentou-se mais sensível, principalmente ao excesso de Fe, com intensa redução da área foliar (Figura 2).

Uma provável explicação para essa variabilidade entre os acessos é a utilização de diferentes estratégias para mitigar os efeitos impostos pela toxidez. Percebe-se que o acesso GD, além de ter a maior produção de biomassa, também respondeu de modo diferente dos demais (BRA e JB) na produção de MSPA, MST e MSR. Na condição de alto Zn (400 µM) e alto Fe (1400 µM), o acesso GD foi o único que respondeu à interação, diminuindo a produção de MSPA e aumentando a produção de MSR, indicando que esse acesso possui maior capacidade de adaptação à condição de estresse. Os acessos BRA e JB não apresentaram alterações nesses parâmetros nessa condição de estresse.

Soares et al. (2001) observaram que a concentração de Fe na parte aérea das espécies *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* foi altamente reduzida com o aumento dos níveis de Zn, chegando a 65% de redução no nível de 1600 µM Zn. Para esses autores, os elevados níveis de Zn não afetam a absorção de Fe, mas sim a translocação do Fe absorvido para a parte aérea. Sugere-se que, no presente estudo, o acúmulo de Fe nas raízes reduziu a translocação de outros minerais para a parte aérea, causando decréscimo no crescimento.

Também cabe salientar que a exposição aos altos níveis de metais, a exemplo do excesso de Zn, é responsável por causar várias alterações na fisiologia da planta, tais como, redução no crescimento, clorose em folhas jovens, deficiência de Fe, desequilíbrio osmótico e redução da fotossíntese (CLEMENS, 2002; BROADLEY et al., 2007; GALLEGO et al., 2012).

Outro parâmetro indicativo do crescimento é a área foliar, uma vez que os processos fotossintéticos dependem da interceptação da luz solar e sua conversão em energia química

(FAVARIN et al., 2002). De acordo com o que foi observado por Sagardoy et al. (2009) houve uma redução na área foliar de *Beta vulgaris* em altos níveis de Zn. Casierra-Posada e Poveda (2005) também reportaram uma redução de 31% na área foliar em plantas de morango. Os resultados encontrados nesse estudo vão ao encontro do observado por esse autor, visto que os três acessos apresentaram redução nos parâmetros de MSPA, MST, MSR, área foliar e comprimento da parte aérea devido ao excesso tanto de Fe quanto de Zn.

Quanto ao excesso de Fe, diversos estudos realizados confirmam a participação desse elemento na reação de Fenton, gerando níveis tóxicos de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MARSCHNER, 1995; CLEMENS, 2001; SCHUTZENDUBEL e POLLE, 2002; WILLIAMS e PITTMAN, 2010; SHANMUGAM et al., 2011) causando severas reduções no crescimento e na produtividade das plantas (JUCOSKI et al., 2013; SILVEIRA et al., 2007). Os resultados encontrados no presente estudo estão em concordância com isso, pois, nos níveis altos de Fe houve significativa redução na massa seca e área foliar, também houve aumento na concentração de H₂O₂ e na peroxidação lipídica em folhas submetidas a tais condições. O aumento na peroxidação lipídica já foi relatado para outros metais como o cádmio (SCHUTZENDUBEL e POLLE, 2002; MARTINS et al., 2011; GOPAL e NAUTIYAL, 2011)

Com o objetivo de controlar o nível de EROs e proteger as células do dano oxidativo, as plantas possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peroxidases não específicas (POD), envolvidas no processo de detoxificação por metais pesados (GRATÃO et al., 2005). Nesse estudo, observou-se que o aumento dos níveis de Fe proporcionou aumento na atividade da SOD, indicando que existe atuação desse sistema antioxidante na detoxificação pelo excesso desse metal (tabela 4). No entanto, também observou-se que o acesso GD não apresentou alteração na concentração de H₂O₂ e nem na peroxidação lipídica devido ao excesso de Zn, o que sugere que para esse acesso existe uma atuação eficiente de enzimas peroxidases ou então um sistema antioxidante não enzimático atuando no processo de detoxificação.

O fato de não ter havido alteração na concentração H₂O₂ na condição de excesso de Zn pode estar relacionado com uma maior eficiência do sistema antioxidante para esse metal ou então, que nesse caso, o H₂O₂ não é a ROS responsável pela peroxidação lipídica.

Metais pesados podem inibir o processo fotossintético em vários estágios e através de diversos mecanismos, como aumento da resistência estomática, degradação da clorofila ou comprometimento da atividade do fotossistema II (PSII) (BAZZAZ e GOVINDJEE, 1974; BASZYNSKI et al., 1989; LI et al., 2013). O aumento dos níveis de Zn no presente estudo promoveu um descréscimo na taxa de assimilação líquida (Tabela 7). Cambrollé et al. (2013)

encontraram resultados semelhantes em *Limoniastrum monopetalum* (L.), onde aumentos no nível de Zn superiores a 90 μM causaram um declínio na atividade fotossintética. A inibição da fotossíntese, nesse caso, pode ser resultado da privação de Zn para a atividade da enzima anidrase carbônica, a qual limita a carboxilação.

O acesso GD apresentou um decréscimo na taxa de assimilação líquida na condição de alto Zn (400 μM) e alto Fe (1400 μM). Esse decréscimo pode ser atribuído a redução da área foliar, uma vez que esse acesso deixou de investir na produção de parte aérea e investiu na produção de raiz nessa condição.

Vijayarengan e Mahalakshmi (2013) reportaram um redução dos pigmentos fotossintéticos em plantas de tomateiro crescendo em condições de excesso de Zn, eles relacionaram essa redução a uma interferência do excesso de Zn na síntese da clorofila. Em relação a interferência do excesso de Fe nos pigmentos fotossintéticos, Jucoski et al. (2016) relataram um decréscimo de 65% na concentração de clorofila *a* na presença de 2,0 mM Fe em *Eugenia uniflora*. Nesse mesmo estudo não foi observado efeito significativo do excesso de Fe na concentração de clorofila *b*. No presente estudo, constatou-se uma redução na concentração de clorofila *a* do acesso JB devido tanto ao excesso de Zn, quanto ao excesso de Fe, corroborando com os dados expostos. No entanto, esse mesmo acesso apresentou recuperação na concentração de clorofila *a* quando houve interação entre os altos níveis de Fe e Zn (Tabela 2).

Fukao et al (2011); Shanmugam et al. (2011) e Pineau et al. (2012) consideraram que a competição entre Fe e Zn desempenha um papel muito importante na tolerância ao excesso de Zn em *A. thaliana*, na qual o excesso de Fe aliviou a toxidez por Zn. Esses autores observaram que o excesso de Zn reduziu significativamente o conteúdo de Fe e induziu a expressão dos transportadores ZIP regulados pelo ferro, IRT1 e IRT2, sensíveis a baixa concentração de Fe no meio. No entanto, esses mesmos transportadores possuem também afinidade pelo Zn. Os mesmos autores observaram que em espécies hiperacumuladoras de Zn como *A. halleri*, a absorção de Zn é realizada principalmente por transportadores ZIP regulados pelo Zn, sem causar distúrbio na expressão dos transportadores ZIP regulados pelo Fe.

