

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**EFEITO DO COBRE E SUA INTERAÇÃO COM O ZINCO NO CULTIVO DE
PLANTAS DE BATATA-DOCE: ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS**

Cristina Copstein Cuchiara

Pelotas, 2013.

CRISTINA COPSTEIN CUCHIARA

**EFEITO DO COBRE E SUA INTERAÇÃO COM O ZINCO NO CULTIVO DE
PLANTAS DE BATATA-DOCE: ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação da Prof. Dr. José Antonio Peters, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin
Prof. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Pelotas, 2013.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C963e

Cuchiara, Cristina Copstein

Efeito do cobre e sua interação com o zinco no cultivo de plantas de batata-doce: alterações morfofisiológicas e bioquímicas / Cristina Copstein Cuchiara. – 90f. ; il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador José Antonio Peters ; co-orientador Marcos Antonio Bacarin e Eugenia Jacira Bolacel Braga.

1.Fisiologia vegetal. 2.Nutrição de plantas. 3. Fluorescência da clorofila a. 4.Metabolismo antioxidante. 5.Micronutriente. 6.*Ipomea batatas* (L.). 7.Batata doce. I.Peters, José Antonio. II.Bacarin, Marcos Antonio. III.Braga, Eugenia Jacira Bolacel. IV.Título.

CDD: 633.492

CRISTINA COPSTEIN CUCHIARA

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Antônio Peters.....
Profa. Dra. Diolina Moura Silva.....
Prof. Dr. Ledemar Carlos Vahl.....
Dra. Cristina Ferreira Larré.....

*“...Queira
Basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo
Tente outra vez*

*Tente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez...”*

(Tente outra vez - Raul Seixas)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Debora e Paulo Renato, e ao meu irmão, Gustavo,
por estarem presentes em todos momentos,
por acreditarem em mim, pelo apoio
e amor incondicional...*

AGRADECIMENTOS

Às pessoas mais importantes da minha vida, Paulo Renato e Debora, pelos exemplos de vida e dedicação, amor e apoio incondicional.

A meu irmão Gustavo, pela amizade, paciência e ajuda nas traduções.

Ao meu namorado Juliano Dutra Schmitz, pelo carinho, compreensão e companhia durante a realização desse curso.

Ao meu orientador José Antonio Peters, exemplo de trabalho e dedicação, pela a orientação na construção deste trabalho que me proporcionaram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Em especial a amiga, Ilda Mariclei de Castro da Silva, pela ajuda nos trabalhos, estudos e momentos de descontração que tornaram o caminho até aqui mais agradável.

Aos amigos, Davi Silva Dalberto e Cristina Ferreira Larré, pelo apoio intelectual.

Às colegas pelas ajudas nas análises e execução dos trabalhos: Mara Cíntia Winhelmann, Ilisandra Zanandrea, Emanuela Garbin Martinazzo, Juliana Aparecida Fernando e Thaise Debatin Wehrmeister.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – PPGFV, pela ótima convivência e amizade, Aline Scheer da Silva, Alícia Moraes Kleinowski, Elisia Rodrigues Corrêa, Letícia Neutzling Rickes e Daiane de Pinho Benemann.

Aos demais colegas, amigos e professores do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas que ajudaram e apoiaram de alguma forma na construção desse trabalho.

A Embrapa Clima Temperado, em especial ao Leonardo Ferreira Dutra, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

A Universidade Federal de Pelotas – UFPel, pela a oportunidade do conhecimento.

Ao departamento de Microbiologia e Parasitologia, em especial a Professora Elisabeth Berne (Laboratório de Parasitologia) pela ajuda e disponibilização dos equipamentos de análise de imagens.

Ao departamento de Botânica, especialmente ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Laboratório de Metabolismo Vegetal e Laboratório de Anatomia Vegetal, por receber-me e por ter possibilitado a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – PPGFV, pelos ensinamentos científicos, acolhimento, confiança e seriedade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela oportunidade e concessão da bolsa de estudo.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CUCHIARA, Cristina Copstein. **Efeito do cobre e sua interação com o zinco no cultivo de plantas de batata-doce: alterações morfofisiológicas e bioquímicas.** 2013. 90f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Atualmente, o excesso de micronutrientes tem sido considerado um dos sérios problemas ambientais, principalmente em áreas influenciadas pela atividade antrópica. Dentre eles, destacam-se o cobre (Cu) e o zinco (Zn), que em baixas concentrações, são essenciais em diversos processos fisiológicos. Com base nisso, o trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações de Cu bem como a sua interação com o Zn em solução nutritiva sobre parâmetros relacionados a morfologia, fotossíntese, metabolismo antioxidativo, perfil mineral e características estomáticas em plantas de batata-doce. Para tanto, as plantas foram submetidas, sob sistema de hidroponia, a diferentes concentrações de Cu (0,041 – controle ; 0,082; 0,123 e 0,164 mM) e a diferentes tratamentos Cu-Zn [T1 (0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn – controle); T2 (0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); T3 (0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e T4 (0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn)]. As altas concentrações de Cu (0,123 e 0,164 mM) afetaram as reações fotossintéticas, com redução da atividade fotoquímica e aumento da dissipação de energia luminosa do FSII e incremento da eficiência do FSI. Porém, resultou em perdas na produção de biomassa e diminuição do tamanho dos estômatos. O excesso de Cu também acionou o sistema antioxidante, principalmente nas raízes. Esse comportamento está relacionado com os mecanismos de imobilização desse elemento nos tecidos radiculares. Independente da concentração de Cu (T2 e T4), o aumento de Zn foi tóxico para as plantas, nas quais apresentaram distúrbios nutricionais com diminuição na absorção e transporte de macronutrientes e redução de biomassa. Com isso, foi desencadeado estresse oxidativo e danos nas membranas, com aumento da atividade das enzimas antioxidantes. As raízes, nessas condições, também desenvolveram mecanismos de imobilização de micronutrientes. Contudo, mais estudos fisiológicos sobre os efeitos isolados ou combinados de nutrientes são necessários para completar o conhecimento atual.

Palavras-chave: Nutrição de plantas. Fluorescência da clorofila a. Metabolismo antioxidante. Micronutriente. *Ipomea batatas* (L.).

ABSTRACT

CUCHIARA, Cristina Copstein. **The copper effect and interaction with zinc in culture of sweet potato plants: morphophysiological and biochemical changes.** 2013. 90f. Thesis (PhD) - Post Graduation Program in Plant Physiology of University Federal of Pelotas, Pelotas.

