

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANTONIO RODRIGUES DA CUNHA NETO

**EFEITO DO CHUMBO E ALUMÍNIO
SOBRE A MORFOFISIOLOGIA DE *Lactuca sativa* L.**

**Alfenas/MG
2018**

ANTONIO RODRIGUES DA CUNHA NETO

**EFEITO DO CHUMBO E ALUMÍNIO
SOBRE A MORFOFISIOLOGIA DE *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa

Coorientador: Dra. Marília Carvalho

Colaboradores: Prof. Dr. Breno Régis Santos (UNIFAL-MG), Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza (UNIFAL-MG), Profa. Dra. Marina Wolowski Torres (UNIFAL-MG), Alexandra dos Santos Ambrósio (Mestranda PPG Ciências Ambientais-UNIFAL-MG) e Tainara Bettiol Westin (PIBIC-UNIFAL-MG).

**Alfenas/MG
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

C972e Cunha Neto, Antonio Rodrigues da
Efeito do chumbo e alumínio sobre a morfofisiologia de Lactuca sativa
L. / Antonio Rodrigues da Cunha Neto -- Alfenas/MG, 2018.
71 f.: il. --

Orientador: Sandro Barbosa.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal
de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Metais Pesados. 2. Alface. 3. Dermatite Fototóxica. 4. Crescimento.
I. Barbosa, Sandro. II. Título.

CDD-581.7

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3701-9685 (Coordenação) / (35) 3701-9262 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



ANTONIO RODRIGUES DA CUNHA NETO

“Efeito de chumbo e alumínio sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* L.”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 10 de novembro de 2017.

Prof. Dr. Sandro Barbosa
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:  _____

Dedico esta conquista a minha família e amigos que foram tudo pra mim nessa fase.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, especialmente meus pais Marcos e Isis, pelo apoio que sempre tive.

Ao Carlos pelo companheirismo e paciência nesse momento e por ficar ao meu lado sempre.

À Tainara, além de ser minha dupla de laboratório mais linda que existe é uma amiga inestimável. Obrigado à Alexandra que dividiu momentos bons e ruins mostrando o significado de amizade.

Aos amigos que Alfenas me deu desde a graduação que levarei sempre comigo.

Aos colegas do PPGCA que quando fizemos a disciplina de Morfofisiologia se tornaram amigos e família e desde então sempre apoiamos uns aos outros. Agradecimento especial para Denise que foi mãe e amiga em todos os momentos.

Aos amigos do BIOGEN, especialmente a Gabriela Ezequiel, Dona Ciomara, Kamilla, Elba e Priscila que foram meus pilares e exemplos.

Agradeço aos professores Thiago, Breno e Marina pela amizade e construção do meu conhecimento através da colaboração dessa dissertação.

À Dra. Marília Carvalho, minha orientadora, mãe, amiga e companheira de eventos (foram muitos), agradecerei a você sempre pelo que construí na minha vida profissional e pessoal.

Ao meu pai científico prof. Dr. Sandro Barbosa, estendo esse agradecimento também à Lenise, que me viram crescer no BIOGEN e sempre estiveram presentes com conselhos e oportunidades que nos fizeram ser pessoas melhores. Obrigado por esta etapa da minha vida e por mais essa conquista.

Agradeço as agências de fomento FAPEMIG, CAPES (edital 11/2014 – pró – equipamentos) e CNPq pela concessão das bolsas que auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho e pela aquisição de equipamentos

“Aqueles que contemplam a beleza da Terra, encontram reservas de força que irão perdurar enquanto a vida durar. Há algo infinitamente curativo nos refrãos repetidos da natureza: a garantia de que o amanhecer vem depois da noite e a primavera depois do inverno.”

(Rachel Carson, 1962)

RESUMO

O efeito dos metais sobre as plantas gera a inibição rápida dos processos de crescimento tanto da parte aérea quanto da raiz, bem como, atividade fotossintética muitas vezes relacionada com o processo de senescência, alterando diversas funções biológicas como o aumento do número de estômatos, a redução do tamanho dos feixes vasculares e a degradação da síntese de pigmentos cloroplastídicos. Assim, este estudo investigou os efeitos dos metais chumbo e alumínio sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* em hidroponia. Primeiramente, foi realizado uma meta – análise sobre o efeito do chumbo e alumínio sobre a fotossíntese, o fotossistema II e os pigmentos cloroplastídicos. Para as análises dos efeitos dos metais sobre a morfofisiologia, mudas de *Lactuca sativa* cv. Regina foram cultivadas em condições de casa de vegetação no sistema de cultivo hidropônico contendo nitrato de chumbo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e nitrato de alumínio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) nas concentrações de 50, 100, 250, 500 μM e solução de Hoagland como controle negativo pelo período de 40 dias de exposição. Os parâmetros de crescimento inicial como a altura da planta, o número de folhas, as massas fresca e seca das parte aérea e raiz e a área foliar, assim como os pigmentos cloroplastídicos foram avaliados semanalmente. A análise de espectrofotometria de absorção atômica foi realizada no 40º dia após exposição aos metais. O delineamento foi inteiramente casualizado com parcela subdividida no tempo contendo 5 tratamentos (0, 50, 100, 250 e 500 μM) de cada metal [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$] com 3 repetições por tratamento em 5 épocas de coleta. O efeito global mostrou que os dois metais reduzem os teores de pigmentos cloroplastídicos, a fotossíntese e o fotossistema II, concluindo que o chumbo e o alumínio são tóxicos para os parâmetros relacionados ao aparato fotossintético. O chumbo reduziu os parâmetros de crescimento ao longo do cultivo, diferente do alumínio que promoveu o crescimento desses parâmetros. Ambos os metais foram tóxicos, reduzindo os teores de pigmentos cloroplastídicos e fluorescência da clorofila *a*. O chumbo também afetou a anatomia radicular e promoveu o surgimento de áreas de aerênquima devido ao acúmulo deste metal que não foi translocado para a parte aérea. Sendo assim, *Lactuca sativa* mostrou – se ser acumuladora de chumbo e tolerante ao alumínio.

Palavras – chave: Metais Pesados. Alface. Fitotoxicidade. Crescimento.

ABSTRACT

The effect of metals on the plants promote the fast inhibition of both aerial part and root growth processes, as well as photosynthetic activity often related to the senescence process, altering various biological functions like the increase in the number of stomata, reduction of vascular bundle size and the degradation of chloroplastidic pigment synthesis. Therefore, this study has investigated the effects of lead and aluminum metals on the morphology of *Lactuca sativa* in hydroponics. First, has been realized a meta - analysis about the effect of lead and aluminum on photosynthesis, photosystem II and chloroplastidic pigments. For the analysis of the effects of metals on morphophysiology, seedlings of *Lactuca sativa* cv. (Pb (NO₃)₂) and aluminum nitrate (Al (NO₃)₂) in the concentrations of 50, 100, 250, 500 μM and solution of Hoagland as a negative control for the 40-day exposure period. The initial growth parameters like as plant height, number of leaves, fresh and dry masses of shoot and root and leaf area, as well as chloroplastine pigments were evaluated weekly. The atomic absorption spectrophotometry analysis was performed on the 40th day after exposure to the metals. The design was completely randomized with a time subdivided plot containing 5 treatments (0, 50, 100, 250 and 500 μM) of each metal [Pb (NO₃)₂ and Al (NO₃)₂] with 3 replicates per treatment in 5 seasons of collect. The mean effect showed that the two metals reduce the levels of chloroplastidic pigments, photosynthesis and photosystem II, concluding that lead and aluminum are toxic to the parameters related to the photosynthetic apparatus. Lead reduced the growth parameters throughout the crop, different from the aluminum that promoted the growth of these parameters. Both metals were toxic, reducing the levels of chloroplastídicos pigments and fluorescence of chlorophyll a. Lead also affected the root anatomy and promoted the appearance of areas of aerenchyma due to the accumulation of this metal that was not translocated to the aerial part. Thus, *Lactuca sativa* showed to be lead - bearing and aluminum tolerant.

Key - words: Heavy Metals. Lettuce. Phytotoxicity. Growth.

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	- alumínio
Al(NO₃)₂	- nitrato de alumínio
Fv/Fm	- eficiência quântica máxima do PSII no escuro
Fv/Fm_L	- eficiência quântica máxima do PSII na luz
NPQ	- quenching não-fotoquímico
Pb	- chumbo
Pb(NO₃)₂	- nitrato de chumbo
PSII	- fotossistema II
qP	- quenching fotoquímico
Rfd	- índice de vitalidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Chumbo	15
2.2 Alumínio	16
2.3 Plantas hidropônicas tolerantes a metais pesados	17
3 JUSTIFICATIVA.....	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo geral	21
4.2 Objetivos específicos.....	21
REFERÊNCIAS	22
SEGUNDA PARTE	25
ARTIGO I: Efeito do chumbo e alumínio sobre o sistema fotossintético: uma meta – análise.....	25
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	29
Resultados.....	30
Discussão.....	31
Conclusão	32
Referências	33
ARTIGO II: PHYSIOLOGICAL, ANATOMICAL CHARACTERIZATION AND CUMULATIVE POTENTIAL OF <i>Lactuca sativa</i> L. EXPOSED TO LEAD...353	
Abstract	36
Introduction	37
Material and Methods.....	388
Results	Erro! Indicador não definido.0
Discussion.....	48
Conclusions	51
References	52

ARTIGO III: Efeito do alumínio sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* L.

.....	55
Resumo	56
Introdução.....	577
Material e Métodos.....	588
Resultados.....	600
Discussão.....	666
Conclusão	69
Referências	700

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados são elementos químicos que possuem densidade maior que 5 g.cm^{-3} ou qualquer elemento químico não degradável que esteja associado a questões de poluição e contaminação. Tais elementos ocorrem naturalmente na Terra e são liberados durante o processo de erosão, vulcanismo, emissão natural de radônio e catástrofes naturais (OZYIGIT et al., 2016).

No entanto, as atividades humanas como a industrialização, a mineração, o uso intenso e inadequado de fertilizantes e pesticidas, as emissões veiculares, os resíduos de baterias, as tintas, os lodos de esgoto e as madeiras tratadas, são fontes comuns de liberação desses metais através dos seus efluentes depositando – os nos diversos compartimentos da biosfera (SRIVASTAVA et al., 2015).

Essas atividades se tornam um problema para os ecossistemas e a saúde humana, pois a destruição da cobertura vegetal e degradação do solo tem como consequência a lixiviação desses metais, considerando – se a principal via de contaminação de fontes de água, rios e lençóis freáticos (ROMEIRO et al., 2007; SILVA et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2015).

Esses metais são um dos principais agentes abióticos que influenciam no estresse dos organismos devido ao aumento no uso industrial e de agrotécnicas que levam a bioacumulação e a toxicidade em níveis diferentes (PEREIRA et al., 2013; SILVA et al., 2015).

A biodisponibilidade no ambiente depende do tipo de metal e da concentração, como por exemplo o arsênio, o cádmio, o cromo, o mercúrio e o chumbo que nas menores concentrações apresentam o potencial tóxico para os organismos, já os metais como o cobre, o ferro, o manganês, o molibdênio, o níquel e o zinco que são essenciais para diversos processos biológicos, porém, em altas concentrações são nocivos se tornando tóxicos (OZYIGIT et al., 2016).

Através da captação de água, esses metais são solubilizados e podem ser introduzidos nas plantas e acumulados, assim contaminar a cadeia trófica (SRIVASTAVA et al., 2015). Conforme a resolução do CONAMA de nº 20 do ano 1986, o limite máximo permitido para descarte desses metais em corpos de água são $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para alumínio (Al) e $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ para chumbo (Pb).

As plantas de ciclo curto são as ideais para estudos toxicológicos, dentro destas podemos encontrar a *Lactuca sativa*, que é recomendada em testes de toxicidade, principalmente devido à sua sensibilidade e representatividade, bem como pelo fato desta já

se encontrar relativamente bem caracterizada em relação aos seus sistemas hormonais, químicos, respostas ambientais e nutritivas sendo uma hortaliça cultivada de diversas formas, dentre elas destaca-se a hidroponia, método do qual encontra-se com grande escala no Brasil (PEREIRA et al., 2013).

A hidroponia é uma técnica que apresenta importância para área científica, pois permite o desenvolvimento da planta em qualquer época do ano e uma exposição homogênea aos metais, eliminando a heterogeneidade e complexidade do solo, o qual se torna possível evidenciar os efeitos biológicos que possuem ação toxicante mesmo em baixas concentrações. Assim, este trabalho tem como objetivo investigar o efeito dos metais chumbo e alumínio sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* em hidroponia.

2 DESENVOLVIMENTO

A seguir, é apresentada uma revisão da literatura atualizada acerca dos temas abordados neste estudo, com a finalidade de fundamentar o conhecimento teórico para a análise e discussão dos resultados encontrados.

2.1. Chumbo

A contaminação no solo e na água por Pb tem sido um problema crescente em sistemas de produção devido a inúmeros vetores de poluição, estudos relatam diferentes estratégias para diminuir a toxicidade utilizando diferentes substratos e sistemas hidropônicos (LEAL-ALVARADO et al., 2016).

O Pb é um metal branco prateado, possui baixo ponto de fusão, alta densidade e maleabilidade, não corrosivo, com baixo ponto de fusão, baixa solubilidade e mobilidade, potencialmente tóxico, produzido a partir de minérios como a cerrusita (PbCO_3), anglesita (PbSO_4) e galena (PbS), possuindo elevada densidade que, em águas superficiais, a concentração natural do metal é em torno de $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ (SILVA et al., 2015).

Este metal pode existir em alguns compostos como o sulfato de chumbo, tetraetilo de chumbo e cloreto de chumbo, e suas principais fontes de contaminação estão nas atividades humanas que aumentam de forma constante na fabricação de baterias, revestimentos de cabos, soldas, tintas, plásticos, borrachas, cerâmicas, chapas elétricas, materiais fotográficos e explosivos que estão diretamente relacionadas com a industrialização e urbanização (OZYIGIT et al., 2016).

O Pb possui um manuseio simples, onde residentes próximos as fontes de água tendem a ter níveis mais elevados de contaminação, fazendo com que o Pb seja reconhecido como causador potencial de efeitos graves à saúde humana e às funções do ecossistema (DAO; BEARDALL, 2016; OZYIGIT et al., 2016; SILVA et al., 2015).

Não há estudos que mostrem os benefícios do Pb no metabolismo das plantas ou animais, contudo, é evidenciado que ele causa efeitos negativos como o envenenamento, que é um sério problema de saúde pública, considerando que o valor limite de tolerância biológica para a prevenção de intoxicação pelo Pb no Brasil é a quantia de $50 \mu\text{g.m}^{-3}$ (BAI et al., 2015; OZYIGIT et al., 2016; SILVA et al., 2015).

O Pb acumula-se primeiramente na camada superficial do solo, diminuindo sua concentração com a profundidade, no entanto, possui fortes ligações com materiais orgânicos

e/ou coloidais, disponibilizando para absorção das plantas uma pequena quantidade solúvel do metal; já seu comportamento no solo, em relação a sua biodisponibilidade, é controlado através de interações complexas orientadas por muitos fatores sendo transportado através da membrana plasmática das células da raiz (OZYIGIT et al., 2016; SILVA et al., 2015).

A absorção e acumulação de Pb é citotóxica em algumas espécies de plantas, razão da qual causa mudanças estruturais que afetam o crescimento e o desenvolvimento fisiológico das plantas (KUMAR; KUMARI, 2015).

O Pb reduz o potencial de absorção sobre os teores de nutrientes essenciais como Zn, Cu e K. Foi observado em plantas de *Cucumis sativus* e *Zea mays* expostas ao Pb, um possível bloqueio das proteínas transportadoras pelo poluente, destruição dos tilacóides induzindo clorose e a redução da fotossíntese e da biomassa (KUMAR; KUMARI, 2015).

De acordo Kadukova et al. (2007), as raízes são os principais locais de acumulação de Pb, independentemente da concentração, sendo sua toxicidade também relatada como inibidor do crescimento de várias espécies de plantas.

As plantas diminuem ou neutralizam os efeitos dos metais pesados através de mecanismos específicos. Estes mecanismos de exclusão podem ser através de síntese de peptídeos, inativação de metais via quelação e sequestro em organelas específicas, tais como vacúolos, ou em certas estruturas, como tricomas (KUMAR; KUMARI, 2015).

Os metais pesados são incorporados no citoplasma por transportadores catiônicos e micronutrientes, como por exemplo o Ca, Fe, Mn e Zn; sendo que estudos recentes mostram que esse é o principal local de toxicidade nas plantas causado pelo acúmulo de Pb (KUMAR; KUMARI, 2015).

Está bem estabelecido que a toxicidade do Pb para as plantas varia com a forma química presente no modo de cultivo. No entanto, é pouco conhecido sobre os mecanismos de desintoxicação das plantas em relação a contaminação por este metal (KUMAR; KUMARI, 2015).

2.2. Alumínio

O Al é encontrado em resíduos industriais e fontes de mineração, sendo considerado como um dos diversos metais contaminadores de solos e águas; ameaçando, portanto, a saúde humana e ambiental (ACHARY; PANDA, 2010). É o terceiro elemento em maior quantidade na camada externa da Terra que se constitui nas partículas de argila no solo, ocorrendo sua migração para a fração trocável ou para a solução em solos com pH abaixo de 5,0, e, em

muitos casos, devido à ausência de chuvas (LIU et al., 1993). A presença do alumínio no subsolo além de causar um dano direto ao ambiente, aumenta os efeitos da seca, em razão de sua toxidez, onde reduz significativamente o rendimento de diversas culturas e afeta sensivelmente sua produção (KOCHIAN et al., 2015; Xu et al., 2016)

Em todo o planeta, a toxicidade do Al é uma limitação para a produção, pois se estima que mais de 50% das terras aráveis do mundo são ácidas, sendo o cerrado o bioma que mais sofre com a toxicidade do Al. Uma das consequências da toxicidade do Al é a redução no crescimento da raiz das plantas, especialmente as pontas, afetando a absorção de nutrientes de forma direta ou indiretamente (HARIDASAN, 2008).

O mecanismo de tolerância melhor caracterizado é o de exclusão do Al. Aminoácidos ativados por este metal causam a liberação de ácidos orgânicos a partir das raízes. Os ácidos orgânicos típicos liberados pelas plantas são citrato, malato e oxalato (BRUNNER; SPERISEN, 2013).