Ainda em relação a homeostase desses metais, o gene *AtFRD3* codifica um transportador de citrato para o carregamento do xilema e é importante pra a nutrição por Fe. Rogers e Guerinot (2002) identificaram que o FDR3 está envolvido na sinalização da deficiência de Fe. No referido estudo, o fenótipo das plantas mutantes *frd3* indicaram que ele é um componente importante no mecanismo homeostático do Fe em *A. thaliana*. Pineau et al. (2012) em seu estudo confirmaram a importância da coordenação da homeostase entre Fe e Zn para a

tolerância ao excesso de Zn e que o FDR3 atua como principal regulador dessa homeostase cruzada (ROGERS e GUERINOT, 2002).

4.5 CONCLUSÃO

Para a maior parte dos parâmetros analisados (produção de massa seca, área foliar, taxa de assimilação líquida e transpiração) o excesso de Fe e Zn causaram efeito negativo para os três acessos de *P. glomerata*. No entanto, foi possível observar que o aumento nos níveis de Fe causou reduções mais severas que aquelas observadas para o aumento nos níveis de Zn.

Em relação à variabilidade entre os acessos, é possível perceber que o acesso GD diferencia-se dos demais na condição de alto Fe e alto Zn, mostrando respostas de adaptação à condição de estresse. Já os acessos BRA e JB apresentaram maior sensibilidade aos altos níveis desses metais e menor recuperação com a interação entre eles, com poucas respostas de adaptação à condição de estresse imposta.

4.6 REFERÊNCIAS

- BASZYNSKI, T.; WAJDA, L.; KROL, M.; WOLINSKA, D.; KRUPA, Z.; TUKENDORF, A. Photosynthetic activities of cadmium treated tomato plants. **Physiologia Plantarum**, v. 48, p. 365-370, 1980.
- BAZZAZ, M. B.; GOVINDJEE. Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. **Environmental Letters**, v. 6, p. 1-12, 1974.
- BERNARDY, K. **Efeito do zinco em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**. v.173, n.4, p.677-702, 2007.
- CALGAROTO, N.S. **Efeitos fisiológicos do mercúrio em plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- CAMBROLLÉ, J.; LEYTON, J. M.; VALLES, S. M.; LUQUE, E. F; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum*(L.) Boiss. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, p. 50-57, 2013.
- CASIERRA-POSADA, F.; POVEDA, J. La toxicidad por exceso de Mn y Zn disminuye la producción de materia seca, los pigmentos foliares y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp. cv. Camarosa). **Agronomia Colombiana**, v. 23, p. 285-289, 2005.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G.; KRAMER, U. A long way ahead: Understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 309-315, 2001.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G.; KRÄMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 309-315, 2002.

EL-MOSHATY, F. et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings pot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p. 109-119, 1993.

FAVARIN, J. L. et al. Equações para a estimativa do índice de área foliar para o cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 769-773, 2002.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, v. 45, São Carlos, p. 235, 2000.

FUKAO, Y. et al. iTRAQanalysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1893-1907, 2011.

FREITAS, C. S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v.74, n.9, p.1167-1179, 2004.

GOPAL, R.; NAUTIYAL, N. Phytotoxic effects of cádmium exposure and metal accumulation in sunflower. **Journal of Plant Nutrition**, v. 34, n. 11, p. 1616-1624, 2011.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.

GROTZ, N.; GUERINOT, M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Bichimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 595-608, 2006.

HISCOX, J. D; ISRAELSTAM, G. E. A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1132-1134, 1979.

JUCOSKI, G. O. et al. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. plants. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 35, p. 1645-1657, 2013.

KAMADA, T. et al. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.3, p.403-409, 2009.

KRÄMER, U. Metal hyperaccumulation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 517-534, 2010.

LI, X. et al. Zinc induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.89, n.1, p.150-157, 2013.

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

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v.17, p. 1781-1787, 2001.

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para o cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J. V. et al. **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, p.323-332, 2000.

MALDANER, R. **Toxidez de alumínio em genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MARTINS, L.L.et al. Oxidative stress induced by cádmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidante responses in diferente plant parts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1375-1383, 2011.

MARQUES, L. C. et al. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v.18, n.7, p.566-572, 2004

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1995. 902p.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 5, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomertata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, p. 11-18, 2001.

PINEAU, C. et al. Natural Variation at the FRD3 MATE Transporter Locus Reveals Cross-Talk between Fe Homeostasis and Zn Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, 2012.

REICHMAN, S. M. The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. **Australian Minerals, Energy and Environment Foundation**, v.14, 59 p., 2002.

ROGERS, E.; GUERINOT, M. L. FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 14, p. 1787-1799, 2002.

SAGARDOY, R.; MORALES, F.; LÓPEZ-MILLÁN, A.-F; ABADÍA, A.; ABADÍA J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v. 11, p. 339–350, 2009.

SCHUTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p. 1351-1365, 2002.

SHANMUGAM, V. et al. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* – the role in zinc tolerance. **New Phytologist**, v. 190, n.1, p. 125-137, 2011.

SKREBSKY, E. C. et al. Caracterização das exigências nutricionais de mudas de *Pfaffia glomerata* em Argissolo Vermelho distrófico arênico pela técnica do nutriente faltante. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.989-996, 2008.

SOARES, C. R. F. S. et al. Toxidez de Zn no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, n. 2, p. 339-348, 2001.

SILVEIRA, V. C. et al. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 12, p. 127-139, 2007.

TABALDI, L. A. et al. Physiological and oxidative stress responses of four potato clones to aluminum in nutrient solution. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p. 211-222, 2007.

VIJAYARENGAN, P.; MAHALAKSHMI, G. Changes in the photosynthetic responses and biochemical constituents of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under Zinc stress. **World Applied Sciences Journal**, v. 24, p. 654-659, 2013.

VIGO, C. L. S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.7-19, 2004.

VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, v. 71, p. 1-15, 1995.

WILLIAMS, L. E.; PITTMAN, J. K. Dissecting pathways in involved manganese homeostases and stress in higher plants. Cell Biology and Nutrients. In: HELL, R.; MENDAL, R. (eds). **Plant Cell Monographs**, v. 17. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 95–117.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **International Scholarly Research Network Ecology**, 2011: 1-20.

ZIMMER, A. R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p.450-453, 2006.

ZHU, Z.; WEI, G.; LI, J.; QIAN, Q.; YU, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 167, p. 527-533, 2004.