Actually, the excess of micronutrients has been considered one of the main environmental problems, especially in areas influenced by human activity. Among them, stand out the copper (Cu) and zinc (Zn), which at low concentrations are essential in many physiological processes. Therefore, this work aimed to study the effect of different Cu concentration and its interaction with Zn in nutrient solution. The parameters analyzed in sweet potato plants were morphology, photosynthesis, antioxidant metabolism, mineral profile and stomatal characteristics. For this analysis, the plants were evaluated under hydroponics system, to different Cu concentrations (0.041 –control; 0.082; 0.123 e 0.164 mM) and different Cu-Zn treatments T1 (0.041 mM Cu + 0.085 mM Zn – control); T2 (0.041 mM Cu + 0.850 mM Zn); T3 (0.123 mM Cu + 0.085 mM Zn) e T4 (0.123 mM Cu + 0.850 mM Zn)]. The high Cu concentrations (0.123 and 0.164 mM) affected the photosynthetic reaction, reducing the photochemical activity and increasing the PSII energy dissipation and incrementing the FSI efficiency. However, it resulted in losses of biomass production and decrease of the stomata size. The excess of Cu also activated the antioxidant system, particularly in roots. This behavior is related to the immobilization mechanism of this element in root tissue. Independent of the Cu concentration (T2 and T4), the increase of Zn was toxic to plants which showed nutritional disturbances with reduced nutrients absorption and transport, and biomass reduction. Thus, this increase unleashed oxidative stress and membrane damage with increased antioxidant enzymes activity. In these conditions the roots also developed mechanisms for immobilization of micronutrients. However, further studies on the isolated physiological effects or in combination with nutrients are necessary to complete the current knowledge.

Key words: Plant nutrition. Chlorophyll fluorescence. Antioxidant metabolism. Micronutrient. *Ipomea batatas* (L.).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Índice estomático e diâmetro dos estômatos (média $\pm$ erro padrão) de folhas de batata-doce (<i>Ipomea batatas</i> L.) cultivadas com diferentes concentrações de cobre (Cu).....	52
Tabela 2	Teores de nutrientes minerais presentes na massa seca de folhas e raízes de batata-doce (<i>Ipomea batatas</i> L.) cultivadas com diferentes concentrações de cobre (Cu).....	54

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Teores de nutrientes minerais presentes na massa seca de folhas e raízes de batata-doce (<i>Ipomea batatas</i> L.) em função dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn).....	77
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Fluorescência transiente da clorofila *a* em folhas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) adaptadas ao escuro e cultivadas com diferentes doses de cobre: (A) Intensidade de fluorescência (F_t); (B) Fluorescência variável relativa [$W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$]..... 27
- Figura 2 Fluorescência transiente da clorofila *a* em folhas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) adaptadas ao escuro e cultivadas com diferentes doses de cobre: (A) Fluorescência variável entre os pontos O e K [$W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$]; (B) Diferença cinética de W_{OK} , $\Delta W_{OK} = [W_{OK(\text{tratamento})} - W_{OK(\text{controle})}]$; (C) Fluorescência variável entre os pontos O e J [$W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$]; (D) Diferença cinética de W_{OJ} , $\Delta W_{OJ} = [W_{OJ(\text{tratamento})} - W_{OJ(\text{controle})}]$; (E) Fluorescência variável entre os pontos O e I [$W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$] no intervalo de tempo de 30 a 330ms; (F) Fluorescência variável entre os pontos I e P [$W_{IP} = (F_t - F_I)/(F_M - F_I)$] no intervalo de tempo de 30 a 180 ms.... 29
- Figura 3 Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* obtidos por meio do Teste JIP em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes doses de cobre: 0,041; 0,082; 0,123 e 0,164mM..... 31
- Figura 4 Curvas de respostas a intensidade luminosa em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes doses de cobre: (A) Rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII (ϕ_{PSII}); (B) Coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência variável da fotossíntese (qP); (C) Extinção não-fotoquímica (NPQ); (D) Coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência variável da fotossíntese (qN). PPFD = densidade de fluxo fotossinteticamente ativo ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)..... 32
- Figura 5 Variação da taxa de transferência de elétrons no FSII, ETR (II) em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes doses de cobre: 0,041; 0,082; 0,123 e 0,164 mM. PPFD = densidade de fluxo fotossinteticamente ativo ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)..... 33

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Efeito de diferentes concentrações de cobre (Cu) sobre os parâmetros morfológicos em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Comprimento dos ramos; (B) Número de folhas; (C) Área foliar; (D) Massa fresca da parte aérea (MFPA); (E) Massa seca da parte aérea (MSPA); (F) Massa fresca do sistema radicular (MFSR); (G) Massa seca do sistema radicular (MSSR). Médias seguidas da mesma letra, entre tratamentos, não diferem significativamente pelo teste F ($p < 0,05$)..... 50

- Figura 2 Efeito de diferentes concentrações de cobre (Cu) sobre o metabolismo antioxidante em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Superóxido dismutase (SOD); (B) Ascorbato peroxidase (APX); (C) Catalase (CAT). Médias seguidas de letras minúsculas iguais, nos tecidos foliares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nos tecidos radiculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro..... 51

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn) sobre parâmetros morfológicos em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Comprimento dos ramos; (B) Número de folhas; (C) Área foliar; (D) Massa fresca da parte aérea (MFPA); (E) Massa seca da parte aérea (MSPA); (F) Massa fresca do sistema radicular (MFSR); (G) Massa seca do sistema radicular (MSSR). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn). Médias seguidas da mesma letra, entre tratamentos, não diferem significativamente pelo teste F ($p < 0,05$)..... 71

- Figura 2 Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn) sobre o metabolismo antioxidante em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Superóxido dismutase (SOD); (B) Ascorbato peroxidase (APX); (C) Catalase (CAT). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn). Médias seguidas de letras minúsculas iguais, nos tecidos foliares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nos tecidos radiculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro..... 73

- Figura 3 Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn) sobre o metabolismo antioxidante em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); (B) Peroxidação lipídica (MDA). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn). Médias seguidas de letras minúsculas iguais, nos tecidos foliares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nos tecidos radiculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro..... 75