Esses ácidos orgânicos são ânions encontrados no citossol, que uma vez transportados para fora da raiz quelam o Al tóxico na rizosfera, formando complexos estáveis e não tóxicos (BRUNNER; SPERISEN, 2013).

Além da produção de ácidos orgânicos, também existe a formação de estruturas capazes de acumular Al na parede celular, sendo esta estratégia de exclusão que reduz o grau de contato do Al com as células da raiz, entretanto, os mecanismos bioquímicos e moleculares subjacentes a essa estratégia permanecem em grande parte à serem determinados (BRUNNER; SPERISEN, 2013).

2.3 Plantas hidropônicas tolerantes a metais pesados

A alternativa para remediar águas e solos contaminados com metais é a utilização de plantas tolerantes. As espécies com potencial de fitometria são conhecidas como hiperacumuladoras metálicas, onde acumulam metais em seus tecidos em concentrações extremamente altas, quantidade da qual seria gravemente tóxicas para outras espécies. Quando comparados aos não-acumuladores, as plantas hiperacumuladoras apresentam altas taxas de captação e tolerância aos metais, transportando-os das raízes para parte aérea (LEAL-ALVARADO et al., 2016).

Cada espécie de planta apresenta alteração no grau de tolerância ou sensibilidade aos metais pesados, absorvendo quantidade suficiente para promover danos aos tecidos (SILVA et al., 2015).

As plantas nativas de zona húmida são eficientes na remoção ou estabilização de poluentes de águas residuais e solos de regiões húmidas naturais ou artificiais (WEIS; WEIS, 2004). Espécies da família Asteraceae, como *Mikania micranta*, *Cyanthillium cinereum*, *Sonchus arvensis*, *Parthenium hysterophorus*, *Eclipta prostrata*, podem ser facilmente estabelecidas no ambiente, que interagirá com os metais pesados, variando seu grau de absorção a depender do tipo de metal, espécie da planta e dos parâmetros físico-químicos utilizados no sistema hidropônico (WEIS; WEIS, 2004).

Dentre as espécies da família Asteraceae, destaca-se *Lactuca sativa* que apresenta o aumento no seu consumo não só devido ao crescimento populacional, mas também pela tendência de mudança no hábito alimentar do consumidor, tornando inevitável a necessidade de aumentar a produção (MONTEIRO FILHO et al., 2017).

O cultivo de *Lactuca sativa* em sistemas hidropônicos já está amplamente difundido no Brasil, especialmente por sua fácil gestão, combinada com seu ciclo curto, entretanto, o uso intenso e inadequado de pesticidas e fertilizantes têm sido apontados como os principais responsáveis pela contaminação desse sistema de produção (MONTEIRO FILHO et al., 2017; ROMEIRO et al., 2007).

Quando os mecanismos de defesa não são suficientes para evitar a toxicidade, poderá ocorrer alterações no metabolismo da planta, tais como declínio na taxa fotossintética que pode ser resultante de distorções na estrutura dos cloroplastos, ocasionada pela ação de radicais livres, inibição ou degradação na síntese dos pigmentos cloroplastídicos e redução da taxa de transporte de elétrons, considerando-se que o Al pode interferir na absorção de ferro e manganês e, assim, inibir a síntese dessas moléculas, que podem ser consequência de quebras da molécula de DNA e inibição de sua síntese pela alteração estrutural no cromossomo (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SHARMA; DUBEY, 2005; SOUZA et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2015).

Entretanto, as plantas que possuem mecanismos de tolerância a metais pesados são capazes de complexar os mesmos a várias substâncias, ligando-os fortemente a grupos carboxil da parede celular, criando um aspecto de mucilagem ou ligando-os diretamente aos polissacarídeos da superfície das células da rizoderme, sendo este um dos principais mecanismos de detoxificação, além de poder excretar o Pb através dos espaços extracelulares (SHARMA; DUBEY, 2005; SRIVASTAVA et al., 2015).

Dao e Beardall (2016) estudaram *Chlorella sp.* submetida ao chumbo e verificaram a capacidade de absorção do metal tanto ativa quanto passiva, em vez de apenas sorção passiva.

Espécies acumuladoras de Al quando crescem em solos ácidos desenvolvem tolerância

as altas concentrações de Al^{3+} , complexando-os nos tecidos ou isolando-os em locais insensíveis ao Al. Além disso, os efeitos benéficos de Al^{3+} são relatados em várias espécies de plantas, espécies das quais são estimuladas a captar nitrogênio, fósforo e potássio e também desenvolvem um maior crescimento da raiz devido a ativação da redutase do nitrato e estimulação do NO_3^- (Xu et al., 2016).

Rampim e Lana (2013) descrevem dois tipos de mecanismos de tolerância das plantas quando estressadas com Al, sendo o primeiro externo, o qual o Al é impedido de atravessar a membrana plasmática e entrar no simplasto através de imobilizações na parede celular, alterando a permeabilidade seletiva da membrana plasmática, a indução de barreira de pH na rizosfera, a exsudação de quelatos ligantes, a exsudação de fosfatos e o fluxo de Al; e o segundo mecanismo está presente em uma grande variedade de plantas que acumulam Al nas partes internas sem mostrar sintomas de toxidez devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos para a formação de quelatos no citossol, impedindo a fitotoxicidade quando o Al está presente no simplasto.

Segundo Mariano et al. (2005), espécies como *Fagopyrum esculentum* e *Camellia sinensis* apresentam mecanismos de tolerância ao Al, inativando e armazenando o metal em formas não tóxicas nas folhas, contudo, não se conhece os distúrbios causados nas rotas metabólicas e a relação nas mudanças de concentração de ácidos orgânicos.

Plantas que possuem mecanismo de exclusão do Al são capazes de quelar este elemento com ácidos orgânicos (KOCHIAN et al., 2015) ou com polissacarídeos existentes na parede celular, podendo contribuir para a exclusão do Al em ápices radiculares (YANG et al., 2008).

Portaluppi et al. (2010), avaliaram concentrações de Al nas espécies de *Hordeum vulgare*, *Triticosecale Wittmack*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum* e *Aegilops tauschii* e chegaram à conclusão de que existe relação direta entre a tolerância, sensibilidade, resistência e suscetibilidade ao Al para seus genótipos, tendo o mesmo efeito no cultivo hidropônico ou de campo, sendo estas formas de cultivo, sobretudo o hidropônico, uma ferramenta eficiente nos estudos de tolerância aos metais.

3 JUSTIFICATIVA

As ações antrópicas são responsáveis por grande parte do acúmulo de metais pesados no solo e na água. Dentre os diversos metais pesados encontrados na natureza, merecem destaque o Pb e o Al por apresentarem alta toxicidade nas plantas, razão da qual acarreta a redução no comprimento de raízes, diminuição de biomassa radicular, inibição de síntese de DNA e alterações na absorção de nutrientes.

O chumbo é o metal reconhecido pela organização Mundial de saúde (OMS) como um dos elementos químicos mais danosos a saúde humana, e está presente em baterias de automóveis, projeteis de armas de fogo, fertilizantes e pesticidas, produtos dos quais provoca acúmulo do metal no meio ambiente, mantendo-se persistente a longos períodos de tempo (cerca de 300 a 500 anos).

Já o alumínio presente nas mineradoras e no lixo doméstico é considerado um dos maiores poluentes ambientais, e em razão de tais práticas humanas, o metal é descartado no meio ambiente mantendo-se persistente durante largos períodos de tempo (entre 200 a 500 anos).

Dessa forma, técnicas como a hidroponia tornam-se facilmente expostas a contaminação de metais pesado por não necessitarem de grandes áreas de cultivo, podendo ser facilmente montadas em áreas de alta exposição desses metais, onde, a água utilizada nessa técnica agrícola pode sofrer com a larga contaminação desses elementos.

Logo, considerando que a *Lactuca sativa* é a principal hortaliça cultivada pela técnica de hidroponia e consumida pela população brasileira, onde apresenta rápido crescimento e alta sensibilidade e representatividade, torna-se uma das melhores plantas para análise dos efeitos contaminadores dos metais pesados no meio ambiente, além de se encontrarem bem caracterizada em relação aos seus sistemas hormonais e químicos, respostas ambientais e nutritivas, o que nos permite analisar e compreender os efeitos tóxicos do Pb e do Al sobre a sua morfofisiologia.

4 OBJETIVOS

A sessão a seguir trata dos objetivos gerais e específicos pretendidos neste trabalho.

4.1 Objetivo geral

Investigar o efeito dos metais chumbo e alumínio sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* L.

4.2 Objetivos específicos

- a) Analisar as alterações do crescimento inicial de *Lactuca sativa*, como altura da planta, número de folhas, massas fresca e seca e área foliar específica frente à toxicidade dos metais;
- b) Quantificar o efeito dos metais nos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides;
- c) Quantificar o efeito dos metais através da fluorescência da clorofila *a*
- d) Analisar possíveis alterações anatômicas;
- e) Determinar o teor dos metais absorvidos pela planta através da espectrofotometria de absorção atômica.
- f) Analisar o efeito global do chumbo e alumínio sobre a fotossíntese, a eficiência quântica máxima do fotossistema II e os pigmentos cloroplastídicos através da meta – análise.

REFERÊNCIAS

ACHARY, V.; PANDA, B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. **Mutagenesis**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 201-209, 2010.

BAI, X. Y.; DONG, Y. J.; WANG, Q. H.; XU, L. L.; KONG, J.; LIU, S. Effects of lead and nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element content of perennial ryegrass. **Biologia Plantarum**, Amsterdã, v. 59, n. 1, p. 163-170, 2015.

BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 1 – 12, 2013.

DAO, L. H. T.; BEARDALL, J. Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. **Chemosphere**, Amsterdã, v. 147, n. 1, p. 420-429, 2016.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado?. **Manole**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2008.

KADUKOVA, J.; KALOGERAKIS, N. Lead accumulation from non-saline and saline environment by *Tamarix smyrnensis* Bunge. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdã, v. 43, n. 1, p. 216 –223, 2007.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Oakland, v. 66, n. 1, p. 571-598, 2015.

KUMAR, G. H.; KUMARI, J. P. Heavy metal lead influative toxicity and its assessment in phytoremediating plants – a review. **Water, Air & Soil Pollution**, Amsterdã, v. 1, n. 1, p. 1 – 11, 2015.

LEAL – ALVARDO, D. A.; ESPADAS – GIL, F.; SÁENZ – CARBONELL, L.; TALAVERA – MAY, C.; SANTAMARÍA, J. M. Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. **Aquatic Toxicology**, Amsterdã, v. 171, n. 1, p. 37-47, 2016.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdã, v. 682, n. 1, p.71-81, 2009.

LIU, D.; JIANG, W.; LI, D. Effects of aluminium ion on root growth, cell division, and nucleoli of garlic (*Allium sativum* L.). **Environmental Pollution**, Amsterdã, v. 82, n. 1, p. 295-299, 1993.

MARIANO, E. D.; JORGE, R. A.; KELTJENS, W. G.; MENOSSI, M. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, n. 1, p. 157-172, 2005.

MONTEIRO FILHO, A. F.; AZEVEDO, M. R. Q. A.; AZEVEDO, C. A. V.; FERNADES J. D.; SILVA, C. R.; SILVA, Y. S. Growth of hydroponic lettuce with optimized mineral and organomineral nutrient solutions. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 21, n. 3, p. 191 – 196, 2017.

OZYIGIT, I. I.; DOGAN, I.; IGDELIOGLU, S.; FILIZ, E.; UZUNOVA, Z. Screening of damage induced by lead (Pb) in rye (*Secale cereale* L.) – a genetic and physiological approach. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 2-8, 2016.

PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; CORRÊA, F. F.; OLIVEIRA, C.; CASTRO, E. M.; BARBOSA, S. Lead tolerance during germination and early growth of the Brazilian peppertree and the morpho-physiological modifications. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, [S.l.], v. 56, n. 1, p. 72-79, 2013.

PORTALUPPI, R.; BRAMMER, S. P.; MAGALHÃES, J. V.; COSTA, C. T.; CAIERÃO, E.; NASCIMENTO JUNIOR, A.; SILVA JUNIOR, J. P. Tolerância de genótipos de cereais de inverno ao alumínio em cultivo hidropônico e em campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 178-185, 2010.

RAMPIM, L.; LANA, M. C. Mecanismo de tolerância interna das plantas ao alumínio. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 9, n. 2, p. 72-89, 2013.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R.; ABREU, C. A.; PEREIRA, B. F. F. Lead uptake and potential for fitoremediation of *Canavalia ensiformes* L.. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 2, p. 327-334, 2007.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SILVA, E.; SANTOS, P. S.; GUILHERME, M. F. S. chumbo nas plantas: uma breve revisão sobre seus efeitos, mecanismos toxicológicos e remediação. **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 2, n. 3, p. 1-21, 2015.

SOUZA, L. A.; ANDRADE, S. A. L.; SOUZA, S. C. R.; SCHIAVINATO, M. A. Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1441-1451, 2011.

SRIVASTAVA, D.; SINGH, A.; BAUNTHIYAL, M. Lead toxicity and tolerance in plants. **Journal of Plant & Research**, Amsterdã, v. 2, n. 2, p. 123-127, 2015.

WEIS, J. S.; WEIS, P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. **Environment International**, Amsterdã, v. 30, n. 5, p. 685-700, 2004.

XU, Q.; WANG, Y.; DING, Z.; SONG, L.; LI, Y.; MA, D.; WANG, Y.; SHEN, J.; JIA, S. Plant Physiology and Biochemistry Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. **Plant Physiology et Biochemistry**, Amsterdã, v. 101, n. 1, p. 162-172, 2016.

YANG, J. L.; LI, Y. Y.; ZHANG, Y. J.; ZHANG, S. S.; WU, Y. R.; WU, P.; ZHENG, S. J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminium from the rice root apex. **Plant Physiology**, Amsterdã, v. 146, n. 2, p. 602-611, 2008.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO I: Efeito do chumbo e alumínio sobre o sistema fotossintético: uma meta – análise

AUTORES: Antonio Rodrigues da Cunha Neto, Alexandra dos Santos Ambrósio, Marina Wolowski Torres, Tainara Bettioli Westin, Marília Carvalho, Sandro Barbosa.

EFEITO DO CHUMBO E ALUMÍNIO SOBRE O SISTEMA FOTOSSINTÉTICO: UMA META – ANÁLISE

ANTONIO RODRIGUES DA CUNHA NETO¹, ALEXANDRA DOS SANTOS
AMBROSIO¹, MARINA WOLOWSKI TORRES¹, TAINARA BETTIOL WESTIN¹,
MARILIA CARVALHO¹, SANDRO BARBOSA¹

¹ *Universidade Federal de Alfenas; Departamento de Ciências da Natureza, Alfenas-MG*
**autor correspondente email: sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br*

Resumo

A meta-análise é um conjunto de procedimentos estatísticos que combina os resultados de diferentes pesquisas que procuram testar uma hipótese. Os metais pesados tornaram-se um dos principais agentes abióticos que influenciam o estresse dos organismos devido ao aumento no uso industrial e de agrotécnicas que levam a bioacumulação e toxicidade em níveis diferentes que dependem do tipo de metal e sua concentração ficando disponível no ambiente. Nesse aspecto, o chumbo e alumínio estão presentes como resultado dessas atividades antrópicas causando a contaminação do solo e por cadeia, os produtores. Assim, este trabalho avaliou a partir da meta-análise o efeito do chumbo e alumínio sobre o sistema fotossintético. Foram calculados o tamanho do efeito global para a fotossíntese, pigmentos cloroplastídicos e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm), assim como o efeito por moderador, entre os metais e entre as famílias. Para todos os parâmetros o intervalo de confiança foi de 95%, e o tamanho do efeito global apresentou valores significantes por meio do limite máximo e mínimo para a fotossíntese (-7,96), Fv/Fm (-1,41), clorofila *a* (-1,30), clorofila *b* (-1,83) e carotenoides (-1,12). Assim, por meio do efeito global, podemos concluir que os metais chumbo e alumínio são tóxicos reduzindo a eficiência do sistema fotossintético.

Palavras – chave: fluorescência; fotossíntese; pigmentos cloroplastídicos.

Introdução

A classificação de metais pesados é quando os elementos químicos possuem densidade maior que 5 g.cm^{-3} , associado a problemas de poluição. Os metais pesados ocorrem naturalmente na Terra e são liberados durante processos de erosão, vulcanismo, e algumas outras catástrofes que ocorrem naturalmente (OZYIGIT et al. 2016).

No entanto, atividades industriais e de mineração são fontes comuns de liberação desses metais através dos seus efluentes sendo depositado nos diversos compartimentos da biosfera. A liberação desses efluentes sem tratamento torna – se um problema para os ecossistemas e saúde humana, levando a destruição da cobertura vegetal e a degradação do solo em consequência da lixiviação desses metais, sendo a principal via de contaminação de fontes de água, rios e lençóis freáticos (SILVA et al. 2015; SRIVASTAVA et al. 2015).

Esses metais tornaram-se um dos principais agentes abióticos que influenciam no estresse dos organismos devido ao aumento industrial e de agrotécnicas que levam a bioacumulação e toxicidade em níveis diferentes ficando disponível no ambiente. Os metais pesados apresentam potencial tóxico para os organismos mesmo em concentrações baixas, por exemplo, arsênio, cádmio, cromo, mercúrio e chumbo, entretanto, existem metais como cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel e zinco que são essenciais para diversos processos biológicos, mas em altas concentrações são nocivos (OZYIGIT et al., 2016).

O Pb é um dos maiores poluentes por ser potencialmente tóxico e se acumular por longos anos no solo causando danos ao desenvolvimento das plantas e afeta negativamente suas estruturas, fisiologia e bioquímica inibindo a fotossíntese, alterando atividades enzimáticas, inibição ou redução da germinação e também causar clorose nas folhas (SOUZA et al. 2011; SILVA et al. 2015). Além disso, o Pb modifica características anatômicas como, por exemplo, alteração no número de estômatos, na condutância estomática, no tamanho dos feixes vasculares e pode causar escurecimento do sistema radicular e alterar o balanço hídrico e hormonal (PEREIRA et al. 2013; SILVA et al. 2015).

Outro parâmetro importante é o de trocas gasosas foliares que determina diferentes níveis de estresse ambiental podendo relacionar – se com a fotossíntese. Segundo Fu e Wang (2015) *Brassica chinensis* quando expostas a pequenas quantidades de Pb (300 mg.kg^{-1}), o metal promoveu o aumento na capacidade fotossintética e assimilação de carbono. Entretanto, a partir da concentração de 900 mg.kg^{-1} de Pb ocorreu o declínio e inibição desses dois parâmetros.