5 EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FERRO E ZINCO EM PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E BIOMÉTRICOS DE RAÍZES DE TRÊS ACESSOS DE *Pfaffia glomerata*

RESUMO

Os efeitos da interação entre ferro (Fe) e zinco (Zn) foram estudados com o objetivo de avaliar sua influência na produção de massa seca e em parâmetros biométricos radiculares, bem como de classificar os acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen de acordo com seu nível de tolerância ao excesso de Zn, Fe e sua resposta à interação desses metais. Os tratamentos consistiram da combinação trifatorial entre três níveis de Fe (50, 700 e 1400 μM), três níveis de Zn (2, 200 e 400 μM) e três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB). Dez plantas de cada acesso permaneceram em cultivo por 21 dias em contato com a solução nutritiva. Os três acessos apresentaram redução da massa seca de parte aérea de raízes, bem como dos parâmetros biométricos radiculares, tanto devido ao excesso de Fe, quanto ao excesso de Zn. Notavelmente, o excesso de Fe apresentou um maior impacto na redução dos parâmetros dos três acessos radiculares em relação ao excesso de Zn. No entanto, foi possível observar grande variabilidade entre os acessos. O acesso BRA mostrou-se mais sensível, tanto ao excesso de Fe quanto ao excesso de Zn, com redução de aproximadamente 90% no comprimento radicular na condição de excesso de Fe e sem resposta positiva à interação. A interação entre os altos níveis de Fe e Zn foi especialmente positiva para o acesso GD, que mesmo em condição de excesso desses foi capaz de manter a robustez do sistema radicular, sugerindo a possibilidade de seu uso em áreas de contaminação.

Palavras-chave: Crescimento, metais pesados, ginseng brasileiro, comprimento radicular, volume radicular.

5.1 INTRODUÇÃO

A contaminação de áreas agrícolas por metais pesados e outros elementos tóxicos tem sido, nas últimas décadas, um dos grandes desafios da ciência devido ao potencial risco à saúde humana e aos ecossistemas (WUANA e OKIEIMEN, 2011). Os metais pesados ocorrem naturalmente em solos agrícolas em baixas concentrações, no entanto, o emprego de alguns desses elementos em fungicidas, fertilizantes e esterco de animais pode elevar suas

concentrações no solo e torná-los tóxicos (REICHMAN, 2002; MARSOLA et al., 2005; OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2011). Vários efeitos biológicos da toxidez individual por esses metais já são conhecidos, no entanto, a combinação entre eles é extremamente comum na natureza e os efeitos dessas combinações ainda necessitam ser estudados (WILDE et al., 2006; CVJETKO et al., 2010).

Entre os metais pesados de ocorrência natural no solo, alguns como o ferro (Fe) e o zinco (Zn) apresentam funções fisiológicas diversas e são, portanto, essenciais aos seres vivos (CARNEIRO et al., 2001; LASAT, 2002; OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2011). Esses elementos estão envolvidos em processos fundamentais como a biossíntese de enzimas e também relacionados ao processo fotossintético. No entanto, são ambos tóxicos quando presentes em altas concentrações e, desse modo, é necessário que as plantas obtenham um balanço entre a absorção, utilização e armazenamento desses metais para manter sua homeostase (GROTZ e GUERINOT, 2006).

A interação entre Fe e Zn já é bem conhecida e pode ser explicada por suas características de solubilidade semelhantes e também pela competição pela absorção e translocação (MARSCHNER, 2012). A coordenação na homeostase entre esses metais é fundamental para a tolerância ao excesso de Zn (PINEAU et al., 2012). Além dessa coordenação do equilíbrio iônico, as plantas também utilizam diferentes mecanismos de mitigação dos efeitos negativos da alta concentração de metais no seu meio de crescimento (BAKER, 1981).

A *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen tem sido alvo de diversos estudos que relacionam os efeitos de metais pesados como mercúrio (Hg), arsênio (As), cobre (Cu), cádmio (Cd) e Zn. Nesses trabalhos foi mostrado que essa espécie possui razoável tolerância a esses metais, mas também apresentou grande variabilidade genética, quando se comparou diferentes acessos (CALGAROTO, 2009; GUPTA et al., 2013; NEIS, 2013; SKREBSKY, 2007; BERNARDY et al., 2016). A grande diversidade genética que existe entre as populações naturais de *P. glomerata* (KAMADA et al., 2009) pode resultar em uma variabilidade significativa em relação aos níveis de tolerância aos metais pesados. Portanto, essa variabilidade pode ser utilizada como ferramenta na seleção de plantas para cultivo em áreas degradadas, bem como em estudos de mecanismos fisiológicos específicos.

O cultivo em solução nutritiva (hidropônico) é uma alternativa rápida ao cultivo a campo, além de proporcionar a possibilidade de avaliar a interação entre elementos com maior controle. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a influência das interações entre níveis de Fe e Zn na produção de massa seca e parâmetros biométricos radiculares, bem como classificar

os acessos de *P. glomerata* de acordo com seu nível de tolerância ao excesso de Zn, Fe e sua resposta à interação desses metais.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Utilizou-se três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB). O acesso JB pertence a coleção do Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o acesso BRA foi obtido da coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e o acesso GD pertence a coleção de plantas medicinais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

As plantas utilizadas nesse experimento são provenientes de cultura *in vitro* de segmentos nodais com 1 cm de comprimento e sem folhas, obtidos da porção mediana de plantas micropropagadas, cultivadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 6 g L⁻¹ ágar, 30 g L⁻¹ sacarose, 0,1 g L⁻¹ mio-inositol, e com ausência de reguladores de crescimento, como previamente descrito por Nicoloso et al. (2001).

Após 21 dias de crescimento em condições *in vitro*, dez plantas homogêneas foram selecionadas e aclimatadas em bandejas plásticas contendo 17 litros de solução nutritiva em sistema hidropônico aerado em casa de vegetação. As plantas de cada acesso foram fixadas em placas de poliestireno com esponja e foram submetidas a seguinte solução nutritiva (em µM) descrita por Tabaldi et al. (2007): 6090,5 N; 974,3 Mg; 4986,76 Cl; 2679,2 K; 2436,2 Ca; 359,9 S; 243,592 P; 0,47 Cu; Mn 2,00; 1,99 Zn; Ni 0,17; 24,97 B; 0,52 Mo; 47,99 Fe (FeSO₄ / Na EDTA).

Ao final de um período de aclimação de 7 dias, foram adicionados na solução nutritiva os tratamentos de 700 e 1400µM de Fe (FeSO₄ / Na EDTA) e de 200 e 400µM (ZnSO₄), bem como todas as combinações, totalizando 9 tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições de cada tratamento. O tratamento controle foi composto apenas pelas concentrações originais de Fe e Zn presentes na solução nutritiva, sem adições. A troca de solução nutritiva foi feita a cada 7 dias e o pH ajustado a cada 2 dias para 5,5.

5.2.2 Produção de massa seca e biometria radicular

Aos 21 dias após adição dos tratamentos (DAT), as folhas, colmos e raízes foram coletadas e colocadas em sacos de papel e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante. Para a biometria radicular foi coletada uma planta por repetição, as raízes foram separadas da parte aérea e após foram lavadas, umedecidas e congeladas em sacos de papel em freezer a aproximadamente -20°C por 7 dias. Após esse período, as raízes foram descongeladas a temperatura ambiente por 30 minutos e digitalizadas com o auxílio de um scanner Epson 11000 XL e a análise da biometria radicular foi obtida com o suporte do software WinRhizo Pro, o qual determina o comprimento total, área superficial, volume total e o diâmetro médio das raízes.