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO 1 - FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A EM PLANTAS DE BATATA-DOCE (<i>Ipomea batatas</i> L.) EM FUNÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE COBRE.	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1.1 INTRODUÇÃO	24
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	26
1.3 RESULTADOS	27
1.4 DISCUSSÃO	33
1.5 CONCLUSÃO.....	36
1.6 REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE BATATA-DOCE (<i>Ipomea batatas</i> L.) FRENTE A EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBRE	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
2.1 INTRODUÇÃO	43
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.3 RESULTADOS	48
2.4 DISCUSSÃO	55
2.5 CONCLUSÃO.....	58
2.6 REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO 3 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE BATATA-DOCE (<i>Ipomea batatas</i> L.) EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COBRE E ZINCO.....	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
3.1 INTRODUÇÃO	66
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	67
3.3 RESULTADOS	70
3.4 DISCUSSÃO	78
3.5 CONCLUSÃO.....	81
3.6 REFERÊNCIAS	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas são organismos autotróficos que possuem a habilidade de utilizar a energia luminosa e sintetizar componentes vitais a partir do dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e nutrientes. Os minerais, macro e micronutrientes, são essenciais para promover e manter o crescimento e desenvolvimento normal, bem como, completar seu ciclo de vida (YRUELA, 2009; HENRIQUES; CHALFUN-JUNIOR; AARTS, 2012). Os metais são componentes naturais do solo e alguns, como é o caso do cobre (Cu) e do zinco (Zn), são considerados micronutrientes para as plantas. Porém, a intensificação das atividades industrial e agrícola têm levado ao acúmulo de metais pesados no ambiente e, desta forma, comprometendo importantes funções metabólicas associadas a fisiologia, bioquímica e biologia molecular das plantas (YRUELA, 2009).

O Cu é um metal de transição, envolvido em reações redox e essencial para as plantas, possuindo características importantes, tais como a formação de complexos altamente estáveis e a facilidade de transferência de elétrons, ou seja, interconversão entre dois estados de oxidação, Cu^{2+} e Cu^+ (forma instável) (YRUELA, 2005; HÄNSCH; MENDEL, 2009). O Cu tem alta afinidade com grupos peptídicos e sulfídricos e, com proteínas ricas em cisteína, bem como com grupos carboxílicos e fenólicos. Por esse motivo, na solução do solo, nas raízes, na seiva do xilema e no meio intracelular, 98-99% do Cu está presente na forma complexada (PRADO, 2008).

A concentração de Cu encontrada nos tecidos vegetais está entre $1\text{-}5\text{ mg g}^{-1}$ da matéria seca (MS) e a quantidade média encontrada nas folhas é de 10 mg g^{-1} da MS ($5\text{-}20\text{ mg g}^{-1}$ de MS), embora estas concentrações possam variar entre espécies e variedades de plantas da mesma espécie (YRUELA, 2009). Em meios nutritivos, a

concentração de Cu livre varia de 10^{-14} a 10^{-16} M, enquanto que nos solos, as plantas encontram concentrações que variam de 10^{-6} a 10^{-9} M. Abaixo ou acima das concentrações nos meios nutritivos e nos solos pode ocorrer deficiência ou excesso, respectivamente (YRUELA, 2009).

Com o intuito de regular a homeostase em resposta as variações ambientais, as plantas têm uma complexa rede de transportadores envolvidos no equilíbrio intracelular a fim de evitar o acúmulo de Cu e assegurar a alocação adequada do elemento à proteína alvo (YRUELA, 2009). Os membros da COPT1 e COPT5 da família das “proteínas transportadoras de Cu” (COTP) têm sido encontrados no citoplasma e vacúolo de plantas, respectivamente (YRUELA, 2005; 2009; MARTINOIA et al., 2012). Outros tipos de transportadores de Cu, são as ATPases tipo P de metais pesados e membros da família NRAMP (“natural resistance associated macrophage protein”) que estão envolvidas no transporte de metais essenciais e potencialmente tóxicos através das membranas celulares (YRUELA, 2009). No transporte de Cu também há participação de chaperonas (chamadas metalochaperonas) e proteínas ZIP (“Zinc regulated transporter / Iron regulated transporter Protein”) envolvidas no transporte citoplasmático do metal (O’HALLORAN; CULOTTA, 2000; HUFFMAN; O’HALLORAN, 2001; COLANGELO; GUERINOT, 2006; PUIG et al., 2007). Entre os ligantes ou quelantes de metais pesados, o ácido muginéico (MA) e a nicotinamina (NA) participam no transporte de metais essenciais, como Cu, Fe, Mn, Ni, e Zn (HAYDON; COBBETT, 2007; YRUELA, 2009). Existem também os transportadores YSL (“Yellow Stripe-like”), considerados mediadores da absorção de metais que são complexados a NA ou com fitosideróforos derivados de plantas e transportam tri-, tetra-, penta- e hexapeptídios (YEN; TSENG; SAIER, 2001; CURIE et al., 2009).

Dentro da célula, o Cu é exigido em pelo menos seis locais: citosol, retículo endoplasmático, membrana mitocondrial interna, estroma do cloroplasto, lúmen do tilacóide e apoplasto. No proteoma de *Arabidopsis* podem ser encontradas 105 “Proteínas dependentes de Cu” e 21 “Proteínas de ligação ao Cu” (KRÄMER; CLEMENS, 2006). Desta forma, essas proteínas desempenham papéis fundamentais em processos tais como a fotossíntese, respiração mitocondrial, metabolismo do carbono e assimilação do nitrogênio, proteção ao estresse oxidativo, metabolismo de parede celular, detecção de etileno, produção de metabólitos secundários, metabolismo de síntese do cofator molibdênio e biossíntese de

fitocromo (MENDEL, 2005; PILON et al., 2006; BURKHEAD et al., 2009; YRUELA, 2009; LEQUEUX et al., 2010; PEROTTI et al., 2010). Os íons Cu também atuam como co-fatores de numerosas enzimas tais como superóxido dismutase Cu/Zn (Cu/ZnSOD), citocromo oxidase, ascorbato oxidase, amino oxidase, lacase, plastocianina e polifenol oxidase (YRUELA, 2009).