Em menores concentrações o Pb não altera a produção dos pigmentos cloroplastídicos, mantendo a taxa fotossintética, entretanto, em altas concentrações, tende a inibir a produção de clorofila a, b e carotenoides, como foi constatado por Ozyigit et al. (2016) estudando *Secale cereale* nas concentrações de 100 μmol a 400 μmol .

A contaminação por Al torna os solos ácidos e seu acúmulo em diferentes partes da planta afeta células e organelas em nível morfológico, citogenético e fisiológico, prejudicando seu desenvolvimento principalmente na raiz, apresentando o primeiro sinal de toxidez visível (MATSUMOTO; MOTODA 2013; RAMPIM; LANA 2013). Contudo, pode contribuir na fisiologia e crescimento das plantas quando usado em hidroponia (KONISHI et al. 2012) por ser a técnica que associa o alumínio com a composição de nutrientes fornecidos às plantas, tendo melhor controle fitossanitário.

O Al se liga preferencialmente aos componentes da parede celular o qual apresenta alta afinidade por grupos carboxila e fosfato, além da preferência por doadores de oxigênio (YANG et al. 2008).

O Al, juntamente com o pH baixo, afetam o acúmulo de nutrientes, o que pode levar a deficiências nutricionais em muitas espécies sendo possível quantificar o teor de cada macro e micronutriente absorvido pelas plantas (KONISHI et al. 2012).

Outro processo sensível ao estresse ambiental por excesso de Al é a fotossíntese, que leva a diminuição do teor de pigmentos cloroplastídicos, ocorrendo mecanismos de sinalizações que iniciam alterações adequadas ao aparato fotossintético em níveis fisiológicos e bioquímicos em repostas a mudanças ambientais (MATSUMOTO; MOTODA 2013). Nesse contexto, também é reduzido a capacidade de transporte de elétrons e conseqüentemente a assimilação do carbono interno podendo associar com possíveis danos nos tilacóides (KONISHI et al. 2012).

Diante do volume de informação acumulada na literatura e da variação das respostas fisiológicas das plantas em relação às diversas formas de contaminação por metais pesados, o objetivo dessa revisão foi avaliar, a partir da meta-análise, o efeito do chumbo e alumínio sobre o sistema fotossintético das plantas analisando a eficiência máxima do fotossistema II, fotossíntese e pigmentos cloroplastídicos

Essas análises são importantes parâmetros que relacionam o potencial contaminante que estes metais têm sobre o ambiente, os quais podem persistir entre 300 e 500 anos, e a alta toxicidade que acarreta as plantas que podem ser partes de medicamentos, aromatizantes ou alimentação.

Material e Métodos

Os artigos foram revisados por meio da pesquisa da literatura no banco de dados “Web of Science” e “Periódicos Capes” utilizando-se os seguintes tópicos como palavras-chave: “heavy metal” and “lead and photosynthesis”, “aluminium and photosynthesis”, “lead and chloroplast pigments” e “aluminium and chloroplast pigments”, além disso, também foram selecionados dissertações e teses que contemplavam os requisitos.

Os artigos selecionados compreenderam o período de 2005 a 2016 e precisaram informar os valores de média e desvio-padrão de fotossíntese, clorofila *a*, clorofila *b*, carotenóides e eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) em diferentes concentrações experimentais de Pb e Al.

Foram excluídos artigos que não utilizam como estudo os metais Pb e Al e também aqueles que não apresentavam desvio padrão. Os dados de fotossíntese, clorofila *a*, *b* e carotenoides e Fv/Fm foram tabelados e definidos como moderadores os metais e as famílias botânicas das espécies estudadas.

O efeito global e por moderadores foram determinados utilizando o modelo de efeitos aleatórios. Foi utilizado o modelo de efeitos aleatórios porque atribuem a distribuição dos tamanhos de efeito às diferenças reais entre os estudos e não assumem o erro de amostragem como a única fonte de diferenças nos tamanhos de efeito entre os estudos.

Foi avaliado se os tamanhos dos efeitos eram homogêneos ou variados em todos os estudos (ou seja, se houvesse heterogeneidade). Para descrever a heterogeneidade dos efeitos entre os estudos, foram calculadas as medidas completas de heterogeneidade.

As análises foram submetidas ao viés de publicação. Este método produz a estimativa imparcial do tamanho do efeito.

O valor positivo de “d” ou “g” significa que o alumínio ou o chumbo promoveu um aumento na atividade do parâmetro analisado em relação ao controle. Já valores negativos significam que o metal analisado reduziu a atividade em relação ao controle.

Foi realizado o teste Z com intervalo de confiança de 95% e também calculado os valores máximos e mínimos.

Os pressupostos do modelo e o viés de publicação foram analisados por variedade de métodos (gráfico Q-Q normal, gráfico de influência, gráfico de funil, teste de simetria e número de segurança) com o pacote metafor (VIECHTBAUER, 2010) em ambiente R.

Resultados

Foram encontrados 124 artigos através da busca pelas plataformas, os quais, devido aos critérios de exclusão, a revisão permaneceu com 51 artigos que geraram 166 casos.

Ao analisar o efeito global (Tabela 1), os valores foram significativos indicando que os metais agiram de forma negativa sobre a fotossíntese (-7,96), fv/fm (-1,41), clorofila *a* (-1,30), clorofila *b* (-1,83) e carotenoides (-1,12).

Tabela 1. Efeito global dos metais chumbo e alumínio sobre a fotossíntese, fv/fm, clorofila *a*, *b* e carotenoides.

	Número de casos	Tamanho do efeito	Erro padrão	Limite mínimo	Limite máximo
Fotossíntese	15	-7,96	1,72	-11,34	-4,57
Fv/Fm	28	-1,41	0,33	-2,06	-0,76
Clorofila <i>a</i>	41	-1,30	0,41	-2,10	-0,49
Clorofila <i>b</i>	41	-1,83	0,36	-2,54	-1,11
Carotenoides	41	-1,12	0,38	-1,86	-0,37

Quando analisado o efeito por moderador pelo Pb (Tabela 2), os parâmetros afetados negativamente por esse metal foram fotossíntese (-6,72), Fv/Fm (-1,41), clorofila *b* (-0,76). Os valores de clorofila *a* e carotenoides não foram significativos indicando que o chumbo não afeta o teor desses parâmetros.

Tabela 2. Efeito por moderador do metal chumbo sobre a fotossíntese, fv/fm, clorofila *a*, *b* e carotenoides.

	Número de casos	Tamanho do efeito	Erro padrão	Limite mínimo	Limite máximo
Fotossíntese	14	-6,72	1,64	-9,94	-3,49
Fv/Fm	28	-1,41	0,33	-2,06	-0,76
Clorofila <i>a</i>	31	-0,06	0,40	-0,85	0,72
Clorofila <i>b</i>	31	-0,76	0,35	-1,45	-0,07
Carotenoides	31	-0,43	0,40	-1,22	0,36

Já o Al (Tabela 3), apresentou efeito negativo para clorofila *a* (-6,40), *b* (-5,57) e carotenoides (-3,69). Os demais parâmetros apresentaram menos de 10 casos impossibilitando a análise do efeito pelo Al.

Tabela 3. Efeito por moderador do metal alumínio sobre f_v/f_m , clorofila *a*, *b* e carotenoides.

	Número de casos	Tamanho do efeito	Erro padrão	Limite mínimo	Limite máximo
Clorofila <i>a</i>	10	-6,40	1,34	-9,04	-3,77
Clorofila <i>b</i>	10	-5,57	1,12	-7,78	-3,35
Carotenoides	10	-3,69	1,01	-5,67	-1,71

Foi feito a análise do efeito por moderados separando a família das espécies estudadas, entretanto devido à lista diversa, somente a família Fabaceae (Tabela 4.) apresentou números de casos suficientes para ser analisado exceto no parâmetro fotossíntese; apresentou valores significativo negativo somente para F_v/F_m (-0,83), os parâmetros referentes aos pigmentos cloroplastídicos não teve valor significativo indicando que os metais não interferiram na produção desses pigmentos.

Tabela 4. Efeito por moderador da família Fabaceae sobre F_v/F_m , clorofila *a*, *b* e carotenoides.

	Número de casos	Tamanho do efeito	Erro padrão	Limite mínimo	Limite máximo
F_v/F_m	14	-0,83	0,35	-1,53	-0,13
Clorofila <i>a</i>	16	0,05	0,46	-0,85	0,95
Clorofila <i>b</i>	16	-0,77	0,50	-1,75	0,20
Carotenoides	16	-0,39	0,55	-1,47	0,69

Discussão

Ao analisar o tamanho do efeito global verificou-se que os metais, Pb e Al, reduzem a atividade da fotossíntese da planta, devido a sua toxidez que prejudica o aparato fotossintético inibindo a fotossíntese, já que é capaz de alterar a condução estomática, ou seja, a taxa de transpiração e as trocas gasosas associados com o carbono interno (BIBI; HUSSAIN, 2005) e também pode influenciar na quantidade de pigmentos fotossintéticos, comprometendo assim a fotossíntese (FU; WANG, 2015).

Os pigmentos cloroplastídicos sofreram redução quando expostos aos metais pois estes se tornam tóxicos a maior parte dos elementos que participam do processo de fotossíntese substituindo elementos das vias metabólicas pelo próprio metal (FU; WANG, 2015).

O PSII também teve redução da sua eficiência, possivelmente, o transporte de elétrons do aparato fotossintético foi comprometido, afetando a eficácia do PSII (RAMPIM; LANA 2013).

Para o Pb, não houve efeito significativo para a clorofila *a* e carotenoides provavelmente pelo fato do Pb acumular na raiz pela alta afinidade desse elemento pelas cargas negativas, resultando na dissociação dos grupos carboxílicos dos ácidos galacturônico e glucurônico da parede celular das células dos tecidos radiculares, além da função de barreira fisiológica restringindo o acesso do Pb a parte aérea (SOUZA et al. 2011). Também foi verificado o efeito significativo negativo para a fotossíntese e o *f_v/f_m*, conforme discutido acima, embora uma maior proporção de Pb permaneça nas raízes, pode direta ou indiretamente causar danos a parte aérea, sugeriu-se que o desempenho do aparelho fotossintético é o principal processo afetado por este metal (LEAL-ALVARADO et al. 2016).

O Al quando absorvido e acumulado em diferentes partes da planta, afeta células e suas organelas em nível morfológico, citogenético e fisiológico prejudicando o funcionamento do sistema fotossintético, degradando os pigmentos cloroplastídicos (RAMPIM; LANA 2013).

A família Fabaceae não apresentou alteração na produção do teor de pigmentos cloroplastídicos e segundo Pereira et al (2012) estudando o uso desta família no reflorestamento de áreas contaminadas, concluíram que o teor dos metais no solo estavam em concentrações acima do valor estabelecido pela legislação e também que as plantas estabelecidas neste local contaminado foram tolerantes.

Conclusão

Conclui – se por meio da meta-análise que pelo tamanho do efeito global, os metais mostraram-se tóxicos para todos os parâmetros analisados (fotossíntese, pigmentos cloroplastídicos e *F_v/F_m*), entretanto quando mostrado o efeito por moderador, o Pb não afeta a produção de clorofila *a* e carotenoides. Já o Al é tóxico para os pigmentos cloroplastídicos afetando a fisiologia da planta.

Também conclui – se que para a família Fabaceae, o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos não foi alterado pela presença do chumbo e alumínio.

Referencias

- BIBI, M.; HUSSAIN, M. Effect of Copper and Lead on Photosynthesis and Plant Pigments in Black Gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 1, p. 1126-1133, 2005.
- FU, W. G.; WANG, F. K. Effects of high soil lead concentration on photosynthetic gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Brassica chinensis* L. **Plant, Soil and Environment**, v. 61, n. 7, p. 316-321, 2015.
- KONISHI, S.; MIYAMOTO, S.; TAKI, T. Stimulatory effects of aluminum on tea plants grown under low and high phosphorus supply. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 361-368, 2012.
- LEAL – ALVARDO, D. A.; ESPADAS – GIL, F.; SÁENZ – CARBONELL, L.; TALAVERA – MAY, C.; SANTAMARÍA, J. M. Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. **Aquatic Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 37-47, 2016.
- MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Oxidative stress is associated with aluminum toxicity recovery in apex of pea root. **Plant and Soil**, v. 363, n. 1, p. 399 – 410, 2013.
- OZYIGIT, I. I.; DOGAN, I.; IGDELIOGLU, S.; FILIZ, E.; KARADENIZ, S.; UZUNOVA, Z. Screening of damage induced by lead (Pb) in rye (*Secale cereale* L.) – a genetic and physiological approach. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. v. 30, n. 1, p. 1 – 8, 2016.
- PEREIRA, A. C. C.; RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, F. S.; GUEDES, J. N.; SOBRINHO, N. M. B. A. Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 641-647, 2012.
- PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C. A; BARBOSA, S.; CASTRO, E. M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n.1, p. 36-43, 2013.
- RAMPIM, L.; LANA, M. C. Mecanismo de tolerância interna das plantas ao alumínio. **Colloquium Agrariae**, v. 9, n.2, p.72-89, 2013.
- SILVA, E.; SANTOS, P. F.; GUILHERME, M. F. S. Chumbo nas plantas: uma breve revisão sobre seus efeitos, mecanismos toxicológicos e remediação. **Centro Científico Conhecer**, v. 2, n. 3, p. 1-21, 2015.
- SOUZA, L. A.; ANDRADE, S. A. L.; SOUZA, S. C. R.; SCHIAVINATO, M. A. Tolerância e Potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n.1, p. 1441–1451, 2011.
- SRIVASTAVA, D.; SINGH, A.; BAUNTHIYAL M. Lead toxicity and tolerance in plants. **Journal of Plant Science & Research**, v. 2, n. 2, p. 1 – 5, 2015.

VIECHTBAUER, W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. **Journal of Statistical Software**, v. 36, n. 3, p. 1-4, 2010.

YANG, J. L.; LI, Y. Y.; ZHANG, Y. J.; ZHANG, S. S.; WU, Y. R.; WU, P.; ZHENG, S. J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminium from the rice root apex. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 602-611, 2008.

ARTIGO II: PHYSIOLOGICAL, ANATOMICAL CHARACTERIZATION AND CUMULATIVE POTENTIAL OF *Lactuca sativa* L. EXPOSED TO LEAD.

AUTORES: Antonio Rodrigues da Cunha Neto, Tainara Bettiol Westin, Alexandra dos Santos Ambrósio, Breno Régis dos Santos, Thiago Corrêa de Souza, Marília Carvalho, Sandro Barbosa.

Artigo submetido na revista **Water, Air & Soil Pollution**

PHYSIOLOGICAL, ANATOMICAL CHARACTERIZATION AND CUMULATIVE POTENTIAL OF *Lactuca sativa* L. EXPOSED TO LEAD

ANTONIO RODRIGUES DA CUNHA NETO¹, TAINARA BETTIOL WESTIN¹,
ALEXANDRA DOS SANTOS AMBROSIO¹, BRENO RÉGIS DOS SANTOS¹, THIAGO
CORRÊA DE SOUZA¹, MARILIA CARVALHO¹, SANDRO BARBOSA¹

¹ Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Institute of Nature Sciences- ICN,
Alfenas-MG

*Corresponding author email: sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br (35) 3299-1419

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of lead on the morphophysiology of *Lactuca sativa* in a hydroponic system, aiming at the use of this bioassay for lead decontamination in wastewater. *Lactuca sativa* ‘Regina’ was grown in an unheated greenhouse using a hydroponic system containing lead nitrate at concentrations of 50, 100, 250, 500 μM and Hoagland solution as a negative control for a period of 40 days of exposure. Initial growth parameters such as plant height, leaf number, shoot and root fresh and dry matter, leaf area, chloroplastidic pigments, chlorophyll *a* fluorescence, anatomical parameters and lead content, were evaluated. Growth parameters decreased at 50 μM . The content of chloroplastidic pigments reduced, reflecting on the chlorophyll *a* fluorescence, which was also impaired. The area of the vascular bundle and the proportion of vascular bundle area relative to the total root area were more sensitive to the treatment, reducing at a concentration of 50 μM . There was an absorption of 872 mg/kg lead in the root at 500 μM , characterizing the cumulative potential, different from the shoot, to which the metal was not translocated, confirming the rhizofiltration potential, which is a technique in which the absorption of contaminants that are in solution occurs in the root zone. Lead reduced *Lactuca sativa* growth and development; however, cultivar ‘Regina’ was resistant, since it has the ability to survive the contaminated environment, and is ideal for wastewater decontamination due to its rhizofiltration capacity.

Keywords: Lettuce; Asteraceae; Chlorophyll Fluorescence; Quenching; Anatomy; Heavy metals.

Introduction

Hydroponics is a production system under protected environment, where the plant is grown in nutrient solution, essential for its development, in which crops are preserved from adverse environmental factors, allowing significant gains in productivity and quality (Alves et al. 2011).

Besides allowing a better efficiency in water use, due to loss reduction by evaporation, this production system can amplify the advantage of localized irrigation, in the reuse of water and rainfall for this purpose (Alves et al. 2011).

In recent years, advanced decontamination processes have received considerable attention for the degradation of contaminants that may be heavy metals, as well as the disinfection of waters and effluents that can be used in production systems (Teodoro et al. 2017).

In this context, water harvesting and wastewater reuse for less noble purposes are increasingly viable alternatives to be applied (Mendonça et al. 2016).

Therefore, a consistent wastewater treatment is necessary to guarantee the safety of its reuse in applications with potential for human exposure, contamination of the environment and the agriculture that uses this water (Mendonça et al. 2016; Teodoro et al. 2017).

Lead (Pb) may exist naturally and has been one of the major contaminants in soil and water. It can cause damage to plant development, negatively affecting their structures, physiology and biochemistry (Souza et al. 2011; Silva et al. 2015).

In addition, Pb modifies anatomical characteristics and changes photosynthesis and fluorescence emission (Pereira et al. 2013; Silva et al. 2015); these aspects are used to evaluate the tolerance of different plant species (Sharma and Dubey 2005; Bai et al. 2015).

At lower concentrations, Pb may lead to an increase in the production of chloroplastidic pigments, contributing to the photosynthetic rate; however, at high concentrations, it tends to inhibit the production of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids (Ozyigit et al. 2016).

The Pb uptake phenomenon depends on the plant organ and its specific morphology, which tends to decrease in the following order: roots > leaves > stems > flowers > seeds. However, this order can be altered according to the species (Sharma and Dubey 2005).