5.2.3 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, usando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Massa seca

No presente estudo, as variáveis massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca total da planta (MST) apresentaram interação dupla entre os níveis de Fe e Zn (Figura 6). Os três acessos (GD, BRA e JB) apresentaram reduções significativas na produção de MSPA e MST tanto pelo aumento do nível de Zn quando associado ao nível controle de Fe (50 µM), quanto pelo aumento dos níveis de Fe, junto a condição controle de Zn (2 µM). O acesso GD mostrou-se tolerante ao aumento nos níveis de Fe e Zn, enquanto BRA mostrou-se o mais sensível, já JB mostrou uma resposta intermediária.

Na presença do nível controle de Fe (50 µM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a MSPA e MST para os três acessos. No entanto, na presença de 1400 µM Fe, o aumento do nível de Zn para 200 µM aumentou a produção de MSPA e MST para o acesso GD. Para os acessos

BRA e JB, na presença de 700 e 1400 μM Fe, o aumento dos níveis de Zn não resultou em alteração na produção de massa seca.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe causou redução na produção de MSPA e MST para os três acessos. Já na presença de 200 μM Zn não houve alteração na produção pelo excesso de Fe para nenhum dos três acessos. Na mais alta concentração de Zn (400 μM), o aumento no nível de Fe reduziu a produção de MSPA e MST apenas para o acesso GD, nos demais não houve alteração na produção de MSPA e MST.

A variável massa seca de raízes (MSR) apresentou interação tripla entre os fatores avaliados (Tabela 8). Na condição controle de Fe e Zn na solução nutritiva os acessos GD e JB não diferiram na produção de MSR, enquanto o acesso BRA apresentou menor média, diferindo dos demais.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a MSR para os três acessos. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 200 e 400 μM incrementou a MSR para o acesso GD, já para o acesso JB o aumento para 400 μM Zn causou redução e o acesso BRA não apresentou alteração. Já no maior nível de Fe (1400 μM), o aumento dos níveis de Zn aumentou a produção de MSR apenas para o acesso GD.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe reduziu a produção de MSR dos três acessos. Já na presença de 200 μM Zn não houve alteração na produção de MSR pelo excesso de Fe para os acessos GD e BRA. Já para o acesso JB verificou-se aumento na produção de MSR pelo excesso de Fe (700 μM). Na mais alta concentração de Zn (400 μM), o aumento do nível de Fe aumentou a produção de MSR para o acesso GD, mas não causou alteração nos acessos BRA e JB.

Figura 6 Massa seca de parte aérea (A, B e C) e massa seca total da planta (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

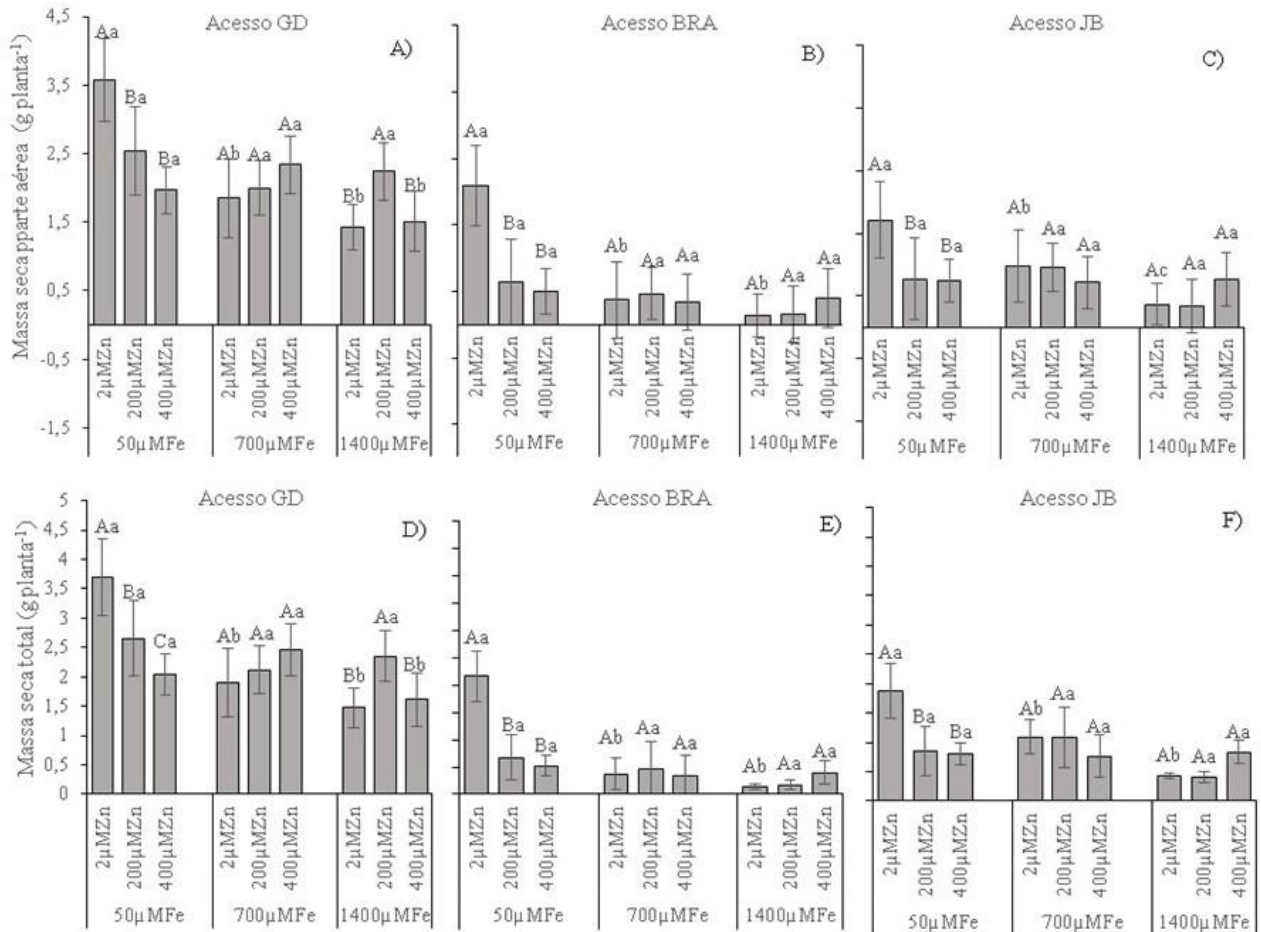


Tabela 7 Massa seca de raízes (g planta⁻¹) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn.