A maior parte do Cu está presente nos cloroplastos das folhas, e mais da metade esta ligada à molécula de plastocianina, fazendo o transporte eletrônico entre os fotossistemas (I e II) (PRADO, 2008), que é o principal alvo de deficiência de Cu na fotossíntese. No entanto, o aparato fotossintético é sensível a esse cátion, onde o excesso pode levar a danos fisiológicos irreversíveis. O excesso de Cu tem sido relacionado a diminuição da atividade do fotossistema II, redução da taxa de transferência de elétrons, inibição da atividade das enzimas durante o Ciclo de Calvin-Benson ou na rede de assimilação de CO₂, modificação do lado aceptor do fotossistema II, diminuição no conteúdo de pigmentos (clorofila e carotenóides) e reduzida síntese de plastoquinona (SHI-SENG, 2007; YRUELA, 2009; CAMBROLLÉ et al., 2011).

O Cu, juntamente com o Zn, é constituinte da enzima superóxido dismutase (Cu/ZnSOD). Os íons Cu e Zn são essenciais para o transporte de elétrons fotossintéticos para o oxigênio na reação de Haber-Mehler. Nos cloroplastos, radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) são formados mesmo sob metabolismo normal. A Cu/ZnSOD, localizadas perto do fotossistema I, acelera consideravelmente a decomposição de $O_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, forma peróxido de hidrogênio (H₂O₂), O₂ e radical hidroxila reativo (OH^{*}) (MAKSYMIEC, 1997). Assim, o excesso de Cu pode causar estresse oxidativo em plantas e posteriormente, aumentar a resposta antioxidante, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) altamente tóxicos. Assim, uma forma de controlar os danos oxidativos é através da ação das enzimas antioxidantes, ou seja, ascorbato peroxidase (APX), catálase (CAT), dehidroascorbato redutase (DHAR), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR) e superóxido dismutase (SOD) (YRUELA, 2009). As EROs podem ser altamente destrutivas, pois aumentam a permeabilidade das membranas (desestabilização estrutural das proteínas) e induzem a peroxidação lipídica e degradação do ácido indolacético (AIA) (SMIRNOFF, 1993; MADIOUNI et al., 2006), levando a uma diversidade de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (FANG et al., 2001).

Diferentemente do Cu, o Zn existe no estado de oxidação +2 em solução, sendo redox estável sob condições fisiológicas, ou seja, não está sujeito a mudanças de valência e ocorre nas plantas somente como Zn^{+2} . O elemento forma complexos com enzimas (metaloenzimas), em alguns casos, o Zn liga as enzimas a seus substratos correspondentes, enquanto em outros, o Zn forma complexos tetraédricos com nitrogênio (N), oxigênio (O) e, particularmente, ligantes de enxofre (S) com uma variedade de compostos orgânicos (BROADLEY et al., 2007).

O Zn é um micronutriente limitante para a maioria das culturas, encontra-se em baixa concentração no solo e a sua disponibilidade é influenciada por diversos fatores: pH alto, altas doses de fertilizantes, principalmente, fosfatados, alto teor de matéria orgânica e alta umidade associados à baixa temperatura (PRADO, 2008). Para suportar o crescimento adequado das plantas, concentrações de Zn entre 30 e 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS são suficientes, ao passo que os sintomas de toxicidade são observados em concentrações superiores a 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS (BROADLEY et al., 2007). Portanto, para o crescimento ótimo, as plantas precisam manter o controle sobre a homeostase de Zn (HENRIQUES; CHALFUN-JUNIOR; AARTS, 2012).

Vários estudos estão focados na identificação de genes para proteínas transportadoras de Zn e para enzimas biossintetizadoras de compostos quelantes. Alguns membros da família de proteínas NRAMP estão localizadas na membrana vacuolar e envolvidas no acúmulo de Zn (THOMINE et al., 2000; MARTINOIA et al., 2012). Os membros HMA1, HMA2, HMA3 e HMA4 da família de transportadores ATPases do tipo P são responsáveis por Zn e localizados, possivelmente, nos cloroplastos (KIM et al., 2009), nas membranas plasmáticas (EREN; ARGÜELLO, 2004), nos vacúolos (MARTINOIA et al., 2012) e nos vasos xilemáticos (VAN DE MORTEL et al., 2006), respectivamente. Os membros MTP1 e MTP3 da família CDF (“cation diffusion facilitator”) parecem estar envolvidos no sequestro de Zn nos vacúolos das raízes limitando sua translocação para a parte aérea (ARRIVAUULT; SENGER; KRAMER, 2006; GUSTIN; ZANIS; SALT, 2011). Os transportadores da família ZIP, ZRT (“zinc regulated transporter”) e IRT (“iron-regulated transporter-like protein”) contém membros transportadores de Zn através das membranas plasmáticas (PALMER; GUERINOT, 2009; SONG et al., 2010). A nicotinamina (NA) é conhecido por facilitar a entrada de Zn nos vasos do floema ou do xilema através de transportadores da família YSL (“Yellow Stripe-like”) (HENRIQUES; CHALFUN-JUNIOR; AARTS, 2012).

Há um grande número de enzimas em que o Zn é um componente estrutural, como: anidrase carbônica, carboxipeptidase, superóxido dismutase CuZn (SOD), fosfatase alcalina, fosfolipases e RNA polimerase. Em outras enzimas, o Zn é necessário pois atua na modulação da atividade das mesmas, como as desidrogenases, aldolases, isomerases e transfosforilases. Com base nisso, na fisiologia das plantas, o Zn participa da síntese de proteínas, do metabolismo de carboidratos, da síntese de triptofano e da síntese do ácido indolilacético (BROADLEY et al., 2007; HENRIQUES; CHALFUN-JUNIOR; AARTS, 2012).

Diante do exposto, tanto o Cu quanto o Zn são micronutrientes essenciais para as plantas em baixas concentrações, mas podem ser altamente tóxicos quando presentes em concentração elevadas (HATTAB et al., 2009; LI et al., 2009). A interação entre esses nutrientes pode ocorrer quando o fornecimento de um elemento afeta a absorção, translocação e utilização de outro pelas plantas (FAGERIA, 2001). Neste caso, a interação entre eles tem sido pouco estudada. Até o presente momento, sabe-se que o Cu inibe significativamente a captação de Zn e acredita-se que o Zn possa interferir com o processo de absorção de Cu (LOU; RIMMER, 1995; FAGERIA, 2001; MACINNIS-NG; RALPH, 2004; UPADHYAY; PANDA, 2010). No entanto, existem poucos estudos sobre interações entre Cu e Zn a nível morfofisiológico.