Pb is a contaminant present in fertilizers and pesticides, considered by the World Health Organization (WHO) the most toxic metal for humans and, since it is a malleable metal, it is easily leached, contaminating water bodies. Therefore, the objective of this study was to

investigate the effect of Pb on the morphophysiology of *Lactuca sativa* in a hydroponic system, aiming at the use of this bioassay for Pb decontamination in wastewater.

Material and Methods

Culture conditions

The experiments were performed under unheated greenhouse conditions, between January and March 2017. In the tests, *Lactuca sativa* 'Regina' submitted to hydroponic cultivation was used as a test organism. Seedlings at 20 days after germination were obtained commercially and placed in Hoagland solution at 100% ionic potential for adequacy.

At the end of the adaptation period, the 30-day old *Lactuca sativa* seedlings were inserted into the hydroponic system containing Hoagland solution, where lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) was added at concentrations 50, 100, 250, 500 μM and only Hoagland solution as a negative control, maintaining the pH in the range of 5.5 to 6.5 and the electrical conductivity between 2.3 and 2.6 dSm^{-1} .

Growth parameters

The following parameters were evaluated every seven days, during the period between 42 and 70 days after germination: plant height (cm), with the aid of a digital caliper (Digimess, LR44); leaf area (cm^2), using the Axio Vision Rel. 4.8 image analysis software; total leaf number and fresh matter (g), using an analytical balance (Marte, AY 220).

In the period from 42 to 63 days, the samples were taken to a forced air oven (Nova Ética 400 ND) at 60°C until reaching a constant mass to determine shoot and root dry matter (g).

It was not possible to evaluate shoot and root dry matter at 70 days, since the samples were used in anatomical and lead content analyses by atomic absorption spectrophotometry.

Chloroplastidic pigments

For the determination of the levels of chloroplastidic pigments, the 5th pair of leaves from the caulinar axis was used for all treatments and collections of plants exposed to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, in the period between 42 and 70 days. The levels of chloroplastidic pigments

(chlorophyll *a*, *b* and carotenoids) were determined from 0.2 g fresh plant material immersed in 10 mL of 80% acetone for 24 hours.

Absorbance was determined using a spectrophotometer (Biochron, Libra S22) and readings were taken at 663.2; 646.2 and 470.1 nm for the levels of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids, respectively, according to the methodology described by Lichtenthaler and Welburn (1983), with modifications.

Root anatomy

The roots of each replication of all treatments were collected at 70 days after germination. The cross sections were stained according to Souza et al. (2009) and were observed and digitized under an Olympus BX-60 optical microscope, coupled to a digital camera. The following parameters were analyzed: total area, cortex area, vascular bundle area, aerenchyma area and the proportion of vascular bundle area (PCV). All these measurements were made by the Axio Vision Rel. 4.8 image analysis software.

Chlorophyll a fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence was obtained using an image fluorometer (Fluor CAM Closed FC 800-C, PhotonSystems Instruments – PSI, Ltd, Drasov, Czech Republic). The analyses were performed using the quenching protocols of the software itself, according to Oxborough (2004) and Souza et al. (2018). In the samples adapted in the dark, the maximum efficiency of the photosystem was estimated by the F_v/F_m ratio.

The leaves were then illuminated with actinic light. The actinic light was removed, the leaves were irradiated with distant red light and the maximum efficiency of photosystem II with the samples in the light was calculated by the ratio $F_v/F_{m_L} = (F_m - F_o')/F_m'$.

Photochemical quenching was calculated as $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$, and the non-photochemical quenching was calculated as $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$. The vitality index Rfd was determined by the expression $(F_m - F_t)/F_t$.

Lead content

For the determination of the accumulated Pb content in the plant roots and shoot, in order to search for possible mechanisms of tolerance for this cultivar, the analysis of atomic

absorption spectrophotometry was performed. Nitric-perchloric digestion was performed at a ratio of 2:1 (v/v) HNO₃ and HClO₄. The Pb content of shoot dry matter and root system was measured using an atomic absorption spectrophotometer (Varian) with acetylene gas flame and cathode lamps (Malavolta et al. 1997).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized, with a factorial scheme containing 4 concentrations (50, 100, 250 and 500 µM) Pb(NO₃)₂ and Hoagland solution as a negative control, 3 replications per concentration and 5 collection periods, referring to the commercial age of *Lactuca sativa*. The results were submitted to analysis of variance - ANOVA ($p < 0.05$) and the means between the different concentrations were compared by the Scott-Knott test, using the SISVAR statistical software (Ferreira 2011).

Results

Lead content

After 40 days of exposure to the treatments, *Lactuca sativa* L. roots showed Pb accumulation from 50 µM, statistically equal to the concentrations of 100 µM and 250 µM. Samples submitted to a concentration of 500 µM accumulated a higher amount of Pb (Fig. 1).

As for the shoot, little was translocated, and there was no significant difference between the treatments and the control (data not shown).

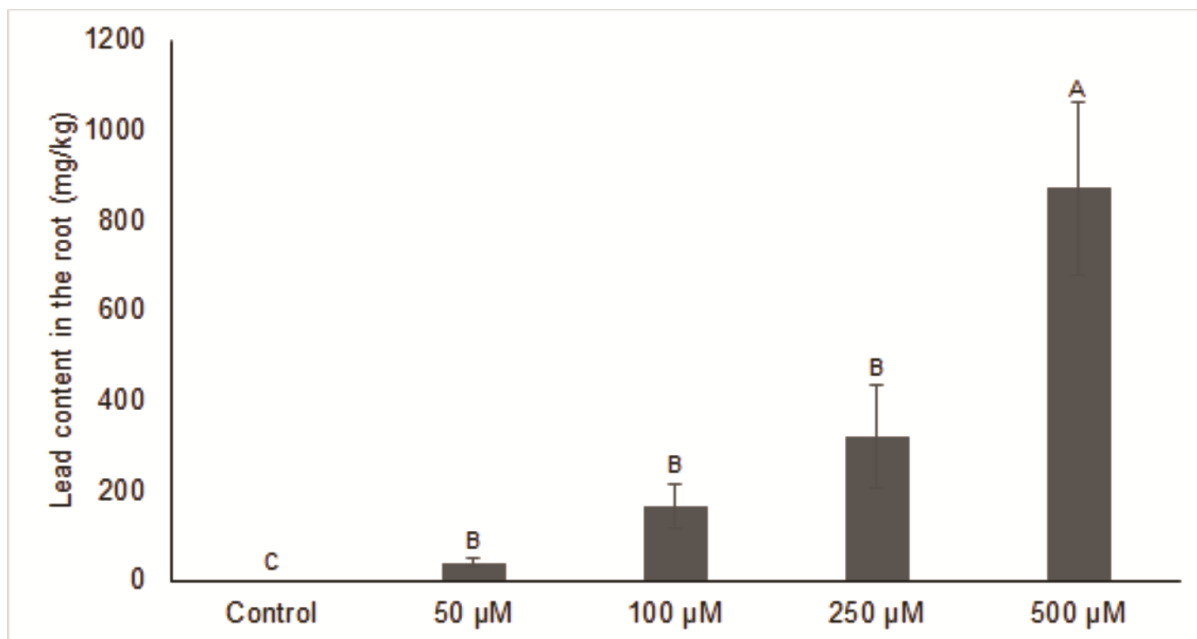


Fig. 1 Pb content in *Lactuca sativa* root after 40 days of exposure. Same letters do not differ within the same collection by the Skott-Knott test at 5% significance. Bars represent the standard error.

Growth parameters

The growth parameters of *Lactuca sativa* exposed to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ suffered a decrease among treatments, within the collections.

At 42 days, stem height (Fig. 2a) showed a decrease in the presence of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ from 100 µM at 70 days, and the toxic effect reduced the size of plants exposed to a concentration of 500 µM.

When stem diameter was evaluated (Fig. 2b), it was observed that $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ reduced this parameter from the 42nd day of exposure at 500 µM, compared to the other treatments.

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ had a toxic effect in the first collections, at 42 and 49 days, decreasing leaf number (Fig. 2c), with: control > 50 µM = 100 µM > 250 µM = 500 µM. The toxic effect was maintained in the other collections, reducing the amount of *Lactuca sativa* leaves.

There was a reduction in leaf area (Fig. 2d) in the first three collections, with the increase in $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentration; when the last collection was observed, as a result, the control becomes statistically equal to the other concentrations, except at 500 µM, which reduced leaf area.

Leaf number (Fig. 2c) showed results consistent with those observed for fresh matter (Fig. 3a) since, from 50 µM, the exposure to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ induced the reduction in these parameters, which is even more evident at 500 µM in all collections.

Regarding leaf dry matter (Fig. 3b), in the first three collections, a mass reduction was observed from 50 µM; it was intensified with increasing concentrations.

For stem fresh (Fig. 3c) and dry (Fig. 3d) matter, a reduction in these parameters that had a similar behavior during collections was also observed.

There was a reduction in root fresh matter (Fig. 3e) in the presence of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. It is possible to observe that the mean of the controls was superior to the others, showing the toxic effect of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

It is observed that, for root dry matter (Fig. 3f), the concentration-dependent pattern also occurred, which shows that the mean of the controls was higher than those of the other concentrations.

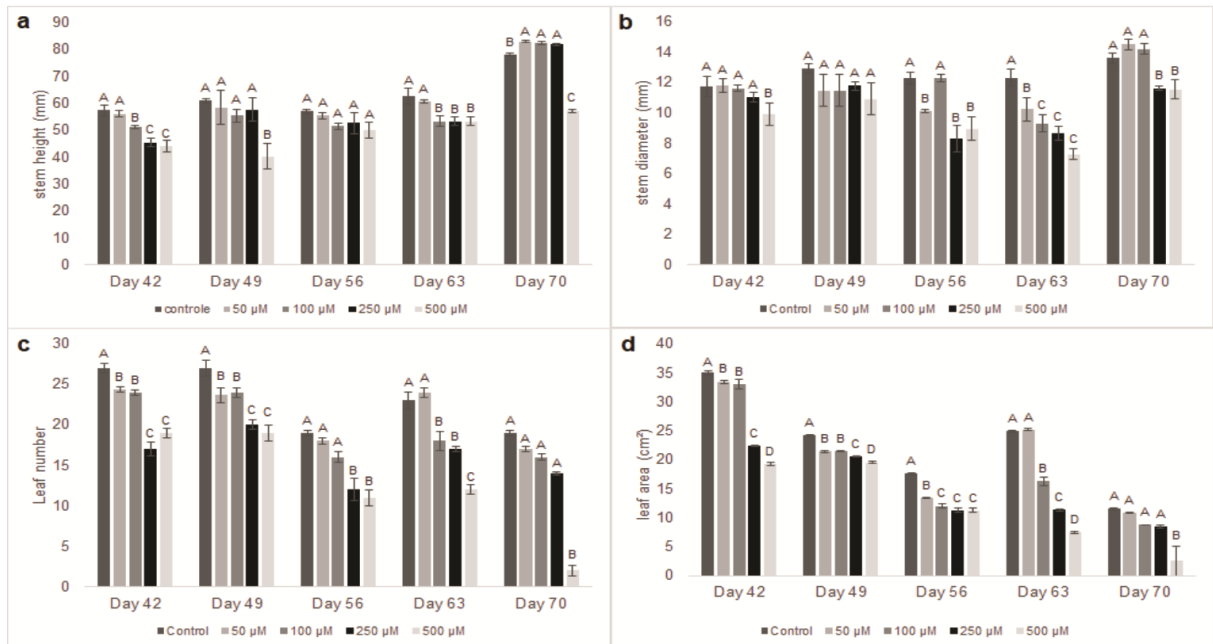


Fig. 2 Growth of *Lactuca sativa* exposed to different lead concentrations. Same letters do not differ within the same collection by the Skott-Knott test at 5% significance. Bars represent the standard error. (a) stem height; (b) stem diameter; (c) leaf number; (d) leaf area.

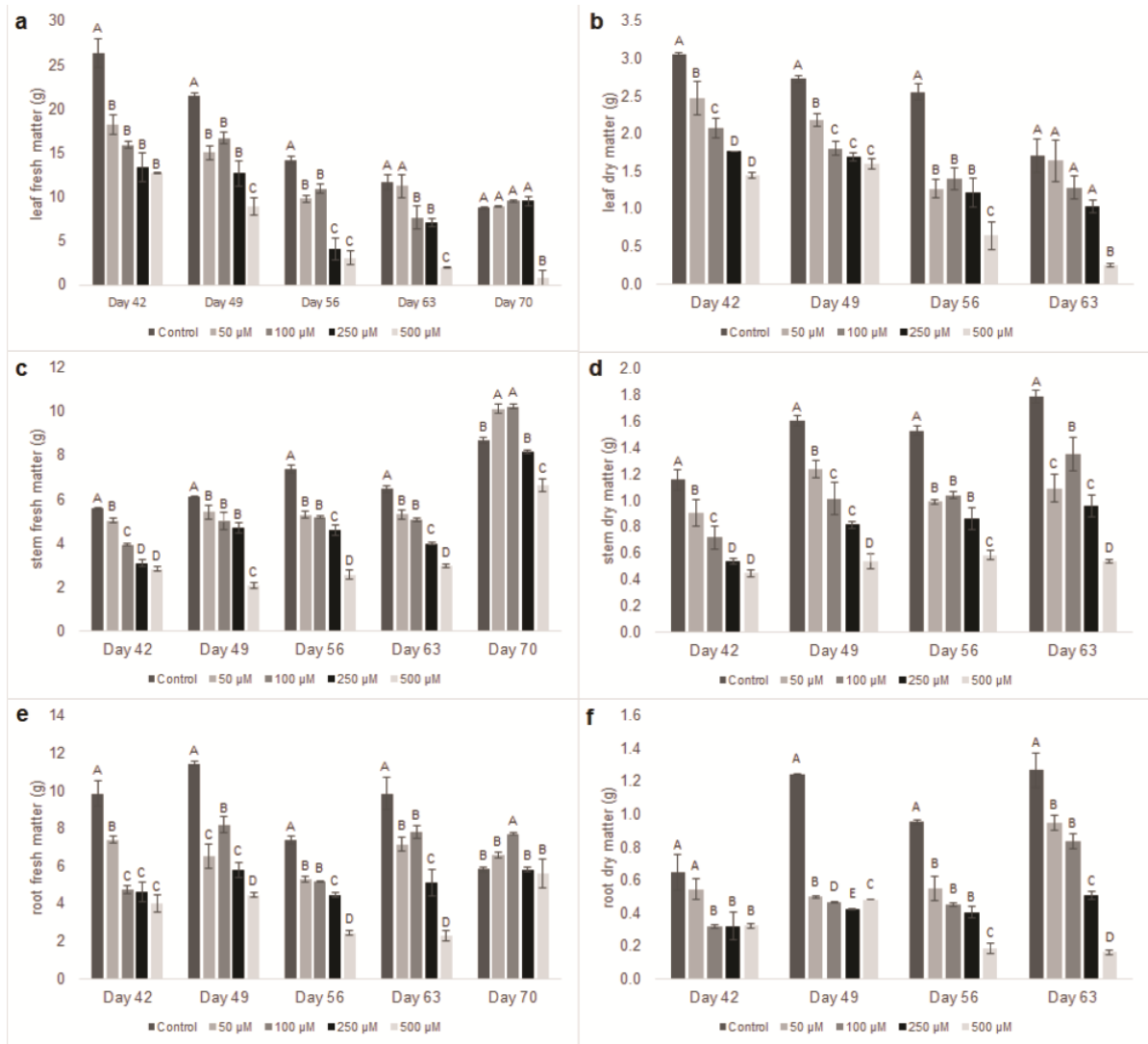


Fig. 3 Biomass of *Lactuca sativa* exposed to different lead concentrations. Same letters do not differ within the same collection by the Skott-Knott test at 5% significance. Bars represent the standard error. (a) leaf fresh matter; (b) leaf dry matter; (c) stem fresh matter; (d) stem dry matter; (e) root fresh matter; (f) root dry matter.

Chloroplastidic pigments

When analyzing chloroplastidic pigments, it was possible to observe that $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ influenced all parameters. Chlorophyll *a* content (Fig. 4a) was reduced at a concentration of 100 µM ($2.44 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) at 42 days of exposure, maintaining a similar behavior until day 63. As for with 70 days of exposure, the accumulated $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ caused a concentration-dependent effect, in which the concentrations differed between each other, reducing the chlorophyll *a* content in the presence of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

In the first collection (42 days of exposure), chlorophyll *b* content (Fig. 4b) showed an increase in the treatments, compared to the control ($0.61 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). However, in the other

collections, it showed a reduction in its content, mainly from 100 μM , which was statistically equal to the concentrations of 250 μM and 500 μM .

Unlike chlorophyll *b*, the carotenoid content (Fig. 4c) was reduced at 42 days in relation to the control ($1.90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) due to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ at concentrations of 100 μM ($1.65 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), 250 μM ($1.68 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and 500 μM ($1.35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), which were statistically similar. Apparently, the presence of nitrate stabilized the carotenoid content at day 56, as there was no statistical difference among treatments. However, at 63 and 70 days of exposure, Pb accumulation reduced the carotenoid content.