ACESSO	Massa seca de raízes (g planta ⁻¹)								
	50μMFe			700μMFe			1400μMFe		
	2μMZn	200μMZn	400μMZn	2μMZn	200μMZn	400μMZn	2μMZn	200μMZn	400μMZn
GD	0,14Aaα	0,11Aba	0,07Acβ	0,05Bbβ	0,12Aaα	0,11Aaα	0,04Abβ	0,11Aaα	0,10Aaα
BRA	0,06Baα	0,03Cba	0,02Bba	0,01Caβ	0,01Baα	0,01Caα	0,01Baβ	0,01Caα	0,01Caα
JB	0,16Aaα	0,08Bbβ	0,06Aba	0,10Aaβ	0,12Aaα	0,05Bba	0,06Aaγ	0,05Baβ	0,07Baα

Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe; e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

5.3.4 Parâmetros biométricos radiculares

5.3.4.1 Comprimento radicular

Houve interação tripla entre os fatores em relação ao comprimento radicular (Tabela 9). Na presença dos níveis controle de Fe e Zn, o acesso GD apresentou o maior comprimento radicular entre os três acessos e o acesso JB apresentou o menor valor. O aumento no nível de Fe para 1400 μM , na presença de 2 μM Zn diminuiu o comprimento radicular dos três acessos.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento nos níveis de Zn reduziu o comprimento radicular dos três acessos em 37, 79 e 40% para GD, BRA e JB, respectivamente. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento no nível de Zn para 200 μM e 400 μM aumentou o comprimento radicular apenas para o acesso GD. No maior nível de Fe (1400 μM), o acesso GD mostrou o mesmo comportamento na presença de 200 μM e 400 μM Zn. Já os acessos BRA e JB não apresentaram aumento no comprimento radicular em nenhuma combinação dos níveis de Fe e Zn.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento dos níveis de Fe causou decréscimo no comprimento radicular para os três acessos em 83, 91 e 82% para GD, BRA e JB, respectivamente. Já na presença de 200 μM Zn houve redução no comprimento pelo excesso de Fe para os acessos GD e JB. Para o acesso BRA não se verificou aumento no comprimento radicular com o aumento nos níveis de Zn na condição de excesso de Fe (700 μM e 1400 μM).

5.3.4.2 Área superficial

Houve interação tripla entre os fatores em relação ao Fe, Zn e acessos para esse parâmetro (Tabela 9). Nos níveis controles de Fe (50 μM) e Zn (2 μM) na solução nutritiva houve diferença significativa entre os acessos, sendo que o acesso GD apresentou a maior média e o acesso JB apresentou a menor média.

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu a área superficial apenas para o acesso GD no nível de 400 μM Zn (35%) e BRA no nível de 200 μM (80%) e 400 μM Zn (79%). Já o acesso JB não apresentou alteração. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento no nível de Zn para 200 μM e 400 μM aumentou a área superficial dos acessos GD e JB. O mesmo ocorreu na presença de 1400 μM para os acessos GD e JB.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento nos níveis de Fe reduziu a área superficial radicular para os três acessos. No entanto, na presença de 200 μM Zn não houve alteração na área superficial pelo excesso de Fe, exceto para o acesso JB no nível de 1400 μM Fe, que apresentou redução significativa na presença de 200 μM Zn. Na presença de 400 μM , apenas o acesso GD apresentou aumento na área superficial no nível de 1400 μM Fe.

5.3.4.3 *Volume radicular*

Para esse parâmetro analisado, houve interação dupla entre os fatores Fe e Zn (Figura 7). Na condição controle de Fe (50 μM), o aumento nos níveis de Zn causou uma redução mais severa para os acessos BRA e JB. Já para o acesso GD essa redução no volume radicular só foi significativa para 400 μM Zn.

Na presença do nível de 700 μM Fe, o aumento no nível de Zn não alterou o volume radicular dos três acessos. No entanto, na presença de 1400 μM Fe, o aumento do nível de Zn para 200 μM e 400 μM proporcionou um aumento no volume radicular do acesso GD, chegando a valores próximos àqueles observados na condição controle de Fe e Zn. O acesso JB apresentou aumento do volume radicular na presença de 1400 μM Fe apenas na presença de 400 μM Zn, já o acesso BRA não apresentou alteração em nenhum nível de interação entre Fe e Zn.

Na presença do nível controle de Zn (2 μM), o aumento nos níveis de Fe reduziu o volume radicular para os três acessos. No entanto, na condição de 200 μM Zn não houve alteração no volume radicular pelo excesso de Fe. Somente para os acessos GD e JB, o aumento nos níveis de Fe na presença de 400 μM de Zn alteraram o volume radicular, aumentando para valores semelhantes àqueles obtidos na condição controle de Fe e Zn.

5.3.4.4 *Diâmetro radicular*

Na presença dos níveis controle de Fe e Zn na solução nutritiva os três acessos apresentaram valores semelhantes de diâmetro radicular (Figura 7).

Na presença do nível controle de Fe (50 μM), o aumento dos níveis de Zn reduziu o diâmetro radicular para os três acessos. No entanto, na presença de 700 μM Fe, o aumento nos níveis de Zn para 200 μM e 400 μM não alteraram o diâmetro radicular para nenhum acesso. Contudo, na condição de 1400 μM Fe, o aumento nos níveis de Zn causou aumento no diâmetro radicular para os acessos GD e JB. O acesso BRA não respondeu a essa interação.

Na presença do nível controle de Zn ($2 \mu\text{M}$), o aumento dos níveis de Fe reduziu o diâmetro das raízes dos três acessos. No entanto, na presença de $200 \mu\text{M}$ Zn não houve alteração do diâmetro radicular pelo excesso de Fe. Já para os acessos GD e JB verificou-se que o aumento dos níveis de Zn reverteu a redução causada pelo excesso de Fe ($1400 \mu\text{M}$). Para o acesso BRA não se verificou alteração também para essa interação.

Figura 7 Volume radicular (A, B e C) e diâmetro radicular da planta (D, E e F) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três níveis de Fe e Zn. Os dados representam a média \pm S.D. de quatro diferentes repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn dentro de um mesmo nível de Fe; e as letras minúsculas indicam diferença nos diferentes níveis de Fe no mesmo nível de Zn ($P < 0.05$).