Altas concentrações de micronutrientes pode causar distúrbios nutricionais nas plantas, afetando negativamente importantes processos fisiológicos. Estudar os efeitos do excesso de Cu bem como a sua interação com o Zn é fundamental para o entendimento das funções desempenhadas pelos micronutrientes nos organismos vegetais. Esse conhecimento é, de maneira significativa, necessário para os estudos de nutrição vegetal, para os programas de melhoramento genético e para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao excesso destes nutrientes.

Com base nisso, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações de Cu bem como a sua interação com o Zn em solução nutritiva sobre parâmetros relacionados a morfologia, fotossíntese, metabolismo antioxidativo, perfil mineral e características estomáticas em plantas de batata-doce.

Objeto de estudo

A batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] é uma planta eudicotiledônea, pertencente à família Convolvulaceae que agrupa, aproximadamente, 50 gêneros e

mais de 1.000 espécies e, somente a batata-doce, possui relevância econômica (EDMOND; AMMERMAN, 1971). Além de fornecedor de nutrientes, a cultura da batata-doce é de grande importância nos países em desenvolvimento, devido às características como: facilidade de cultivo, biomassa elevada, resistência à seca e baixo custo de produção (LOW et al., 2007). Além de constituir um alimento altamente energético, rico em carboidratos, açúcares, sais minerais e vitaminas A, C e do Complexo B (MIRANDA et al., 1987). Pelo seu peso, é o sétimo alimento mais importante no mundo, depois do trigo, arroz, milho, batata, cevada e mandioca (WOOLFE, 1992).

No território brasileiro, a cultura está bastante disseminada em todas as regiões, sendo cultivada, na maioria das vezes, por pequenos produtores rurais para o seu próprio consumo (SOUZA, 2000). Em 2011, a produtividade média de batata-doce no Brasil foi de 12,41 t.ha⁻¹ de raízes, sendo o estado do Rio Grande do Sul possuidor da maior área plantada, 12.345 ha com uma produção de 160.227 toneladas (IBGE, 2012).

A batata-doce é uma planta herbácea, rastejante, verde ou arroxeadada, chegando a alcançar de 3 a 5 metros de comprimento. As folhas podem ser cordiformes, lanceoladas e recortadas, com pecíolos bastante desenvolvidos. As flores são hermafroditas, de coloração lilás ou arroxeadas, porém, auto estéreis, o que favorece a fecundação cruzada artificial (EDMOND; AMMERMAN, 1971). Propaga-se também assexuadamente, sendo este processo usado para plantios comerciais (EDMOND; AMMERMAN, 1971). Possui hábito de crescimento indeterminado, ciclo perene e tuberização contínua, ocorrendo a morte natural da planta somente com a ocorrência de fatores climáticos severos, como geada e seca prolongada (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002).

Durante o seu crescimento, são identificadas três fases fisiológicas. Na primeira, predomina o desenvolvimento da parte aérea, com formação das raízes absorventes e aptas à tuberização; na segunda, ocorrem os crescimentos radical (tuberização) e vegetativo, e na terceira prevalece a tuberização. As alterações no crescimento das plantas são determinadas a partir de caracteres fisiológicos como massa seca (raízes, caules, folhas) e área foliar (QUEIROGA et. al., 2007). Com base nessas características expostas, esta planta tem sido utilizada como modelo em estudos do departamento de botânica da Universidade Federal de Pelotas pois apresenta ótima propagação e, pela grande capacidade de crescimento em curto

período de tempo, facilita a realização de trabalhos na área da nutrição de plantas e metabolismo vegetal (ADAMSKI et al., 2011; 2012).

CAPÍTULO 1

Fluorescência da clorofila a em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) em função de diferentes doses de cobre

Chlorophyll fluorescence in sweet potato plants (*Ipomea batatas* L.) related to different doses of copper

RESUMO

A fotossíntese é um dos principais processos metabólicos vegetais afetados por deficiência e toxidez de cobre e, com base nisso, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da exposição a diferentes doses de cobre sobre a fluorescência transiente e modulada da clorofila *a* em plantas de batata-doce. Para tanto, as mesmas foram colocadas em sistema hidropônico e cultivadas por seis dias com solução nutritiva completa. Após, transferidas para solução com diferentes doses de cobre: 0,041; 0,082; 0,123 e 0,164 mM, durante nove dias. As soluções foram renovadas a cada três dias e as plantas avaliadas ao final do experimento. O aumento da disponibilidade de Cu (0,123 e 0,164 mM) influenciou positivamente na estrutura e na funcionalidade do fotossistema I (FSI) verificado pelas análises do $W_{O_2} \geq 1$, RE_0/RC , RE_0/ABS e PI_{total} . O aumento também reduziu a taxa aparente de transporte de elétrons no FSII [ETR(II)] e as plantas tratadas com 0,082 e 0,123 mM apresentaram capacidade de dissipar o excesso de energia luminosa no FSII e proteger as unidades do mesmo (NPQ e qN). A análise conjunta dos dados permite concluir que plantas de batata-doce apresentam redução na atividade fotoquímica do FSII, aumento da dissipação de energia luminosa do mesmo fotossistema e incremento da eficiência do FSI em resposta as altas doses de cobre em solução nutritiva.

Palavras-chave: Micronutriente. Fotossíntese. Sulfato de cobre. Fluorescência transiente. Fluorescência modulada.

ABSTRACT

Photosynthesis is one of the major plant metabolic processes affected by copper deficiency and toxicity, and based on this, the objective of this study was to evaluate the effects of different copper concentrations on the photosynthetic characteristics of sweet potato plants. The plants were hydroponically grown in a complete nutrient solution for six days and then were transferred to the same solution containing different Cu concentrations (0.041, 0.082, 0.123 and 0.164 mM). The plants were maintained in these solutions for nine days. The nutrient solutions were replaced every three days, and the plants were evaluated at the end of the experiment. The increased availability of copper (0.123 and 0.164 mM) had a positive impact in the structure and function of photosystem I (PSI) recorded by the analysis of the $W_{O_2 \geq 1}$, RE_0/RC , RE_0/ABS and PI_{total} . The increase also reduced the apparent rate of electron transport in PSII [ETR(II)], and plants treated with 0.082 and 0.123 mM showed an ability to dissipate the excess of light energy in PSII and to protect the its units (qN and NPQ). The data analysis allows to conclude that sweet potato plants exhibit reduced photochemical activity, increased energy dissipation in the PSII, and increased FSI efficiency in response to high doses of copper in the nutrient solution.

Keywords: Micronutrient. Photosynthesis. Copper sulphate. Fluorescence transient. Modulated fluorescence.