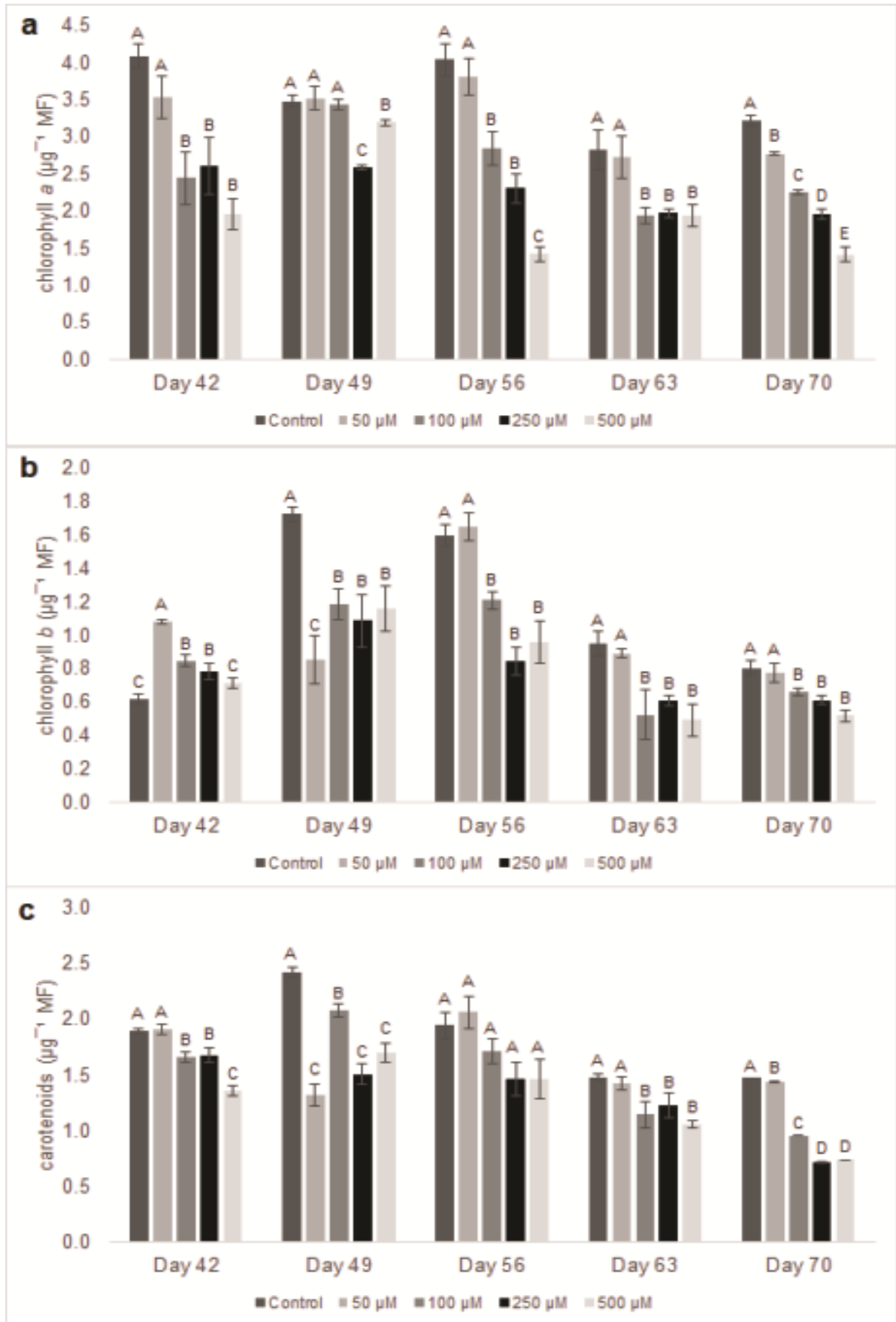


Fig. 4 Content of chloroplastidic pigments in *Lactuca sativa* leaves exposed to different lead concentrations. Same letters do not differ within the same collection by the Skott-Knott test at 5% significance. Bars represent the standard error. (a) chlorophyll *a*; (b) chlorophyll *b*; (c) carotenoids.

Anatomy

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ caused changes in root anatomy (Fig. 5 and 6). When evaluating the total and cortex areas, these parameters were found to be reduced from a concentration of 100 μM . The vascular bundle area and the proportion of the vascular bundle area (PCV) relative to the total root area were more sensitive to the treatment, reducing from 50 μM .

The cortex was modified by $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ absorption by the root, and the passage of this metal by this area caused the development of aerenchyma (Fig. 5 and 6), from a concentration of 50 μM .

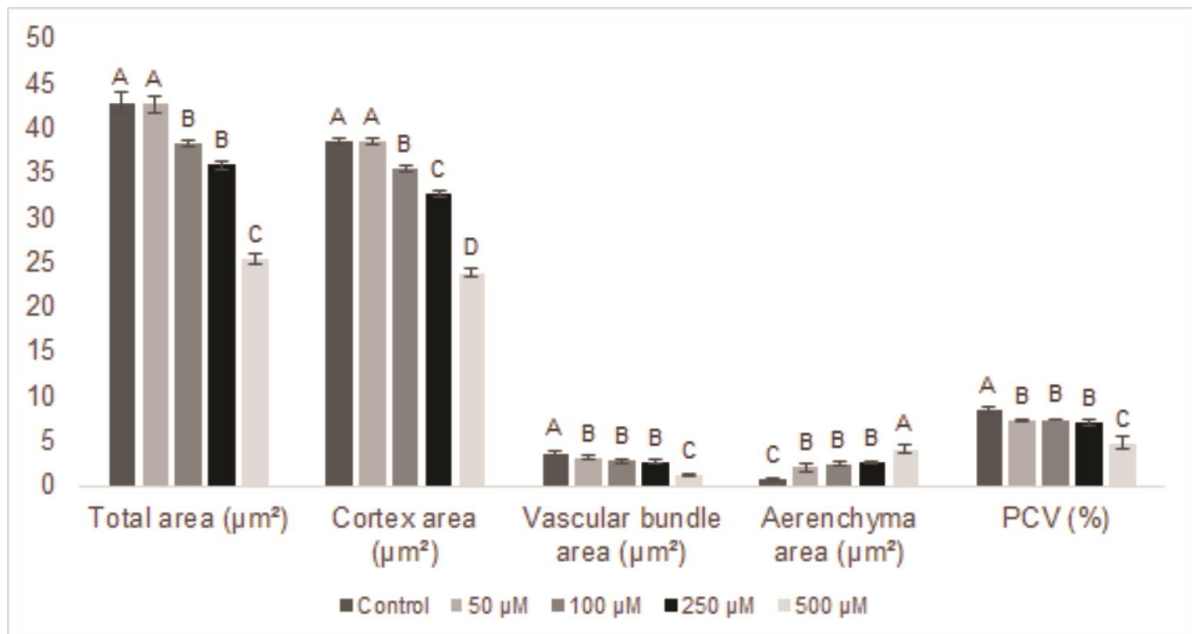


Fig. 5 Anatomical parameters of *Lactuca sativa* roots exposed to different lead concentrations after 40 days of exposure. Same letters do not differ within the same collection by the Skott-Knott test at 5% significance. Bars represent the standard error.

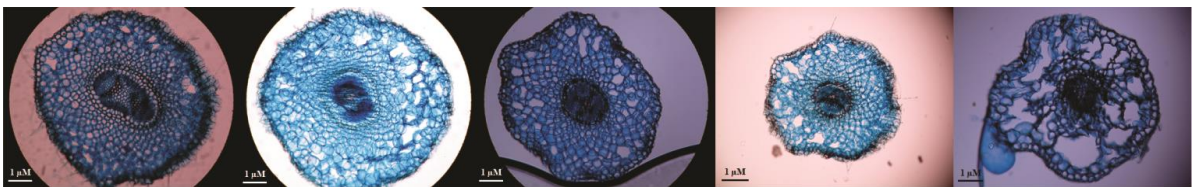


Fig. 6 Cross sections of *Lactuca sativa* roots after 40 days of lead exposure at 10x magnification and scale bar = 1 μm . Control, 50 μM , 100 μM , 250 μM and 500 μM , respectively.

Chlorophyll a fluorescence

The maximum quantum efficiency of photosystem II in the dark (Fv/Fm) and in the presence of light (Fv/Fm_L) (Fig. 7 and 8) was evaluated, and both showed an increase at a concentration of 50 μM (0.63 for both) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. However, with increasing $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentrations, both Fv/Fm and Fv/Fm_L reduced their activities.

Photochemical quenching (qP) was reduced with increasing $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentrations, and the reverse behavior was observed for non-photochemical quenching (NPQ) (Fig. 7 and 8).

Using the vitality index (Rfd) (Fig. 7 and 8), it was possible to evaluate the photosynthetic potential of the plants, which resulted in a decrease from a concentration of 50 μM (0.99), which was reduced with increasing concentrations.

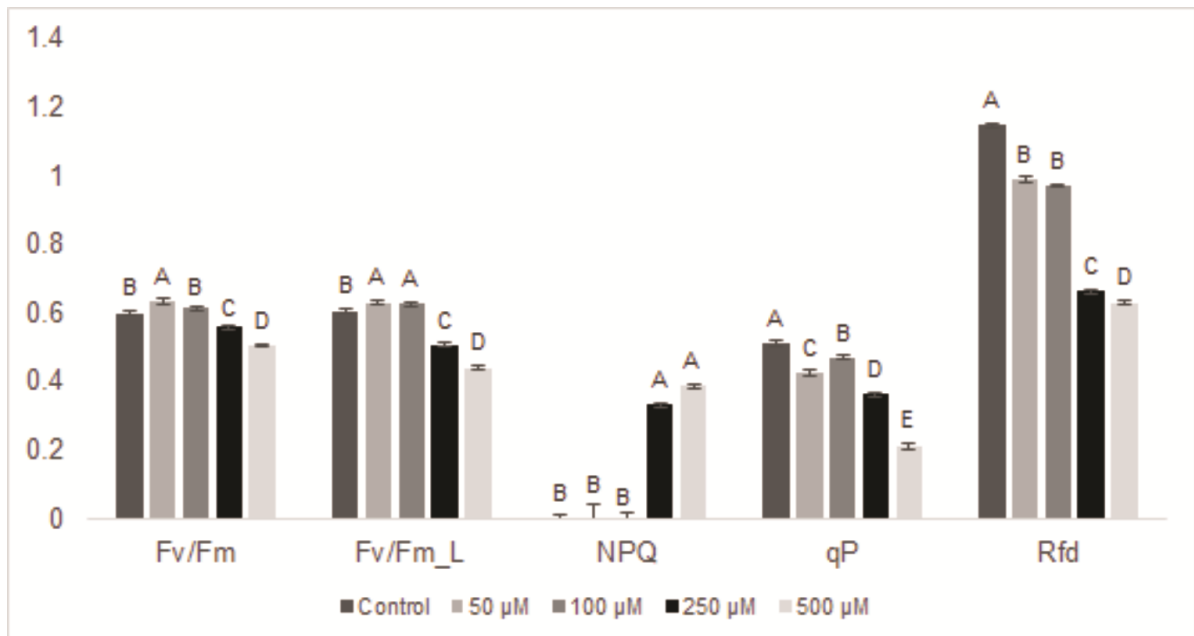


Fig. 7 Parameters analyzed by chlorophyll *a* fluorescence of *Lactuca sativa* exposed to different lead concentrations after 40 days of exposure. Same letters do not differ within the same collection by the Skott-Knott test at 5% significance. Bars represent the standard error.

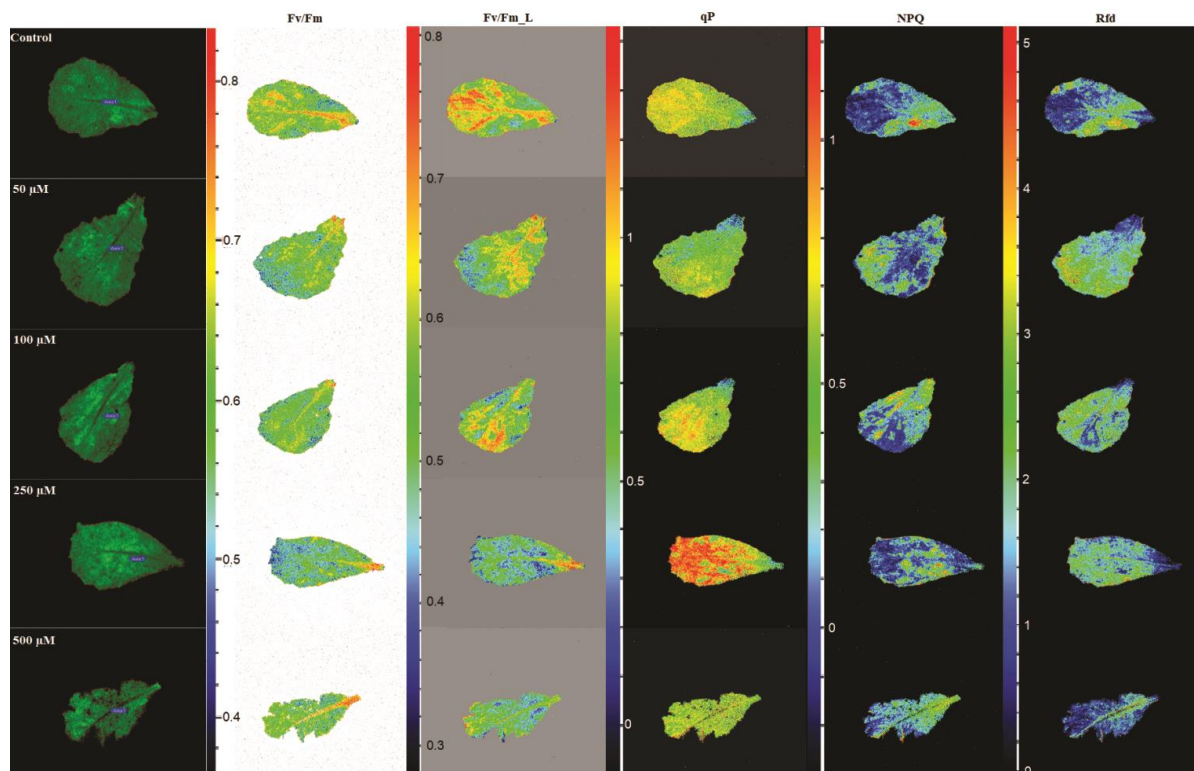


Fig. 8 Qualitative analysis of chlorophyll *a* fluorescence parameters of *Lactuca sativa* leaves after 40 days of exposure to different lead concentrations. Color scale refers to the activities of each parameter.

Discussion

The concentrations of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ solutions, associated with the content found in *Lactuca sativa* roots, demonstrates the high level of absorption and accumulation of this metal in this organ, especially at the highest lead concentration (Fig. 1) (Romeiro et al. 2007).

Little was translocated to the shoot, which may be associated with the concentrations that inhibited plant development. The roots have a strong ability to retain a significant amount of Pb, while restricting translocation to the leaves (Romeiro et al. 2007).

Pb accumulation by the roots (Fig. 1) and the absence of translocation to the shoot characterizes rizofiltration which, according to the Environmental Protection Agency, is a technique in which adsorption or precipitation occurs in the roots, or the absorption of contaminants that are in solution around the root zone. This technique can be applied to heavy metals such as Pb, which was not translocated to *Lactuca sativa* shoots, since it was immobilized in the root and can be removed at harvest (Vasconcellos et al. 2012).

This technique can be applied from the construction of floating platforms as root filter systems, and can be used in wastewater to remove inorganic compounds such as Pb (Vasconcellos et al. 2012).

Mazumdar and Das (2015) evaluated the cumulative potential of 25 species and concluded that Pb uptake in the soil to the root was determinant in the verification of which species are hyperaccumulating.

There are several parameters to evaluate the phytoremediation potential of heavy metals of a species: among them, Raskin et al. (1994) determined that a species has hyperaccumulation potential when it is able to extract and accumulate in its tissues values higher than 1000 mg/kg Pb (dry matter); thus, *Lactuca sativa* 'Regina' is an accumulator of this metal.

Lactuca sativa showed to be resistant to Pb, even reducing growth parameters (Fig. 2) and biomass (Fig. 3) from the beginning of exposure. Such behavior may possibly be associated with the surface area of the cell wall, which provided sites for metal bonding. Mechanisms of metal tolerance include detoxification of metal ions within the cell and metal restriction when crossing the plasma membrane (Dao and Beardall 2016).

Shen et al. (2016) analyzed Pb stress in *Torreya grandis* and also concluded that this metal reduces growth parameters, due to oxidative activity, implying in the degree of plant development and its metabolic state, corroborating the behavior of *Lactuca sativa* (Fig. 2 and 3), which also reduced over the exposure periods.

The inhibition of *Lactuca sativa* growth parameters (Fig. 2 and 3) may be associated with the impairment of the photosynthetic function, as well as the reduction in the maximum quantum efficiency of photosystem II caused by Pb, and also with different metabolic processes (Dao and Beardall 2016).

Visual symptoms, such as root darkening, were observed, indicating electrolyte leakage due to damage to the root tissue cell membrane, and this, in turn, could indirectly affect the efficiency of the photosynthetic system, photochemical and non-photochemical quenching of the corresponding shoots.

It is possible that the functions of roots exposed to Pb have been affected, since the root is the organ with the highest Pb accumulation (Leal-Alvarado et al. 2016), grounding the reduction in fresh and dry matter of *Lactuca sativa* (Fig. 3). Pb-induced root damage may have triggered signals, such as abscisic acid, from roots to leaves, which ceases leaf growth and alters the content of chloroplastidic pigments (Leal-Alvarado et al. 2016), as observed for *Lactuca sativa* (Fig. 4). The influence of the heavy metal on cell organization is important for understanding physiological changes under stress conditions (Shen et al. 2016).

The difference in sensitivity of chlorophyll a and chlorophyll b (Fig. 4) to Pb stress observed in this study may indicate a preferential degradation of chlorophyll a over

chlorophyll b, since intracellular and detoxification mechanisms, including metal binding compounds, may have priority in the degradation of chlorophyll a, which can be converted into reactive oxygen species, while the break of chlorophyll b is synthesized in chlorophyll a or by an increase in the activity of the enzyme chlorophyllase (Hörtensteiner and Kräutler 2011; Dao and Beardall 2016).

The chlorophyll content was reduced in a concentration-dependent manner (Fig. 4); the parameters measured in photosystem II (PSII) (Fig. 7 and 8) also decreased and growth followed this inhibition, probably due to the damage that Pb causes to the function of the PSII reaction center, which reacts by replacing the iron of the bonding sites and thus blocks the electron transport (Dao and Beardall 2016; Shen et al. 2016). A decrease in carbon fixation also decreases electron transport rate through return effects, inhibiting the activity of Rubisco, which is essential for carbon fixation, thus reducing dry matter (Fig. 3) (Dao and Beardall 2016).

Pereira et al. (2013) verified stress by lead nitrate at concentrations between 0.5 and 5.0 mM in *Lactuca sativa* with only 7 days of cultivation and concluded that, since this phase, Pb causes anatomical modifications in the root, corroborating the toxic effect that this metal caused in this study (Fig. 5 and 6).

Pb moves preferentially through the apoplastic pathway, translocating itself through the cortex, damaging the cell wall and, as a consequence, aerenchyma areas arise, as verified for *Lactuca sativa*, which showed aerenchyma areas (Fig. 5 and 6), when submitted to Pb at different concentrations (Sharma and Dubey 2005).

The reduction in the total root area of *Lactuca sativa* (Fig. 5 and 6) was possibly due to the toxic effect of Pb, which also reduced growth parameters such as fresh and dry root matter. However, the reduction in vascular bundle area and PCV can cause changes in water and nutrient transport throughout the plant (Ribeiro et al. 2015).