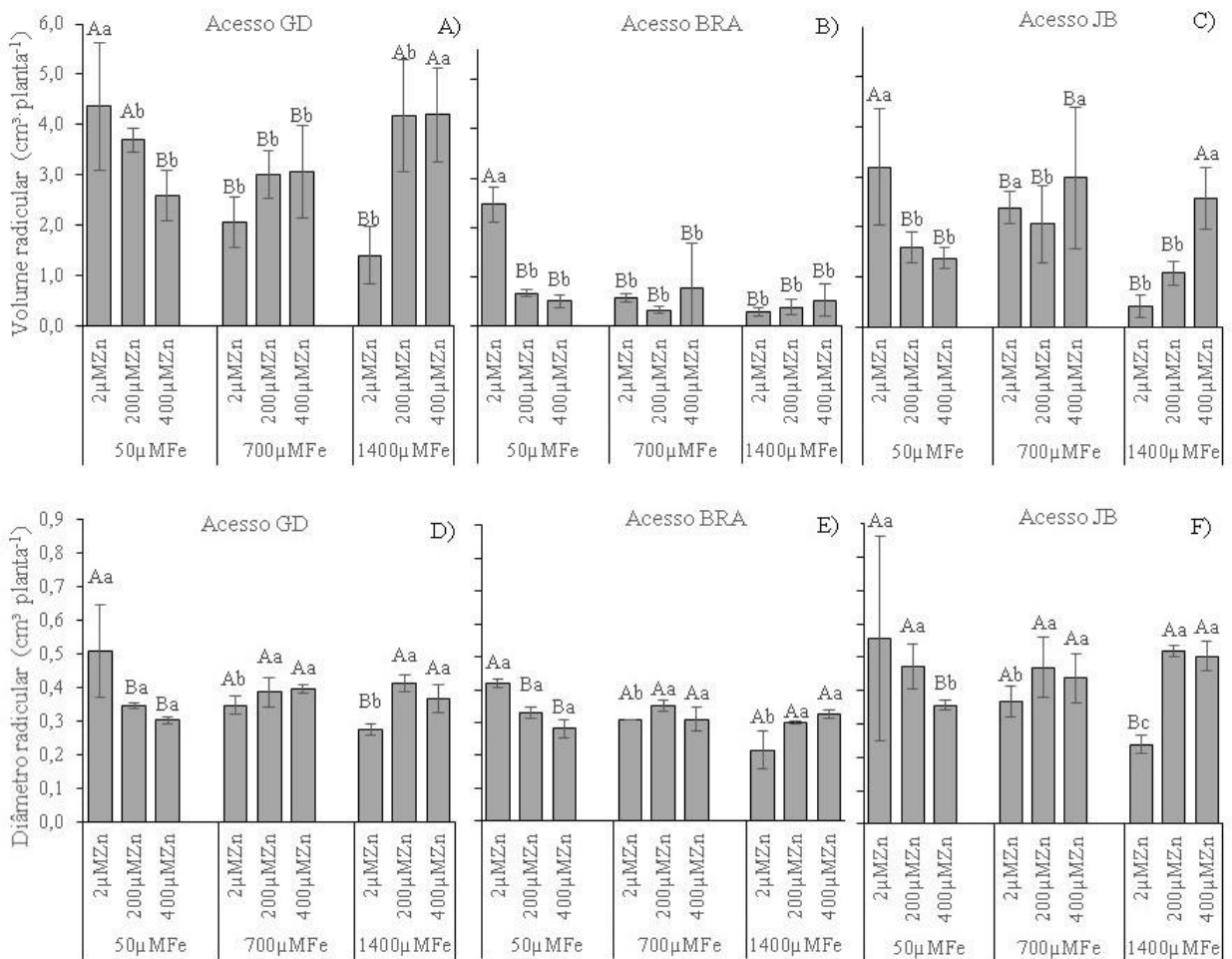


Tabela 8 Comprimento radicular (cm planta⁻¹) e área superficial (cm² planta⁻¹) de três acessos de *P. glomerata* (GD, BRA e JB) cultivados por 21 dias em solução nutritiva contendo três concentrações de Fe e Zn.

ACESSO	Comprimento radicular (cm planta ⁻¹)									
	50µMFe			700µMFe			1400µMFe			
	2µMZn	200µMZn	400µMZn	2µMZn	200µMZn	400µMZn	2µMZn	200µMZn	400µMZn	
GD	4826,4Aαα	3981,3Abα	3044Acβ	1786,8Abβ	3405,1Aaβ	3453Aαα	815,4Abγ	2560,3Aaγ	2754Aaβ	
BRA	3503,8Baα	656,5Cbα	740,9Bbα	519Caβ	339,2Caα	400,5Caα	304,5Aaβ	280,7Baα	346,5Caα	
JB	1902,5Caα	1320,6Bbα	1138,3Bbα	1193,6Baβ	1482,8Baβ	1421,2Baα	375,7Aaγ	519Baβ	950,02Baα	
ACESSO	Área superficial (cm ² planta ⁻¹)									
	GD	479,5Aαα	430,1Aαα	313,5Abβ	214,1Abβ	357,5Aαα	360,7Aaβ	149,6Abβ	430,3Aαα	419,8Aαα
	BRA	329Baα	67,8Cbα	68,6Cbα	60,8Baβ	37,3Caα	105,5Caα	33Baβ	36,5Baα	29,8Caα
JB	245,4Caα	189,8Baα	161Baα	114,5Bbβ	200,6Baα	226,6Baα	59,2Bbβ	83,8Bbβ	201,8Baα	

Os dados representam a média ± S.D. de quatro diferentes repetições. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os acessos no mesmo nível de Fe e Zn; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de Zn em um mesmo nível de Fe e diferentes letras gregas indicam diferença significativa entre os diferentes níveis de Fe em um mesmo nível de Zn (P <0.05).

5.4 DISCUSSÃO

Em geral, nesse estudo, os três acessos de *P. glomerata* apresentaram reduções significativas na produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST), tanto pelo aumento do nível de Zn quando associado ao nível controle de Fe (50 μM), quanto pelo aumento dos níveis de Fe quando associado ao nível controle de Zn (2 μM) (Figura 6). Os três acessos também tiveram redução da massa seca de raízes (MSR) devido tanto ao excesso de Zn quanto ao excesso de Fe (Tabela 8). Esse efeito típico da inibição do crescimento pelo excesso de Zn também foi reportado para outras espécies vegetais (LI et al., 2009; MARQUES e NASCIMENTO, 2014). Em relação ao excesso de Fe, outras espécies vegetais como *Eucalyptus camaldulensis* (NGUYEN et al., 2005), *Solanum tuberosum* (CHATERJEE et al., 2006) e *Oryza sativa* (FAGERIA et al., 2008) também apresentaram decréscimo na produção de massa seca de folhas e raízes.

Notavelmente, para os três acessos de *P. glomerata*, o excesso de Fe teve um maior impacto na redução da massa seca radicular do que o excesso de Zn. O excesso de Fe é responsável por causar desequilíbrios nutricionais nas plantas, principalmente induzindo a deficiência de outros minerais como fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e também do Zn. Ramirez et al. (2002) reportaram que a aplicação de fertilizantes contendo N, P, K, S e Zn reduziram os efeitos desfavoráveis da toxidez causada pelo Fe em *Oryza sativa*.

A interação entre esses dois metais provocou uma resposta ímpar para o acesso GD, na qual observou-se além de maior produção de biomassa (Figura 6A e 6D), decréscimo na produção de MSR na condição controle de um metal e acréscimo do outro (Tabela 8). No entanto, na presença do nível máximo de Zn (400 μM), o incremento na concentração de Fe resultou em efeito positivo na produção de MSR. O mesmo efeito sobre a MSR foi observado no mais alto nível de Fe (1400 μM) associado ao aumento do nível de Zn (Tabela 8).

A competição entre Fe e Zn desempenha um papel muito importante na tolerância ao excesso de Zn em *Arabidopsis thaliana*, na qual o excesso de Fe aliviou a toxidez por Zn (FUKAO et al., 2011; SHANMUGAM et al., 2011; PINEAU et al., 2012). Esses autores observaram que o excesso de Zn reduziu significativamente a concentração de Fe nos tecidos e induziu a expressão de transportadores ZIP regulados pelo Fe (IRT1 e IRT2), sensíveis a baixa concentração de Fe no meio.