1.1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados são considerados poluentes ambientais devido à sua toxicidade, persistência e não-degradabilidade no solo, sendo o cobre um dos principais contaminantes ambientais (CAMBROLLÉ et al., 2013). Esse metal, em baixas concentrações, é classificado como micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas participando de importantes reações biológicas, principalmente como cofator enzimático e presente em moléculas transportadoras de elétrons nos processos fotossintéticos (plastocianina) e respiratórios (citocromo oxidase), porém, quando em excesso, torna-se altamente tóxico aos vegetais (MATEOS-NARANJO et al., 2008).

Na maioria das espécies, o primeiro efeito da toxidez por cobre ocorre nas raízes; no entanto, em altas concentrações, pode ser translocado para a parte aérea e interferir em diversos processos fisiológicos (CAMBROLLÉ et al., 2013). Os limites de concentração foliar de cobre que causam toxidez são altamente variáveis, sendo citados valores entre 0,02-0,1 mg g⁻¹ de massa seca (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Altos níveis de cobre tem sido relacionado a reduções e, ou danos ao: crescimento das plantas, absorção de nutrientes minerais, atividade fotossintética, permeabilidade das membranas, síntese de proteínas, atividade de enzimas e estrutura da cromatina (CAMBROLLÉ et al., 2011; 2012).

Em solos contaminados, as plantas comportam-se de diferentes maneiras frente a estresses abióticos e avaliar as respostas fisiológicas das plantas submetidas à toxidez por metais pesados, podem ajudar a compreender as estratégias empregadas na remoção, acúmulo e tolerância aos metais (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; CAMBROLLÉ et al., 2013).

Sendo a fotossíntese um dos principais processos metabólicos vegetais afetados por toxidez de cobre, estudos para avaliar estes efeitos tem demonstrado que este metal provoca diminuição da fotossíntese devido alteração nas reações

fotoquímicas do fotossistema II (FSII), ou seja, inativação de centros de reação ativos, redução do rendimento quântico, diminuição no transporte de elétrons no lado aceptor e na evolução de oxigênio (PERALES-VELA et al., 2007; XIA; TIAN, 2009; CAMBROLLÉ et al., 2012; OUKARROUM; PERREAULT; POPOVIC, 2012). A análise da fluorescência transiente da clorofila *a* é uma ferramenta eficaz para o estudo dos aspectos fisiológicos da estrutura e atividade, em especial no FSII (STRASSER et al., 2004) e tem sido amplamente utilizada para avaliar danos causados no sistema fotossintético das plantas, em função de diversos tipos de estresse (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

A fluorescência modulada da clorofila *a* é uma técnica que permite obter informações qualitativas e quantitativas sobre a organização e funcionamento do aparato fotossintético de plantas por meio do método de pulso saturante (ROHÁČEK; BARTÁK, 1999). O princípio empregado por esse método vêm sendo utilizado em estudos sobre fisiologia de plantas que necessitam quantificar as contribuições dos processos fotoquímicos e de dissipação de energia não-fotoquímica do FSII (ROHÁČEK; BARTÁK, 1999; SCHREIDER, 2004). Conforme estudos desenvolvidos por CAMBROLLÉ et al. (2011; 2012; 2013), altas concentrações de cobre diminuíram o rendimento e eficiência do FSII como consequência da fotoinibição induzida pelo estresse luminoso em papoila das praias (*Glaucium flavum*), gramata-branca (*Halimione portulacoides*) e sapeira (*Limoniastrum monopetalum*).

A cultura da batata-doce [*Ipomea batatas* (L.) Lam.] é de grande importância econômica em países em desenvolvimento, pois além de fornecer nutrientes essenciais, apresenta características como: facilidade de cultivo, biomassa elevada, resistência à seca e baixo custo de produção (LOW et al., 2007). Adicional a estas características, a batata-doce tem sido utilizada como planta modelo em trabalhos na área da nutrição de plantas e metabolismo vegetal devido a sua ótima propagação e sua grande capacidade de crescimento em curto período de tempo (ADAMSKI et al., 2011; 2012).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de cobre em solução nutritiva sobre a fluorescência transiente e modulada da clorofila *a* em plantas de batata-doce.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e condições de cultivo

As plantas de batata-doce utilizadas no trabalho foram obtidas de ramos apicais, com aproximadamente oito cm de comprimento e quatro folhas por ramo, de plantas estabelecidas em casa-de-vegetação e enraizadas em água destilada por cinco dias. Após o enraizamento, as plantas foram colocadas em um sistema hidropônico de raiz flutuante de fluxo contínuo e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1938) por seis dias. Posteriormente, as mesmas foram cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de cobre: 0,041; 0,082; 0,123 e 0,164 mM, na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), por nove dias. As doses foram definidas após ensaios preliminares que mostraram que a cultivo em concentrações menores das citadas acima não causaram alterações nos parâmetros de crescimento, sendo estabelecida como controle a concentração de 0,041 mM de cobre. A cada três dias, as soluções foram renovadas e o pH ajustado para $\pm 5,8$. Após nove dias de exposição aos tratamentos foram realizadas as avaliações da fluorescência transiente e modulada da clorofila a.

Fluorescência transiente da clorofila

A fluorescência transiente da clorofila a foi medida em folhas intactas e completamente expandidas do segundo nó a partir do ápice (20-25 folhas/tratamento), com o uso de um fluorômetro portátil Handy-Pea (Hansatech, King's Lynn, Norkfolk, UK), com ganho de 0,5. As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos, e a seguir emitido um flash de luz saturante (aproximadamente $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As intensidades de fluorescência foram medidas por um período de um segundo. A partir das intensidades da fluorescência a 50 (fluorescência mínima – F_0), 100, 300 μs , 2 ms (F_J), 30 ms (F_I) e F_M (fluorescência máxima), foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995).