Consequently, the reduction in water and nutrients may be associated with the growth parameters of *Lactuca sativa* (Fig. 2 and 3) that reduced along Pb stress.

Chlorophyll a fluorescence is the focus of studies on photosynthetic regulation and plant responses to the environment, due to its sensitivity and non-destructive characteristics (Fu and Wang 2015; Dao and Beardall 2016; Shen et al. 2016). *Lactuca sativa* submitted to Pb stress obtained lower quantum efficiency values (Fig. 7 and 8) than non-stressed plants, which is associated with PSII photoinhibition; in addition, photoinhibition and reduction in photosynthetic capacity under conditions of Pb stress were manifested by changes in leaf chlorophyll content. This was explained by its important role in photosynthesis and plant

growth (Shen et al. 2016). The maximum quantum efficiency of PSII is a sensitive stress indicator in photosynthetic organisms (Dao and Beardall 2016). Under stress conditions, the value decreases, as observed for *Lactuca sativa*, and may cause photoinhibition of photosynthetic capacity (Shen et al. 2016), which can be observed through the reduction in vitality index (Rfd).

When analyzed by chlorophyll a fluorescence, *Lactuca sativa* showed an increase in the maximum quantum efficiency of PSII at concentrations of 50 and 100 μM Pb (Fig. 7 and 8). The stimulating effect of low concentrations of heavy metals can be attributed to an increased demand for ATP for metal detoxification and repair processes, including the active transport of ions in the plasma membrane or the production of specific polypeptides for metal binding (Dao and Beardall 2016).

It is possible to associate the reduction in Fv/Fm (Fig. 7 and 8) with the modifications caused in the photochemical activity which, in turn, can result in a lower electron transport between PSII and PSI (Leal-Alvarado et al. 2016).

Lactuca sativa had a significant reduction in qP and an inverse relationship with NPQ. This happens once the light energy absorbed by the leaves is used in photosynthesis, and the excess energy can be dissipated as heat or re-emitted as chlorophyll fluorescence. However, the total amount of chlorophyll fluorescence is very small, and large absorbed light amounts are used to direct qP or are dissipated as heat in fluorescence quenching by NPQ (Fig. 7 and 8) (Fu and Wang 2015).

Fu and Wang (2015) established a proportion of light absorbed by PSII-associated chlorophyll in *Brassica chinensis* submitted to Pb and observed that the leaf qP initially had a slight increase and then decreased, whereas NPQ (Fig. 7 and 8) showed an inverse trend with increasing lead concentrations, corroborating this study.

Conclusions

Lead reduced *Lactuca sativa* growth and the levels of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids during the first 42 days of cultivation. The evaluated root anatomical parameters showed a reduction by exposure to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, also emphasizing the development of aerenchyma in the cortex. Lead stress decreased qP, increasing NPQ, and negatively affected the maximum quantum efficiency of PSII.

Lactuca sativa was found to be resistant to lead, even reducing the morphological and physiological parameters, and also demonstrated to be efficient in the absorption of this metal by the root, classifying it as an accumulator.

In addition, *Lactuca sativa* ‘Regina’ was ideal for rhizofiltration, since it does not translocate lead to the shoot, which is ideal for wastewater decontamination.

Acknowledgements

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for the grant awarded in the master’s degree and in the purchase of the equipment FluorCam (PRÓ-EQUIPAMENTOS, publicnoticeno.11/2014); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for the scholarship PIBICT/FAPEMIG of the student Tainara Bettiol Westin.

References

- Alves, M. S., Soares, M. T., Silva L. T., Fernandes, J. P., Oliveira, M. L. A., & Paz, V. P. S. (2011). Estratégias de uso de água salobra na produção de alface em hidroponia NFT. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 15(5), 491-498.
- Bai, X. Y., Dong, Y. J., Wang, Q. H., Xu, L. L., Kong, J., & Liu, S. (2015). Effects of lead and nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element content of perennial ryegrass. *Biologia Plantarum*, 59(1), 163-170.
- Dao, L. H. T., & Beardall, J. (2016). Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. *Chemosphere*, 147(1), 420-429.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 36(6), 1039-1042.
- Fu, W. G., & Wang, F. K. (2015). Effects of high soil lead concentration on photosynthetic gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Brassica chinensis* L. *Plant, Soil and Environment*, 61(7), 316-321.
- Hörtensteiner, S., & Kräutler, B. (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(8), 977-988.

- Jiang, W., & Liu, D. (2010). Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BioMed Central Plant Biology*, 10(1), 1–8.
- Leal-Alvarado, D. A., Espadas-Gil, F., Sáenz-Carbonell, L., Talavera-May, C., & Santamaría, J. M. (2016). Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic Toxicology*, 171(1), 37-47.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603(1), 591-592.
- Malavolta, E., Vitti, C. C., & Oliveira, S. A. (1997). Avaliação do estado nutricional das plantas (pp 319). Piracicaba: Esalq-USP.
- Mazumdar, K., & Das, S. (2015). Phytoremediation of Pb, Zn, Fe, and Mg with 25 wetland plant species from a paper mill contaminated site in North East India. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1),701-710.
- Mendonça, R. C., Soares, K. L. A., & Coelho, L. M. G. Análise da disponibilidade e demanda de água cinza no pavilhão de aulas da Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba-MG. *Scientia Cum Industria*, 4(2), 98-102.
- Oxborough, K. (2004). Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany*, 55(400), 1195-205.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Igdelioglu, S., Filiz, E., Karadeniz, S., & Uzunova, Z. (2016). Screening of damage induced by lead (Pb) in rye (*Secale cereale* L.) – a genetic and physiological approach. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 1-8.
- Pereira, M. P., Pereira, F. J., Rodrigues, L. C. A., Barbosa, S., & Castro, E. M. (2013). Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular, *Revista Agro@mbiente On-line*, 7(1), 36-43.
- Raskin, I., Nanda-Kumar, P. B. A., Dushenkov, S., & Salt, D. E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion Biotechnology*, 5(1), 285–290.
- Ribeiro, E. S., Pereira, M. P., Castro, E. M., Baroni, G. R., Corrêa, F. F., & Pereira, F. J. (2015). Relações da anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na tolerância ao chumbo em *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(6), 605-612.
- Romeiro, S., Lagoa, A. M. M. A., Furlani, P. B., Abreu, C. A., & Pereira, B. F. F. (2007). Lead uptake and potential for fitoremediation of *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia*, 66(2), 327-334.
- Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 17(1), 35-52.

Shen, J., Song, L., Müller, K., Hu, Y., Song, Y., & Yu, W. (2016). Magnesium Alleviates Adverse Effects of Lead on Growth, Photosynthesis, and Ultrastructural Alterations of *Torreya grandis* Seedlings. *Frontiers in plant Science*, 7(1), 1-11.

Silva, E., Santos, P. F., & Guilherme, M. F. S. (2015). Chumbo nas plantas: uma breve revisão sobre seus efeitos, mecanismos toxicológicos e remediação. *Centro Científico Conhecer*, 2(3), 1-21.

Souza, G. G., Pinheiro, A. L. M., Silva, J. A., Veroneze-Junior, V. Carvalho, M., Bertoli, A. C., Barbosa, S., & Souza, T.C. (2018). Morpho-physiological tolerance mechanisms of *Talinum patens* to lead. *Water, Air & Soil Pollution*, 229(4), 1-12.

Souza, T. C., Castro, E. M., Pereira, F. J., Parentoni, S. N., & Magalhães, P. C. (2009). Morphoanatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil and Environment*, 55(11), 504-510.

Souza, L. A., Andrade, S. A. L., Souza, S. C. R., & Schiavinato, M. A. (2011). Tolerância e Potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35(1), 1441–1451.

Srivastava, D., Singh, A., & Baunthiyal M. (2015). Lead toxicity and tolerance in plants. *Journal of Plant Science & Research*, 2(2), 1-5.

Teodoro, A., Boncz, M. A., Paulo, P. L., & Junior, A. M. (2017). Desinfecção de água cinza por fotocatalise heterogênea. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 22(5), 1017-1026.

Vasconcellos, M. C., Pagliuso, D., & Sotomaior, V. S. (2012). Fitorremediação: Uma proposta de descontaminação do solo. *Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade*, 34(83), 261-267.

ARTIGO III: Efeito do alumínio sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* L.

AUTORES: Antonio Rodrigues da Cunha Neto, Tainara Bettiol Westin, Alexandra dos Santos Ambrósio, Breno Régis dos Santos, Thiago Corrêa de Souza, Marília carvalho, Sandro Barbosa.

EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A MORFOFISIOLOGIA DE *Lactuca sativa* L.

ANTONIO RODRIGUES DA CUNHA NETO¹, TAINARA BETTIOL WESTIN¹,
ALEXANDRA DOS SANTOS AMBROSIO¹, BRENO RÉGIS DOS SANTOS¹, THIAGO
CORRÊA DE SOUZA¹, MARILIA CARVALHO¹, SANDRO BARBOSA¹

¹Universidade Federal de Alfenas; Departamento de Ciências da Natureza, Alfenas-MG

*Corresponding author email: sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br (35) 3299-1419

Resumo

A contaminação por alumínio torna os solos ácidos e seu acúmulo em diferentes partes da planta afeta células e organelas, prejudicando seu desenvolvimento, entretanto pode contribuir na fisiologia e crescimento das plantas quando usado em hidroponia. O alumínio se liga preferencialmente aos componentes da parede celular o qual apresenta alta afinidade por grupos carboxila e fosfato, além da preferência por doadores de oxigênio. Assim, este estudo investigou o efeito do alumínio sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* em hidroponia. Para isso, mudas de *Lactuca sativa* cv. Regina foram cultivadas em condições de casa de vegetação no sistema de cultivo hidropônico contendo nitrato de alumínio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_2$) nas concentrações de 50, 100, 250, 500 μM e solução de Hoagland como controle negativo por um período de 40 dias de exposição. Os parâmetros de crescimento inicial como altura da planta, número de folhas, massas fresca e seca das partes aérea e raiz e área foliar, assim como pigmentos cloroplastídicos foram avaliados semanalmente. A análise de espectrofotometria de absorção atômica foi realizada no 40º dia após exposição ao metal. O delineamento foi inteiramente casualizado com parcela subdividida no tempo contendo 5 tratamentos (0, 50, 100, 250 e 500 μM) de $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ e 3 repetições por tratamento em 5 épocas de coleta. O $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ promoveu o crescimento de *Lactuca sativa* ao longo dos 70 dias, podendo ser uma planta tolerante ao Al. Entretanto, os pigmentos cloroplastídicos e os parâmetros quantificados pela fluorescência da clorofila *a* reduziram, apresentando uma relação concentração – dependente o qual diminuía com o aumento das concentrações. Constatou-se que o alumínio embora tenha promovido o crescimento de *L. sativa*, interferiu negativamente na sua fisiologia.

Palavras – chave: Alface, Asteraceae, fitotoxicidade, pigmentos cloroplastídicos, anatomia.

Introdução

A contaminação por Al torna os solos ácidos e seu acúmulo em diferentes partes da planta afeta células e organelas em nível morfológico, citogenético e fisiológico, prejudicando seu desenvolvimento principalmente na parte radicular apresentando o primeiro sinal de toxidez visível (MATSUMOTO; MOTODA, 2013).

Entretanto, o Al pode contribuir na fisiologia e crescimento das plantas quando usado em hidroponia (KONISHI et al., 1985) por ser uma técnica que associa o metal com a composição de nutrientes fornecidos as plantas, tendo um melhor controle fitossanitário. O Al se liga preferencialmente aos componentes da parede celular o qual apresenta alta afinidade por grupos carboxila e fosfato, além da preferência por doadores de oxigênio (KONISHI et al., 1985; LIU et al., 1993).

No geral, o acúmulo de nutrientes é afetado pelo pH baixo e Al os quais são possíveis de quantificar o teor absorvido pelas plantas podendo levar a deficiências nutricionais em muitas espécies (KOCHIAN et al., 2015).

Ma e Hiradate (2000) afirmam que a ocorrência de altas concentrações de Al sugere que o acúmulo deste elemento nas plantas ocorre a partir de um mecanismo utilizado para absorver e translocar o Al das raízes até as folhas, o qual após a passagem pela membrana plasmática através de proteínas transportadoras é quelatizado pelo oxalato. A parede celular da raiz primária é uma estrutura complexa e heterogênea constituída de microfibrilas de celulose embutidas em uma matriz de pectinas e hemiceluloses.

Sendo constatado rupturas na epiderme como consequência da quebra e ruptura das células devido à ação de exclusão do Al, além da formação de uma camada celular externa adjacente a epiderme formada por proantocianidina que pode crescer gradualmente fornecendo proteção contra o acúmulo de Al^{+3} na raiz (KOCHIAN et al., 2015) e também a redução do mecanismo de extensão da parede celular sofrendo lignificação (MATSUMOTO; MOTODA, 2013).

O Al pode ser isolado em sítios, tal como o vacúolo, o qual pode ser insensível a esse metal, mesmo que as evidências indiquem que a compartimentalização seja deficiente, demonstrando a interferência do vacúolo no auxílio à tolerância das plantas ao Al (SHEN et al., 2002). Em muitas culturas, a presença de íons de Al induz a formação de fosfato de alumínio resultando numa deficiência de fósforo podendo causar redução na área foliar e clorofila (KONISHI et al., 1985), contraparte a folha, raízes podem excretar compostos

químicos alcaloides como a cafeína aumentando o crescimento por inibição da deposição calosa também estimulando a absorção de nutrientes (Xu et al., 2016).

A fotossíntese é um processo muito sensível ao estresse ambiental por excesso de Al, o qual diminui o teor de pigmentos cloroplastídicos ocorrendo mecanismos de sinalizações que iniciam alterações adequadas ao aparato fotossintético em níveis fisiológicos e bioquímicos em repostas a mudanças ambientais (TOHIDI et al., 2015). Nesse contexto, também é reduzido a capacidade de transporte de elétrons e conseqüentemente a assimilação do carbono interno podendo associar com possíveis danos nos tilacóides (KOCHIAN et al., 2015), entretanto, na forma de Al³⁺ pode ocorrer um aumento na atividade fotossintética e induzir as atividades de enzimas antioxidantes, resultando numa maior integridade da membrana e lenhificação tardia (Xu et al., 2016).

Na forma de íons, o Al interage com os componentes lipídicos da membrana plasmática facilitando a entrada de radicais causando a sua degradação e como consequência aumentando o teor de peroxidação lipídica (WANG; PAN, 2015).

Presente em solos lixiviados, o Al causa alterações no DNA e atraso no ciclo celulares, reduzindo a frequência de núcleos na fase G2 e também na fase S, acompanhadas conseqüentemente por um aumento de núcleos na fase G1 (ACHARY; PANDA, 2010).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do Al sobre a morfofisiologia de *Lactuca sativa* em hidroponia, pois esta hortaliça é a mais consumida no Brasil e a terceira em volume de produção.

A hidroponia é um sistema de produção crescente em todo território brasileiro, também é fácil encontra-lo em áreas de contaminação, sendo o Al um dos maiores poluentes ambiental através da pratica de mineração e também pelo alto consumo de produtos derivados desse metal, permanecendo no ambiente entre 200 a 500 anos.

Material e Métodos

Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados em condições de casa de vegetação não climatizada entre os meses de janeiro a março de 2017. Nos ensaios foi utilizado como organismo teste *Lactuca sativa* cv. Regina submetida ao cultivo hidropônico. Mudanças com 20 dias pós germinação foram obtidas comercialmente e colocadas em solução de Hoagland a 100% de potencial iônico para adequação.

Finalizado o período de adaptação, as mudas de *Lactuca sativa* com 30 dias de idade foram inseridas no sistema hidropônico contendo solução de Hoagland e adicionado nitrato de alumínio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_2$) nas concentrações 50, 100, 250, 500 μM e somente solução de Hoagland como controle negativo, mantendo o pH na faixa de 5,5 a 6,5 e a condutividade elétrica entre 2,3 e 2,6 dSm^{-1} .

Os parâmetros de crescimento e os pigmentos cloroplastídicos foram avaliados semanalmente a partir do 42º dia até o 70º dia correspondente ao tempo de colheita da cultivar. As análises de absorção atômica, anatomia e fluorescência da clorofila *a* foram avaliados no 70º dia de idade das mudas expostas ao Al.

Parâmetros de crescimento

Foram mensurados semanalmente durante o período entre 42 dias a 70 dias, a altura da planta (cm), área foliar (cm^2), número de folhas e massas fresca (g) e no período de 42 dias a 63 dias a massa seca (g) de parte aérea e raiz.

Pigmentos cloroplastídicos

A determinação dos teores de pigmentos cloroplastídicos foi realizada no período compreendido de 42, 49, 56, 63 e 70 dias de idade das plantas expostas ao Al. As amostras foliares foram envolvidas em papel alumínio e acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e, posteriormente, conduzidas ao laboratório. Os teores de pigmentos cloroplastídicos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) foram determinados a partir de 0,2 g de material vegetal fresco imersos em 10 mL de acetona 80% durante 24h. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Biochron, Libra S22) e as leituras realizadas a 663,2; 646,2 e 470,1 nm para os teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente, conforme a metodologia descrita por Lichtenthaler e Welburn (1983).

Fluorescência da clorofila a

A fluorescência da clorofila *a* foi obtida por imagens por meio de um fluorímetro de imagens (FluorCAM Closed FC 800-C, PhotonSystems Instruments – PSI, Ltd, Drasov, Czech Republic). As análises foram realizadas utilizando os protocolos de quenching do próprio software e de acordo com Oxborough (2004). Nas amostras adaptadas no escuro, a máxima

eficiência do fotossistema (PSII) foi estimada pela razão F_v/F_m . Em seguida as folhas foram iluminadas com luz actínica. A luz actínica foi removida e as folhas foram irradiadas com luz vermelho-distante. O quenching fotoquímico foi calculado como $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$, e o quenching não-fotoquímico foi calculado como $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com parcela subdividida no tempo contendo 4 concentrações (50, 100, 250 e 500 μM) de $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ e solução de Hoagland como controle negativo, 3 repetições por concentração e 5 épocas de coleta referentes a idade comercial de *Lactuca sativa*. Os resultados foram submetidos à análise de variância - ANAVA ($p < 0,05$) e comparação de médias entre as diferentes concentrações pelo teste de Scott-Knott utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Resultados

Parâmetros de crescimento

O $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ resultou em um efeito tóxico para o número de folhas (Figura 1 C) de *Lactuca sativa* em um curto período de tempo, pois com 42 dias, o controle (15 folhas) > 50 μM (13 folhas) > 100 μM (11 folhas) = 250 μM (12 folhas) = 500 μM (12 folhas). No 49º dia, o número de folhas manteve constante entre os tratamentos, entretanto, nas demais coletas, o $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ estimulou o aumento do número de folhas que quando analisado no 70º dia, os tratamentos tiveram uma média de 25 folhas, enquanto o controle apresentou 22 folhas.