No geral, no presente estudo, os três acessos de *P. glomerata* apresentaram redução em todos os parâmetros biométricos radiculares avaliados devido ao excesso de Fe (Figura 7 e Tabela 9). Em relação ao excesso de Zn, apenas o acesso GD mostrou-se menos sensível ao excesso, apresentando diminuição na área superficial radicular apenas no mais alto nível de Zn (400 μM) (Tabela 9). Parâmetros biométricos como comprimento, área superficial, volume e diâmetro radicular são considerados válidos quando utilizados para comparar as respostas de raízes de diferentes acessos à condição de excesso de metais pesados (LI et al., 2009).

Considerando isoladamente o efeito do excesso de Zn, Bernardy et al. (2016) observaram redução no comprimento, área superficial e volume radicular para os três acessos de *P. glomerata* com o aumento dos níveis de Zn na solução nutritiva. Reduções semelhantes também foram relatadas em *Oryza sativa* (SHARIFIANPOUR et al., 2014). No presente estudo, os parâmetros de biometria radicular diferiram em resposta ao excesso de Fe ou Zn. O excesso de Fe foi o responsável pelas maiores reduções de comprimento radicular e área superficial (Tabela 9) dos três acessos.

Assim como já observado para a produção de biomassa, a interação entre Fe e Zn causou uma resposta positiva para os parâmetros biométricos radiculares do acesso GD. Na condição de alto Zn (400 μM) e aumento dos níveis de Fe houve um aumento do comprimento radicular na presença de 700 μM Fe e uma pequena redução com o aumento para 1400 μM Fe (Tabela 9). Houve, também, um aumento na área superficial desse acesso na condição de alto Zn (400 μM) combinado com alto Fe (1400 μM) (Tabela 9). O volume (Figura 7A) e o diâmetro radicular (Figura 7D) apresentaram acréscimo na condição de 1400 μM Fe e aumento dos níveis de Zn, chegando a valores próximos àqueles observados na condição controle de Fe e Zn para o parâmetro volume radicular. Portanto, para esse acesso especialmente, o aumento conjunto dos níveis de Fe e Zn permitiu que houvesse crescimento da raiz mesmo em altos níveis desses metais. Uma possibilidade para essa diferença do acesso GD é que ele possua um mecanismo mais eficiente de exsudação de ácidos orgânicos em relação aos demais acessos. A alta concentração interna de Zn promove a exsudação e indisponibilização do Fe para a absorção, reduzindo assim, a toxidez por Fe. O processo contínuo de exsudação de um ácido orgânico promove a elevação de sua concentração na camada superficial do ápice radicular a níveis que quelatizam o Fe em contato com o ápice radicular, prevenindo sua entrada na raiz (HARTWIG et al., 2007).

O acesso BRA mostrou-se mais sensível, tanto ao excesso de Fe quanto ao excesso de Zn, com redução de aproximadamente 90% no comprimento radicular na condição de excesso de Fe (1400 μM) (Tabela 9). Esse acesso também apresentou a menor biomassa de radicular

(Tabela 8) em relação aos demais acessos, além de folhas cloróticas em todos os tratamentos, incluindo o tratamento controle, o que sugere que esse acesso não é adaptado à condição de cultivo em solução nutritiva, concordando com o observado anteriormente por Bernardy et al (2016).

Para o acesso JB, a interação entre o alto nível de Zn (400 μ M) e o aumento nos níveis de Fe causou aumento no diâmetro radicular (Figura 7C), no entanto, não houve alteração no comprimento nessa mesma condição (Tabela 9). O aumento no diâmetro é provavelmente uma resposta ao dano celular na porção apical das raízes (JAIN et al., 2010), reduzindo seu crescimento e promovendo indiretamente o aumento das células laterais e, conseqüentemente, o engrossamento das raízes.

O escurecimento das raízes observado no nível de 1400 μ M Fe (Apêndice 7.2) pode ser indicativo da deposição de óxidos e hidróxidos de ferro na superfície radicular, conforme sugere Siqueira-Silva et al. (2012). Essa deposição também é conhecida como placa férrica, a qual impede a absorção de vários nutrientes (CHEN et al., 2006; ST-CYR e CAMPBELL, 1996). Em diversos estudos (KIRK e BAJITA, 1995; OTTE et al., 1989; ZHANG et al., 1998), o total de Zn acumulado na placa férrica foi positivamente correlacionado com a quantidade de ferro depositado na placa. No entanto, esses autores sugerem que a ligação de adsorção do Zn à placa férrica representa um mecanismo de ligação mais fraco que uma ligação química e que a planta consegue, dessa forma, absorver alguma quantidade desse Zn. Embora as placas de ferro possam gerar um desequilíbrio nutricional, em razão da sua capacidade de promover a imobilização de outros metais (FAGERIA et al., 2008), elas também podem ser consideradas como parte de um mecanismo desenvolvido pelas plantas para mitigar o excesso de Fe (BECKER e ASCH, 2005).

Espécies utilizadas com a finalidade de fitorremediação devem mostrar um crescimento rápido relacionado à alta produção de biomassa e ao alongamento da raiz (LAMEGO e VIDAL, 2007). No presente estudo, os acessos diferiram em relação à severidade da sua resposta ao excesso desses metais, o acesso BRA mostrou-se impróprio para tal finalidade, devido às reduções drásticas causadas pelo excesso dos metais e por não apresentar resposta positiva à interação entre esses metais. Já o acesso GD mostrou-se responsivo à interação, que ocasionou respostas positivas tanto para a produção de massa seca quanto para os parâmetros biométricos radiculares, conseguindo manter um sistema radicular robusto mesmo em condição de estresse.

5.5 CONCLUSÃO

Os três acessos apresentaram reduções significativas de massa seca de parte aérea, massa seca total, massa seca de raízes, bem como de todos os parâmetros biométricos radiculares analisados (comprimento, área superficial, volume e diâmetro) tanto devido ao excesso de Fe, quanto ao excesso de Zn.

As reduções devido ao excesso de Fe foram mais severas que aquelas causadas pelo excesso de Zn. Entre os acessos, o GD foi o que apresentou as reduções menos drásticas e BRA apresentou grande sensibilidade tanto ao excesso de Zn quanto de Fe. O acesso JB apresentou uma resposta intermediária.

A interação entre o excesso de Fe e Zn causou respostas positivas para o acesso GD, destacando-se sistema radicular robusto, possibilitando o uso desse acesso na fitorremediação.

5.6 REFERÊNCIAS

- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, p. 643–654, 1981.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice - conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 558-573, 2005.
- BERNARDY, K et al. Changes in root morphology and dry matter production in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions in response to excessive zinc. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 613-620, 2016.
- CALGAROTO, N. S. (2009) **Efeitos fisiológicos do mercúrio em plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. Dissertação Curso de Mestrado em Agronomia. UFSM, 108 p.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1443-1452, 2001.
- CHATTERJEE C.; GOPAL, R.; DUBE, B. K. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 1-6, 2006.
- CHEN, R. F. et al. Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. **Annals of Botany**, v. 98, p. 389-395, 2006.
- CVJETKO, P. et al. Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, p. 287–296, 2010.
- FAGERIA, N. K. et al. Iron toxicity in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, p.