Fluorescência modulada

A fluorescência modulada da clorofila a foi medida com a utilização do fluorômetro Dual-PAM-100 (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Para tanto, folhas não destacadas foram expostas por um período de 2 minutos a fluxo de fótons crescente (variando de 0 a $531 \mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Após a exposição a cada densidade de

fluxo de fótons, foram determinadas as seguintes intensidades: F'_0 (fluorescência inicial no estado adaptado a luz), F_M (fluorescência máxima em estado adaptado no escuro), F'_M (fluorescência máxima no estado adaptado a luz obtida após a aplicação de um pulso de luz saturante) e F_S (intensidade de fluorescência no equilíbrio – “steady-state”). A partir desses parâmetros foram calculados: o rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII [$\phi_{PSII} = (F'_0 - F_S)/F'_M$], o coeficiente de extinção fotoquímico [$qP = (F'_M - F_M)/(F'_M - F'_0)$] (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989), o coeficiente de extinção não-fotoquímico [$qN = (F_M - F'_M)/(F_M - F'_0)$] (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989) e a extinção não-fotoquímica [$NPQ = (F_M - F'_M)/F'_M$] (BILGER; BJORKMAN, 1990; DEMMIG-ADAMS, 1990). A taxa aparente de transporte de elétrons do FSII [ETR(II)] foi calculada por $0,5 \times I \times \phi_{PSII}$, onde 0,5 é a proporção de energia que atinge o FSII e I é a irradiância absorvida pela folha, sendo considerada 0,84, ou seja, 84% da intensidade luminosa (BAKER, 2008).

1.3 RESULTADOS

Fluorescência transiente da clorofila a: Normalizações e subtrações de transientes

A intensidade da fluorescência transiente em folhas cultivadas com diferentes concentrações de cobre apresentaram curvas polifásicas típicas (Figura 1A e 1B). As plantas cultivadas nas maiores doses de cobre (0,123 e 0,164 mM) apresentaram diminuição na fluorescência do passo F_J (2 ms) até F_M (1 s), principalmente na concentração de 0,164 mM.

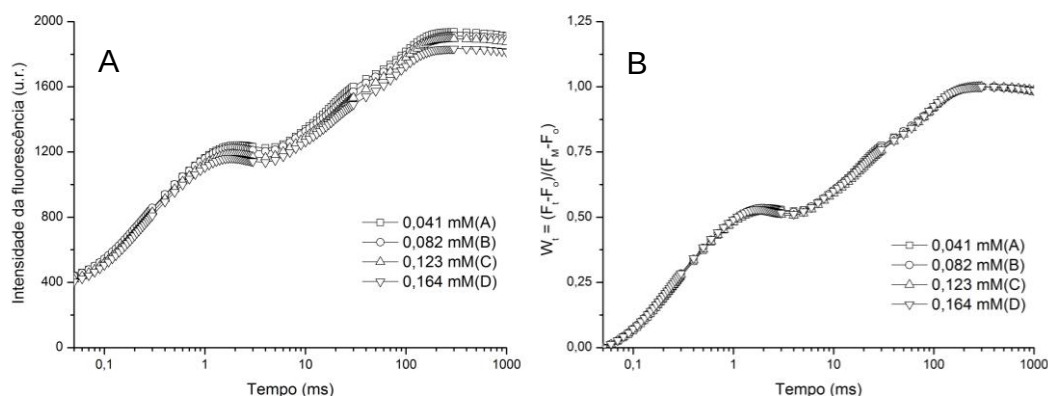


Figura 1. Fluorescência transiente da clorofila a em folhas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) adaptadas ao escuro e cultivadas com diferentes doses de cobre: (A) Intensidade de fluorescência (F_t); (B) Fluorescência variável relativa [$W_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$].

Para possibilitar a possível identificação da banda-L (aproximadamente 150 μ s), a fluorescência relativa variável foi normalizada entre os pontos 0 (50 μ s) e K (300 μ s) ($W_{OK} = [F_t - F_0]/[F_K - F_0]$) (Figura 2A) e a diferença cinética foi mostrada através da equação ($\Delta W_{OK} = [W_{OK(\text{tratamento})} - W_{OK(\text{controle})}]$) (Figura 2B). O aparecimento da banda-L positiva indica baixa conectividade energética (ou agrupamento) entre as unidades do FSII (STRASSER; STIRBET, 1998; YUSUF et al., 2010). No presente trabalho foi possível identificar a banda-L positiva, em todos os tratamentos porém com menor amplitude em 0,164 mM (Figura 2B).

A banda-K (aproximadamente 300 μ s) foi visualizada quando realizada a normalização da fluorescência variável nos passos 0 (50 μ s) e J (2 ms), $W_{OJ} = [F_t - F_0]/[F_J - F_0]$ (Figura 2C) e a diferença cinética ($\Delta W_{OJ} = [W_{OJ(\text{tratamento})} - W_{OJ(\text{controle})}]$) (Figura 2D). Assim foi possível identificar uma banda-K positiva em todas as concentrações estudadas. A banda-K positiva reflete na inativação do complexo de evolução de oxigênio (CEO) e/ou no aumento do tamanho funcional da antena no FS II (YUSUF et al., 2010).

Para avaliar o efeito da variação da concentração de cobre sobre a fase IP (30 a 300 ms) da fluorescência transiente, optou-se por utilizar as normalizações propostas por Yusuf et al. (2010), as quais estão representadas nas Figuras 2E e 2F. A curva da fluorescência variável relativa entre os passos 0 (50 μ s) e I (30 ms) ($W_{OI} = [F_t - F_0]/[F_I - F_0]$) quando $W_{OI} \geq 1$ (em escala linear de 30 a 300 ms) reflete o tamanho do pool dos aceptores finais de elétrons no lado acceptor do FSI (Figura 2E) (YUSUF et al., 2010). As concentrações mais altas (0,123 e 0,164 mM) proporcionaram aumento no pool de aceptores quando comparadas as demais. Contudo, a normalização da fluorescência na fase IP ($W_{IP} = [F_t - F_I]/[F_M - F_I]$), não identificou diferenças nas taxas globais de redução dos aceptores finais de elétrons (Figura 2F).