O comportamento da massa fresca de folhas (Figura 2 A) é semelhante ao número de folhas, a qual também foi prejudicada pelo efeito tóxico do Al no 42º dia e nos demais, a planta promoveu o aumento da massa proporcionalmente com o aumento das concentrações.

O efeito tóxico do Al, diferente dos parâmetros anteriores, foi evidenciado na massa seca de folha (Figura 2 B) com 42 e 49 dias de exposição. Entretanto, aos 56 e 63 dias foi predominante o efeito benéfico, apresentando na quarta coleta uma média de 3,55 g de matéria seca nas três maiores concentrações e no controle uma massa de apenas 2,64 g.

O $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ influenciou em um curto período de tempo no crescimento secundário constatado através do diâmetro do caule (Figura 1 B). Com 42 dias, o controle apresentou um diâmetro de 8,49 mm, e na concentração mais baixa, de 50 μM já houve redução significativa

para 8,09 mm e a maior concentração obteve 5,96 mm. A partir do 56º dia, o Al não causou efeito tóxico mantendo as médias dos diâmetros de caule semelhantes.

O crescimento primário também foi afetado aos 42 dias pelo $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$, a altura do caule (Figura 1 A) do controle teve 36,84 mm e na concentração de 250 μM reduziu para 35,03 mm. A partir do 49º dia, o $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ começou a estimular o crescimento resultando em um controle com 53,32 mm e na concentração de 50 μM um aumento para 54,93 mm. O efeito benéfico persistiu nas demais coletas promovendo o crescimento na altura do caule principalmente nas três maiores concentrações.

A massa fresca do caule (Figura 2 C), com 42 dias, sofreu uma redução a partir da concentração de 100 μM (1,55 g) em relação ao controle (1,79 g) devido a presença do Al. Com 49 dias, o controle teve uma média de 4,74 g e a concentração de 50 μM apresentou 5,28 g de massa fresca de caule significativamente maior quando comparado às demais concentrações; o efeito tóxico do $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ foi observado nas concentrações de 250 μM e 500 μM os quais foram mensurados 4,25 g e 3,79 g, respectivamente. A partir do 56º dia, o Al foi benéfico, promovendo o aumento da massa fresca do caule nas três maiores concentrações.

A massa seca do caule (Figura 2 D) acompanhou o comportamento dos demais parâmetros relacionados a esse órgão. Com 42 dias, o controle teve 0,08 g e o efeito tóxico do Al se manifestou já na concentração de 50 μM mensurando 0,06 g. Aos 49º dia, não foi observado efeito do $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ na massa seca de caule, pois todos os tratamentos foram semelhantes ao controle apresentando uma média de 0,15 g. Aos 56 e 63 dias de exposição ao $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$, a presença do metal promoveu um aumento de massa seca nas três maiores concentrações.

A raiz teve um comportamento parecido com os demais órgãos. Quando analisado a massa fresca (Figura 2 E) verificou-se que o alumínio age na primeira semana de estresse reduzindo a massa a partir da concentração de 50 μM (3,43 g) em relação ao controle que apresentou uma média de 3,97 g. Com 49 dias apresentou valores iguais estatisticamente entre os tratamentos com uma média de 5,64 g. Nas demais coletas, o $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ começou a agir promovendo o aumento da massa fresca na raiz entre os tratamentos.

Nos 42 dias de exposição, a massa seca da raiz (Figura 2 F) foi prejudicada com a presença do Al, pois a concentração de 50 μM apresentou uma média de 0,14 g sendo inferior à do controle que teve 0,16 g, e as três maiores concentrações que tiveram uma redução semelhante com uma média de 0,11 g. No 49º dia, a média de 0,24 g da concentração de 500 μM foi maior que a dos demais tratamentos e controle que tiveram uma média de 0,22 g

devido ao efeito estimulante do $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$. Nas terceira e quarta semanas de coleta, o $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ promoveu o aumento da massa seca da raiz, principalmente nas maiores concentrações.

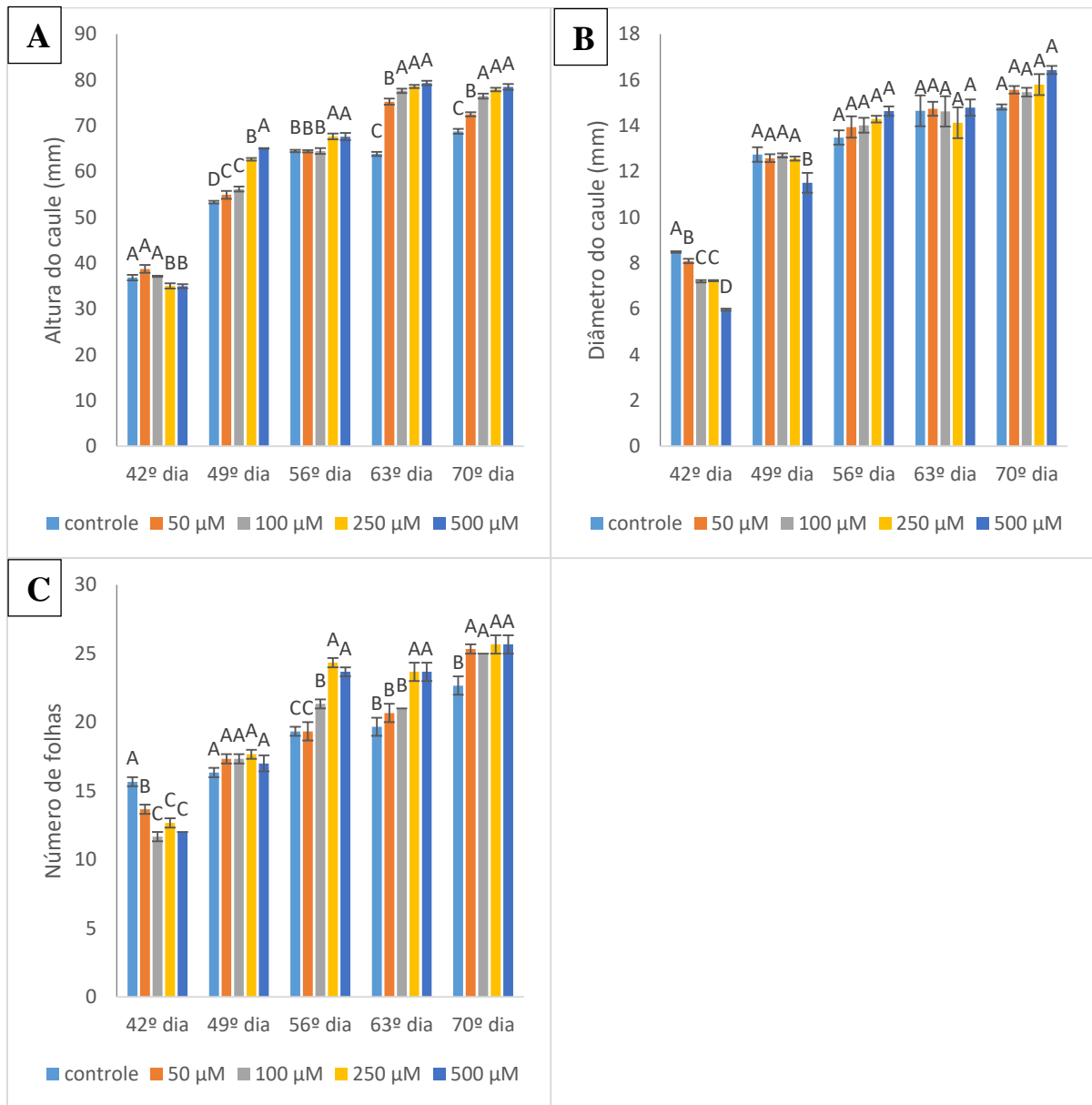


Figura 1. Gráficos de crescimento de *Lactuca sativa* expostas as diferentes concentrações de nitrato de Alumínio. Letras iguais não diferem entre si dentro da mesma coleta pelo teste de Skott – Knott a 5% de significância.

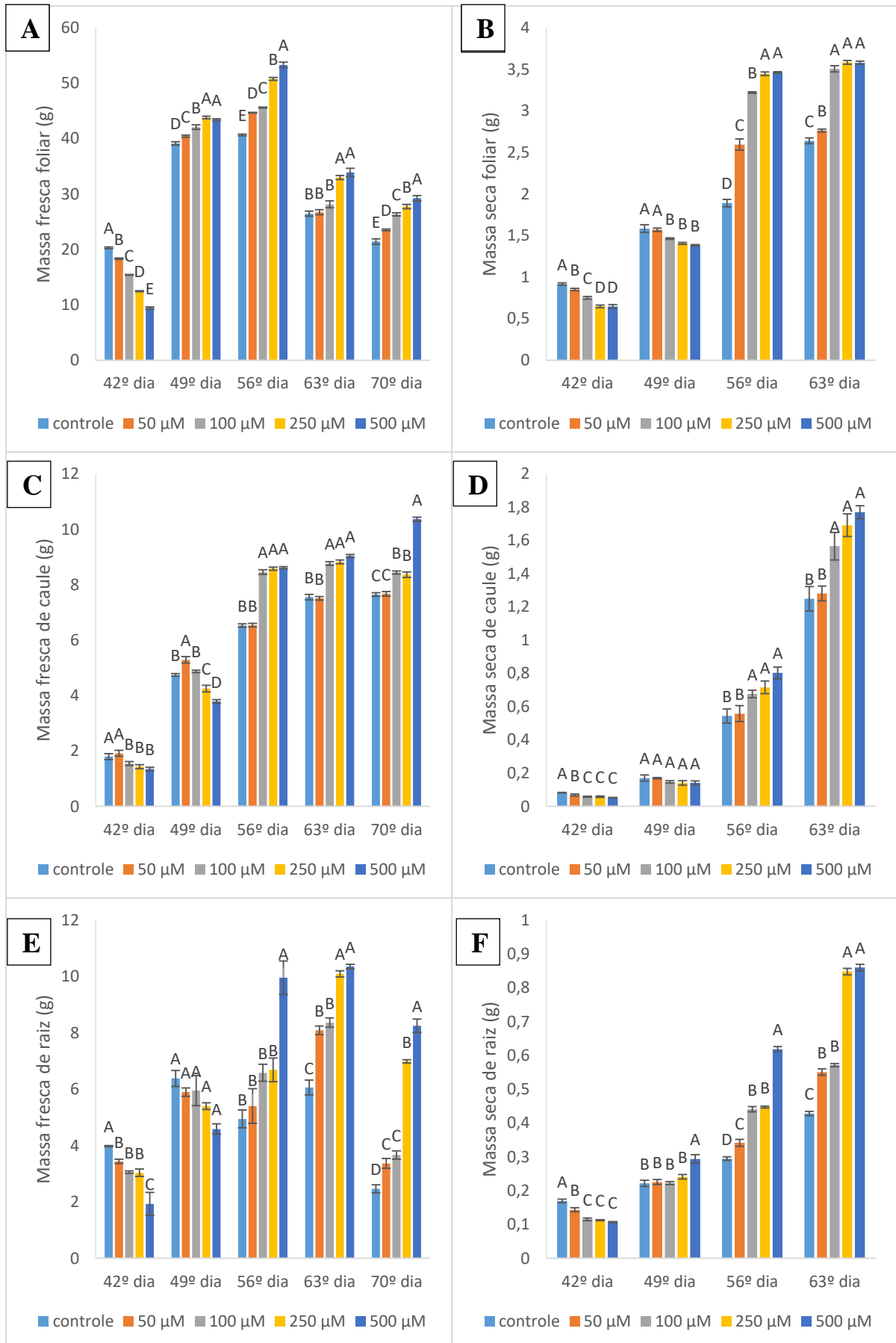


Figura 2. Gráficos de biomassa de *Lactuca sativa* expostas as diferente concentrações de nitrato de Alumínio. Letras iguais não diferem entre si dentro da mesma coleta pelo teste de Skott – Knott a 5% de significância.

Pigmentos cloroplásticos

A quantificação do teor dos pigmentos cloroplásticos mostrou que o $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ foi tóxico prejudicando esse parâmetro. O teor de clorofila *a* (Figura 3 A) reduziu em todas as coletas, principalmente aos 63 e 70 dias, apresentando o comportamento concentração – dependente devido ao tempo de exposição.

$\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ não influenciou o teor de clorofila *b* (Figura 3 B) nas primeiras duas semanas, entretanto, com 56 dias, a concentração de 100 μM foi estimulada apresentando uma média de 1,83 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ superior as demais que tiveram uma média de 1,6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Nas duas últimas coletas o efeito do alumínio foi presente reduzindo a partir da menor concentração até a maior.

O teor de carotenoides (Figura 3 C) não apresentou variação com 42 dias, entretanto nos demais, começou com uma redução gradativa ao longo das semanas, sendo que na última, apresentou uma relação concentração – dependente o qual o controle teve 2,78 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e a concentração de 500 μM apresentou a maior redução com 1,86 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

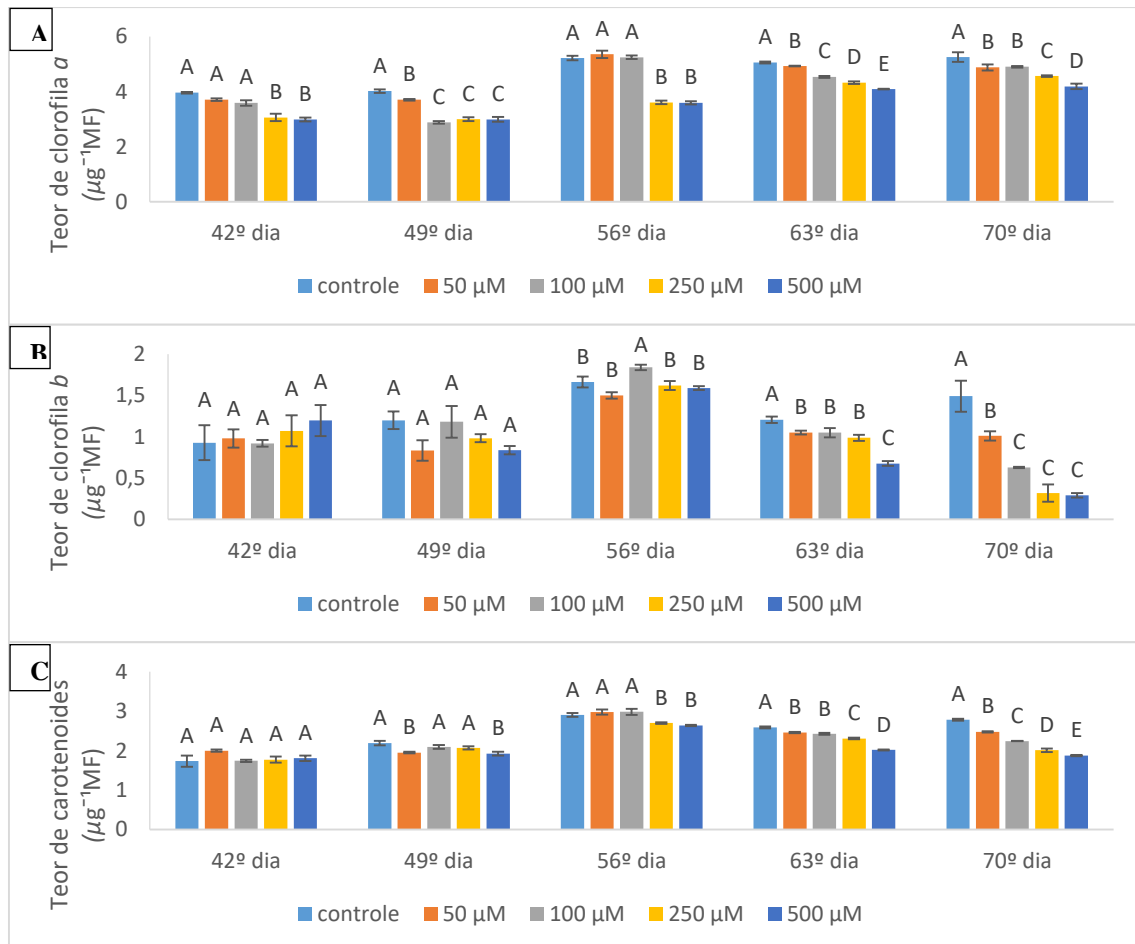


Figura 3. Teor de pigmentos cloroplásticos em folhas de *Lactuca sativa* expostas as diferentes concentrações de alumínio. Letras iguais não diferem entre si dentro da mesma coleta pelo teste de Skott – Knott a 5% de significância.

Fluorescência da clorofila a

A eficiência quântica máxima do fotossistema II tanto no escuro (Qy) quanto no claro (fv/fm) (Figura 4) mostraram um decréscimo quando expostas ao alumínio. O Qy reduziu nas duas maiores concentrações com uma média de 0,61 em relação as menores concentrações e o controle que apresentou uma média de 0,65. O fv/fm apresentou uma relação concentração – dependente reduzindo o valor com o aumento das concentrações, o controle apresentou uma média de 0,63 e a maior concentração reduziu para 0,42.

O quenching fotoquímico (qP) e o não – fotoquímico (NPQ) (Figura 4) também sofreram com a ação do nitrato de alumínio sendo que o qP reduziu de acordo com o aumento das concentrações e o NPQ aumentou indicando o estresse por esse metal.

O índice de vitalidade (Rfd) (Figura 4) mostra que o sistema fotossintético da planta sofreu danos com o estresse pelo alumínio já que o valor do índice reduziu com o aumento das concentrações, sendo a concentração de 500 μM (0,76) a menor em relação ao controle (1,36).