1676-1697, 2008.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do sisvar para Windows versão 4.0. In: **Reunião Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**, v. 45, São Carlos, p. 235, 2000.

FUKAO, Y. et al. iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1893-1907, 2011.

GROTZ, N.; GUERINOT, M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 595-608, 2006.

GUPTA, D. K. et al. Effect of Hg, As and Pb on biomass production, photosynthetic rate, nutrients uptake and phytochelatin induction in *Pfaffia glomerata*. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1403-12, 2013.

HARTWIG, I. et al. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n.2, p. 219-228, 2007.

JAIN, R. et al. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.5, p.979-986, 2010.

KAMADA, T. et al. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p. 403-409, 2009.

KIRK, G. J. D.; BAJITA, J. B. Root induced iron oxidation, pH changes and zinc solubilization in the rizosphere of lowland rice. **New Phytologist**, v. 131, p. 129-137, 1995.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, A. V. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente, v. 17, p. 9-18, 2007.

LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 109-120, 2002.

LI, T.; YANGA, X.; LUA, L.; ISLAMC, E.; HEB, Z. Effects of zinc and cadmium interactions on root morphology and metal translocation in a hyperaccumulating species under hydroponic conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 734-741, 2009.

MARQUES, M.C.; NASCIMENTO, C.W.A. Tolerância de mamona a zinco avaliada por fluorescência de clorofila e nutrição das plantas. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, v. 38, p. 850-857, 2014.

MARSCHNER, P. (2012). Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3 ed. London, Academic Press, 651p.

MARSOLA, T.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p. 92-98, 2005.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 5, p. 473-497, 1962.

NEIS, F.A. (2013) **Interações de cobre e fósforo em acessos de *Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen: efeito no crescimento e rendimento de β -ecdisona**. Dissertação de Mestrado em Agrobiologia. UFSM, 67 p.

NGUYEN, N. T.; HIEP, N. D.; FUJITA, K. Iron enhances aluminum-induced leaf necrosis and plant growth inhibition in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant and Soil**, v. 277, p. 139-152, 2005.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomertata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, p. 11-18, 2001.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L.C. Metais pesados. **Revista Eletrônica da Faculdade de Iporá**, v.1, p. 59-86, 2011.

OTTE, M. L.; ROZEMA, J.; KOSTER, L.; HAARSMA, M. S.; BROEKMAN, R. A. Iron plaque on roots of *Aster tripolium* L.: interaction with zinc uptake. **New Phytologist**, v. 111, p. 309-317, 1989.

PINEAU, C. et al. Natural Variation at the FRD3 MATE Transporter Locus Reveals Cross-Talk between Fe Homeostasis and Zn Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, 2012.

RAMIREZ, L. et al. Effect of phosphorus, potassium and zinc fertilizers on iron toxicity in wetland rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v. 239, n.2, p. 197-206, 2002.

REICHMAN, S. M. The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. **Australian Minerals, Energy and Environment Foundation**, v.14, 59 p., 2002.

SKREBSKY, E. (2007). **Nutrição mineral e toxidez de cádmio em ginseng brasileiro**. Tese de Doutorado em Agronomia. UFSM, 209p.

SHANMUGAM, V. et al. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* – the role in zinc tolerance. **New Phytologist**, v. 190, n.1, p. 125-137, 2011.

SHARIFIANPOUR, G. et al. Effect of different rates of zinc on root morphological traits among different upland rice Landraces in Malaysia. **International Journal of Agriculture and Forestry**, v. 4, p. 255-260, 2014.

SIQUEIRA-SILVA, A. I. et al. Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of resting subjected to excess iron. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 265-275, 2012.

ST-CYR, L.; CAMPBELL, P. G. C. Metals (Fe, Mn, Zn) in the root plaque of submerged aquatic plants collected in situ: Relations with metal concentrations in the adjacent sediments and in the root tissue. **Biogeochemistry**, v. 33, p. 45-76, 1996.

TABALDI, L. A. et al. Physiological and oxidative stress responses of four potato clones to aluminum in nutrient solution. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p. 211-222, 2007.

WILDE, K. L.; STAUBER, J. L.; MARKICH, S. J.; FRANKLIN, N. M.; BROWN, P. L. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). **Arch Environmental Contamination Toxicology**, v. 51, n. 22, p. 174–185, 2006.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **International Scholarly Research Network Ecology**, 2011: 1-20.

ZHANG, X. K.; ZHANG, F. S.; MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Zinc uptake by Fe-deficient rice. **Plant and Soil**, v. 202, p. 33-39, 1998.

6 CONCLUSÃO GERAL

Os três acessos apresentaram sintomas típicos de plantas sob estresse de metais pesados. Houve redução significativa dos parâmetros massa seca, área foliar, taxa de assimilação líquida e transpiração tanto com o aumento dos níveis de Zn, quanto com o aumento dos níveis de Fe para os três acessos de *P. glomerata*.

Os parâmetros biométricos radiculares (comprimento, área superficial, volume e diâmetro radicular) também apresentaram reduções para os três acessos com o excesso de Fe e Zn. Também houve aumento da peroxidação lipídica e da atividade da SOD nas raízes para os três acessos devido ao excesso de Fe.

De modo geral, o efeito negativo causado pelo excesso de Fe foi mais severo que o causado pelo excesso de Zn para esses acessos de *P. glomerata*. Entre os acessos, GD foi o que apresentou as reduções menos drásticas para os parâmetros analisados e o acesso BRA mostrou grande sensibilidade tanto ao excesso de Fe quanto ao excesso de Zn.

A interação entre Fe e Zn resultou em suavização dos efeitos da toxidez para a maioria dos parâmetros do acesso GD. Os acessos BRA e JB apresentaram maior sensibilidade aos altos níveis desses metais e menor recuperação com a interação.

7 APÊNDICES

7.1 Sintomas visuais das folhas de *P. glomerata* cultivadas em hidroponia com diferentes níveis de Fe e Zn. (A) folha do acesso GD no tratamento de 1400 μM de Fe no nível controle de Zn. (B) Folha do acesso JB no tratamento de 200 μM de Zn e nível controle de Fe apresentando um princípio de clorose internerval e (C) folha do acesso JB no tratamento de 400 μM de Zn e nível controle de Fe apresentando clorose internerval em estágio avançado. Registros fotográficos feitos aos 21 dias de tratamento.



7.2 Sintomas visuais de raízes de *P. glomerata* cultivadas em hidroponia com diferentes níveis de Fe. (A) raízes do tratamento controle de Fe (50 μM) e Zn (2 μM). (B) raízes do tratamento 700 μM Fe e controle de Zn. (C) raízes do tratamento 1400 μM Fe e controle de Zn. Registros fotográficos feitos aos 21 dias de tratamento.