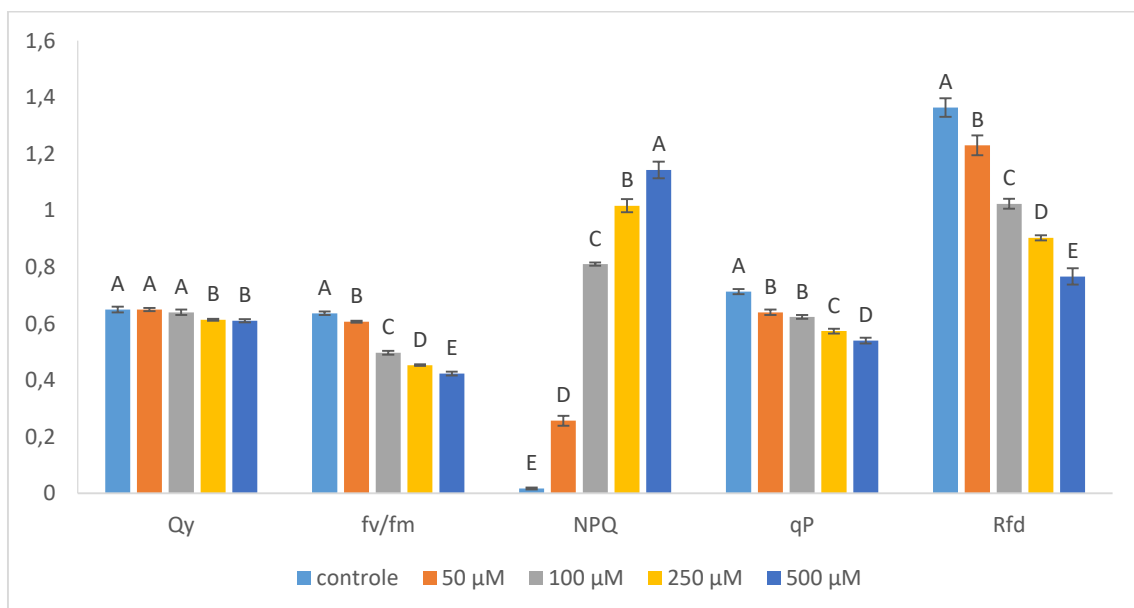


Figura 4. Parâmetros analisados pela técnica de fluorescência da clorofila *a* de *Lactuca sativa* exposta às diferentes concentrações de alumínio após 40 dias de exposição. Letras iguais não diferem entre si dentro da mesma coleta pelo teste de Skott – Knott a 5% de significância.

Discussão

A *Lactuca sativa* exposta ao $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$, cultivada em hidroponia, promoveu o aumento no número de folhas, altura da planta (Figura 1) e massa fresca e seca de raiz, caule e folha (Figura 2) corroborando com estudos realizados por Xu et al (2016) analisando o efeito do sulfato de alumínio, também em hidroponia, com duas cultivares de *Camellia sinensis*, confirmando que o metal Al pode ser benéfico para o crescimento da planta, alterando o desempenho e crescimento de índices morfofisiológicos, como massa fresca e seca de diferentes órgãos. Xu et al (2016) também sugere o Al como um importante elemento para o crescimento radicular.

O fato ao Al ter promovido o crescimento de *L. sativa*, deve-se possivelmente ao estímulo da absorção de nitrogênio em plantas respondendo positivamente ao aumento das concentrações (Rehmus et al., 2015).

Resultados contrastantes foram obtidos por Okem et al (2015) estudando *Drimys elata*, que utilizaram altas concentrações de Al, as quais, a menor concentração utilizada (500 mg.L^{-1}) não apresentou efeito nos parâmetros de crescimento. Concentrações mais altas de 1000 mg.L^{-1} e 1500 mg.L^{-1} causaram efeito tóxico reduzindo principalmente as biomassas frescas e secas.

No presente estudo, o fornecimento de $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ promoveu o crescimento e aprimoramento da atividade radicular. Este resultado pode indicar um bom crescimento em solos altamente ácidos contendo altos níveis de Al (KONISHI et al., 1985; WANG; PAN, 2015). Além disso, plantas que crescem em solos ácidos com uma alta concentração de Al desenvolvem mecanismos de tolerância para sua desintoxicação (WANG; PAN, 2015; XU et al., 2016). Por exemplo, alguns ácidos orgânicos são identificados em exsudações radiculares de muitas plantas (MA; HIRADATE, 2000; XU et al., 2016).

A exsudação radicular é o mecanismo de exclusão do Al melhor caracterizado, o qual depende de ânions de ácidos orgânicos presentes na rizosfera onde quelam íons de Al, formando compostos não tóxicos impedindo a entrada na raiz (KOCHIAN et al., 2015).

Como resultado da exsudação, temos a formação de ácidos orgânicos como o malato e o citrato que são compostos intermediários no ciclo do ácido tricarbóxico, um núcleo metabólico chave importante para todos os organismos pois é um dos responsáveis pela alocação de carbono (KOCHIAN et al., 2015; LIAO et al., 2015) o que pode ter contribuído para o aumento da massa seca de raiz, caule e folhas.

As respostas do crescimento da planta submetidas ao estresse pelo Al ocorreram, principalmente, na primeira semana de coleta, diferente dos parâmetros fotossintéticos que sofreram reduções ao longo de todas as semanas, indicando a maior sensibilidade das atividades fotossintéticas. De fato, as atividades fotossintéticas têm sido amplamente utilizadas como *end points* de toxicidade que respondem mais rapidamente do que parâmetros de crescimento (WANG et al., 2016).

A *Lactuca sativa* apresentou comportamento concentração – dependente para os pigmentos cloroplastídicos (Figura 3), corroborando com Okem et al (2015) que verificou a redução significativamente no teor de clorofila de *Drimia elata* estressada por Al. A redução dos pigmentos cloroplastídicos induzida pelas concentrações de $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ foi acompanhada pelo comprometimento na capacidade de absorver energia luminosa e pelo aumento do excesso de energia de excitação, demonstrando um efeito direto da toxicidade nos complexos de absorção de luz (LIAO et al., 2015).

Segundo Tohidi et al (2015) estudando *Brassica napus* em baixas concentrações de Al, obtiveram como resultado um efeito significativo sobre o teor de clorofila e carotenoide devido a deserção na biossíntese de clorofila. O Al pode controlar a biossíntese de clorofila por meio do controle de enzimas existentes no complexo de ruptura de água no lugar da oxidação do sistema PSII, controla a transmissão de fotossíntese eletrônica e, por isso, evita o efeito de estimulação da clorofila impedindo a transmissão de corrente de reações de elétrons (LIAO et al., 2015; TOHIDI et al., 2015).

O baixo pH e a toxicidade do Al resultaram em uma diminuição gradual do teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides, sugerindo que a toxicidade certamente inibiria a atividade fotossintética. Sob o estresse do Al, uma série de fatores são reconhecidos para atuar na fotossíntese da planta, que pode ser um resultado sintético de múltiplos fatores. Para o conteúdo de clorofila, pode ser indiretamente inibido pela adição de Al, pois pode competir com magnésio, que é parte integrante da molécula de clorofila para ligar os locais de ligação na membrana plasmática das raízes, interferindo com a absorção e transporte (YANG et al., 2015).

A diminuição do teor de clorofila na presença de metais pesados provavelmente deve-se à indução oxidativa. Foi relatado que a diminuição do conteúdo de carotenoides pode ser devida ao colapso não fotoquímico das clorofilas estimuladas por carotenoides e que desencadeia a ruptura da estrutura carotenoide (TOHIDI et al., 2015).

Todos os parâmetros analisados pela técnica da fluorescência da clorofila *a* foram afetados mais intensamente do que os parâmetros de crescimento de *Lactuca sativa* quando

expostas ao Al (Figura 5). A presença de exsudatos inibe a eficiência quântica máxima do fotossistema II independente da fase clara (Qy) ou escura (fv/fm), entretanto não afeta o crescimento primário e secundário da planta (WANG et al., 2016).

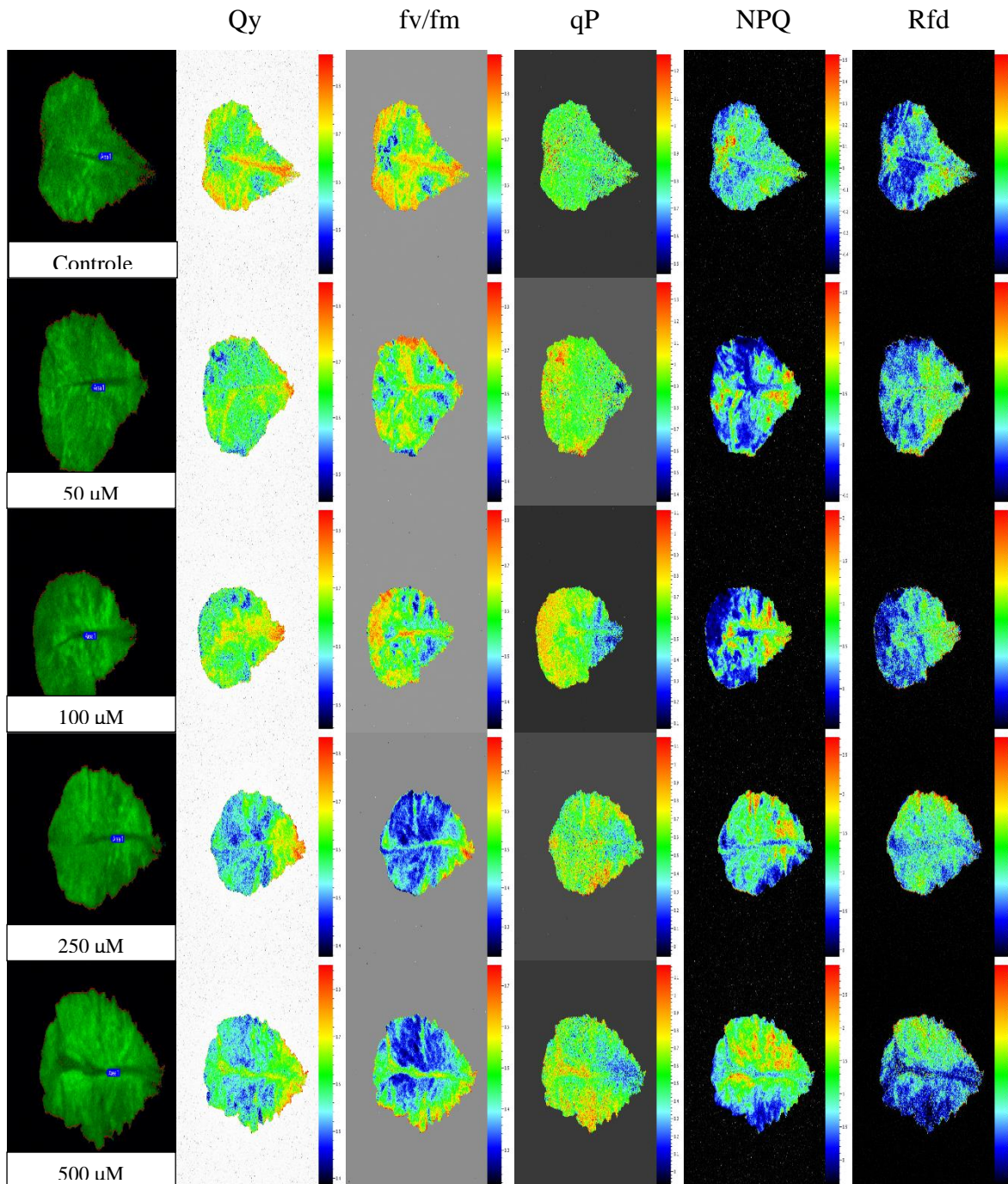


Figura 5. Análise qualitativa dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* de folhas de *L.actuca sativa* após 40 dias de exposição as diferentes concentrações de alumínio.

Liao et al (2015) verificaram a redução na fv/fm em *Citrus sinensis* e *Citrus grandis* estressados por Al e concluíram que o dano fotoinibitório ocorreu nos complexos do PSII em maior proporção no lado receptor de elétrons do que o lado doador, podendo gerar espécies

reativas de oxigênio pois os tilacóides são os principais centros de reação (YANG et al., 2015).

A inibição da eficiência quântica máxima do PSII pelo Al indica uma inibição da capacidade fotossintética, uma vez que esse parâmetro representa a capacidade do fotossistema para converter a energia da luz em energia química (WANG et al., 2016), o qual, pode reduzir o transporte de elétrons (YANG et al., 2015). Essa inibição é confirmada pelo Rfd que reduziu com a presença do Al, esse parâmetro reflete o decréscimo geral do sinal de fluorescência, uma vez que esse índice é utilizado para conhecer o potencial fotossintético da planta, assim como a integridade e funcionalidade das folhas indicando o estresse pelo metal sobre o aparelho fotossintético (LICHTENTHALER et al., 2000).

Além disso, a inibição do PSII pode induzir efeitos secundários, como a estimulação do NPQ, um mecanismo regulatório de feedback no qual a irradiação de luz excessiva é dissipada como calor, alterando a distribuição de ficobilissomas, sendo um mecanismo de fotoproteção contra o estresse, podendo associar com a redução da clorofila *a*, pois são as ficobiliproteínas que transferem a energia luminosa para o pigmento estudado (JOSHUA; MULLINEAUX, 2004; WANG et al., 2016).

A redução do qP indica uma inibição nos centros de reação do PSII nas folhas expostas ao $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$. Centro de reações fechados indicam que as plantas expostas ao metal apresentam uma absorção de radiação maior do que a capacidade de transporte de elétrons nos fotossistemas e de fixação de carbono (Fu; wang, 2015).

Conclusões

Para os parâmetros fisiológicos, pigmentos cloroplastídicos e fluorescência da clorofila *a*, o Al teve uma ação tóxica reduzindo esses parâmetros.

O $\text{Al}(\text{NO}_3)_2$ interferiu negativamente nos parâmetros analisados pela fluorescência da clorofila *a*, inibindo a eficiência quântica máxima do PSII, resultando na perda da capacidade fotossintética.

O crescimento de *Lactuca sativa* foi estimulado, podendo ser uma planta tolerante ao Al, sendo este metal altamente disponível no cerrado que é o bioma que mais tem sofrido com a conversão de terras para o uso de produção, fazendo da hidroponia um sistema de produção viável para a cultivar Regina e também fazendo necessário um controle na qualidade da água que é facilmente contaminada pelos rejeitos de mineração e produtos domésticos os quais o Al está contido.

Agradecimentos

A CNPq, Fapemig e Capes (edital 11/2014 – pro – equipamentos).

Referências

- ACHARY, V.; PANDA, B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 201-209, 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 36, n. 6, p. 1039 – 1042, 2011.
- FU, W. G.; WANG, F. K. Effects of high soil lead concentration on photosynthetic gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Brassica chinensis* L. **Plant, Soil and Environment**, v. 61, n. 7, p. 316-321, 2015.
- JOSHUA S., MULLINEAUX C. W. Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 2112-2119, 2004.
- KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 571-598, 2015.
- KONISHI, S.; MIYAMOTO, S.; TAKI, T. Stimulatory effects of aluminum on tea plants grown under low and high phosphorus supply. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 361-368, 2012.
- LIAO, X. Y.; YANG, L. T.; LU, Y. B.; YE, X.; CHEN, L. S. Roles of rootstocks and scions in aluminum-tolerance of Citrus. **Acta Physiol Plant**, v. 37, n. 1, p. 1-15, 2015.
- LICHTENTHALER, H. K.; BABANI, F.; LANGSDORF, G.; BUSCHMANN, C. Measurement of differences in red chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity between sun and shade leaves by fluorescence imaging. **Photosynthetica**, v. 38, n. 1, p. 521–529, 2000.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 603, n. 1, p. 591-592, 1983.
- LIU, D.; JIANG, W.; LI, D. Effects of aluminium ion on root growth, cell division, and nucleoli of garlic (*Allium sativum* l.). **Environmental Pollution**, v. 82, n. 1, p. 295-299, 1993.
- MA, J. F.; HIRADATE, S. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Planta**, v. 2011, n. 1, p. 355-360, 2000.

MALAVOLTA, E.; VITTI, C. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2 ed. Piracicaba: Esalq-USP. P. 319, 1997.

MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Oxidative stress is associated with aluminum toxicity recovery in apex of pea root. **Plant Soil**, v. 363, n. 1, p. 399 – 410, 2013.

OKEM, A.; SOUTHWAY, C.; STIRK, W. A.; STREET, R. A.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Effect of cadmium and aluminum on growth, metabolite content and biological activity in *Drimys elata* (Jacq.) Hyacinthaceae. **South African Journal of Botany**, v. 98, n. 1, p. 142-147, 2015.

OXBOROUGH, K. Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 400, p. 1195-1205, 2004.

REHMUS, A.; BIGALKE, M.; VALAREZO, C.; CASTILLO, J. M.; WILCKE, W. Aluminum toxicity to tropical montane forest tree seedlings in southern Ecuador: Response of nutrient status to elevated Al concentrations. **Plant and Soil**, v. 388, n. 1, p. 87-97, 2015.

SHEN, J.; SONG, L.; MÜLLER, K.; HU, Y.; SONG, Y.; YU, W. Magnesium Alleviates Adverse Effects of Lead on Growth, Photosynthesis, and Ultrastructural Alterations of *Torreya grandis* Seedlings. **Frontiers in plant Science**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PARENTONI, S. N.; MAGALHÃES, P. C. Morphoanatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environment**, v. 55, n. 11, p. 504-510, 2009.

TOHIDI, Z.; BAGHIZADEH, A.; ENTESHARI, S. The Effects of Aluminum and Phosphorous on some of Physiological Characteristics of *Brassica napus*. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 16-28, 2015.

WANG, L.; FAN, X. W.; PAN, J. L.; HUANG, Z. B.; LI, Y. Z. Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. **Planta**, v. 242, n. 6, p. 1391-1403, 2015.

WANG, R.; HUA, M.; YU, Y.; ZHANG, M.; XIAN, Q. M.; YIN, D. Q. Evaluating the effects of allelochemical ferulic acid on *Microcystis aeruginosa* by pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry and flow cytometry. **Chemosphere**, v. 147, n. 1, p. 264-271, 2016.

XU, Q.; WANG, Y.; DING, Z.; SONG, L.; LI, Y.; MA, D.; WANG, Y.; SHEN, J.; JIA, S. Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 162-172, 2016.

YANG, M.; TAN, L.; XU, Y.; ZHAO, Y.; CHENG, F.; YE, S.; JIANG, W. Effect of Low pH and Aluminum Toxicity on the Photosynthetic Characteristics of Different Fast-Growing Eucalyptus Vegetatively Propagated Clones. **Plos one**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2015.