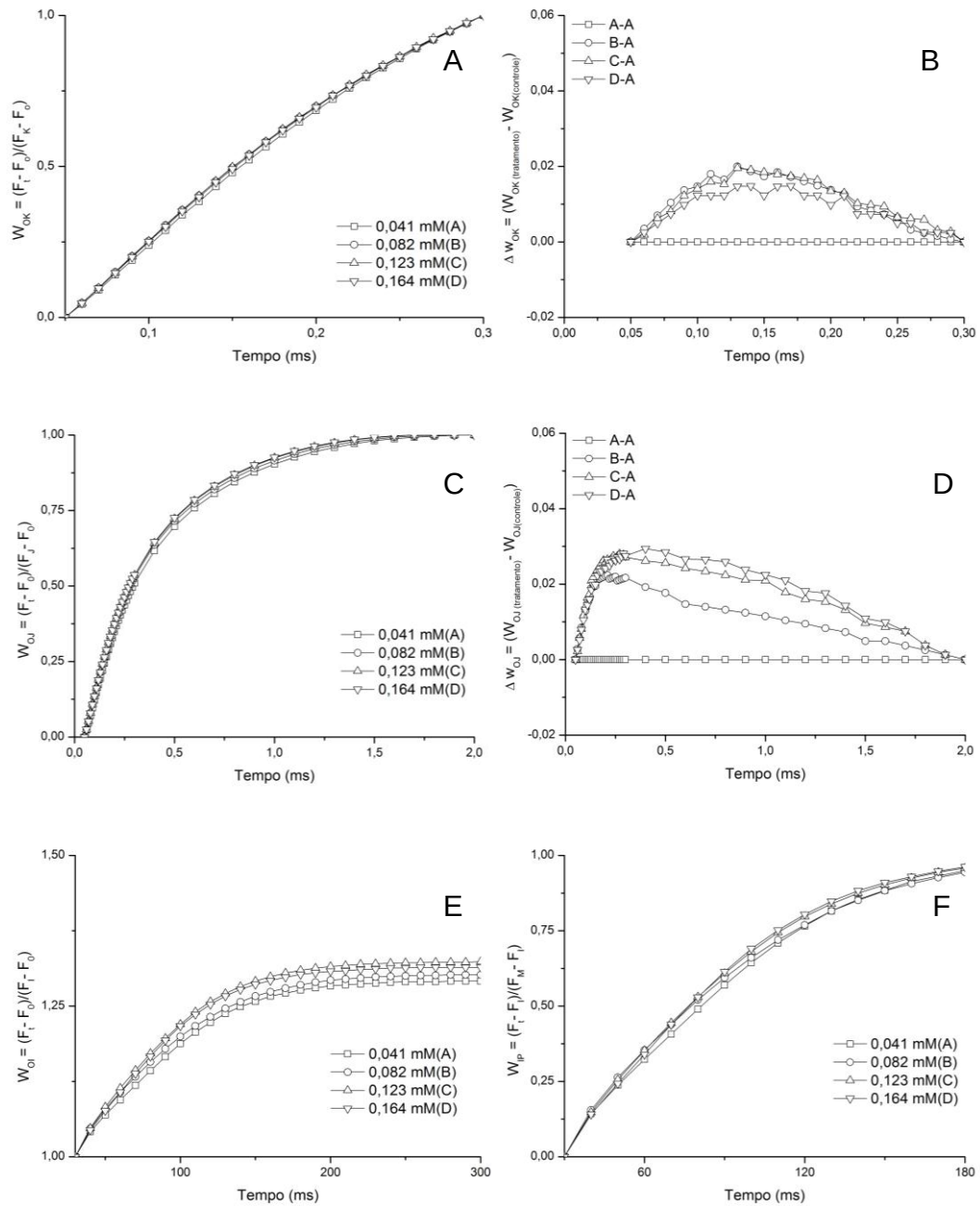


Figura 2. Fluorescência transiente da clorofila *a* em folhas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) adaptadas ao escuro e cultivadas com diferentes doses de cobre: (A) Fluorescência variável entre os pontos O e K [$W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$]; (B) Diferença cinética de W_{OK} , $\Delta W_{OK} = [W_{OK(tratamento)} - W_{OK(controle)}]$; (C) Fluorescência variável entre os pontos O e J [$W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$]; (D) Diferença cinética de W_{OJ} , $\Delta W_{OJ} = [W_{OJ(tratamento)} - W_{OJ(controle)}]$; (E) Fluorescência variável entre os pontos O e I [$W_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$] no intervalo de tempo de 30 a 330ms; (F) Fluorescência variável entre os pontos I e P [$W_{IP} = (F_t - F_i)/(F_M - F_i)$] no intervalo de tempo de 30 a 180 ms.

Fluorescência transiente da clorofila: Parâmetros derivados das equações do Test-JIP (OJIP)

Os parâmetros estruturais e funcionais, deduzidos dos transientes OJIP, pelo Teste JIP, estão representados em forma de radar (Figura 3), onde todos os valores foram normalizados para aqueles obtidos nas plantas cultivadas com 0,041 mM de cobre (controle).

As maiores doses de cobre utilizadas (0,082; 0,123 e 0,164 mM) não alteraram o fluxo de energia absorvido (ABS/RC), capturado (TR₀/RC), transportado (ET₀/RC) e dissipado (DI₀/RC) por centros de reação ativos do FSII quando comparados ao controle (0,041 mM). Contudo, houve aumento de aproximadamente 16% no fluxo de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI (RE₀/RC) por centro de reação nas plantas cultivadas nas maiores doses de cobre (0,082; 0,123 e 0,164 mM).

Os tratamentos com diferentes doses de cobre não alteraram os parâmetros que expressam o rendimento quântico máximo fotoquímico ($\phi_{P_0} = TR_0/ABS$) e o rendimento quântico do transporte de elétrons de Q_A⁻ para os aceptores de elétrons do intersistema ($\phi_{E_0} = ET_0/ABS$). Porém, houve aumento no rendimento quântico de redução do aceptor final de elétrons do FSI por fóton absorvido ($\phi_{R_0} = RE_0/ABS$) em plantas cultivadas com elevadas doses de cobre (0,082; 0,123 e 0,164 mM), acompanhando os resultados obtidos em RE₀/RC.

Para os parâmetros que descrevem a eficiência com que um éxciton capturado no centro de reação pode mover um elétron de Q_A⁻ para o intersistema de aceptores de elétrons ($\psi_{E_0} = ET_0/TR_0$) e a eficiência com que um elétron do intersistema de carregadores de elétrons move-se para reduzir os aceptores finais de elétrons do FSI ou probabilidade de redução de um aceptor final do FSI ($\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$) não foram constatadas diferenças com o incremento da dose de cobre.

O índice de performance fotossintético relativo a absorção (PI_{ABS}) (proposto por STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004) não foi afetado pelas doses de cobre. No entanto, o índice de performance fotossintético total (PI_{total}), que mede a performance do fluxo de elétrons até os aceptores finais de elétrons do FSI (TSIMILLI-MICHAEL; STRASSER, 2008), foi alterado pelas elevadas doses de cobre. Em relação a esse parâmetro, as plantas cultivadas na dose de 0,082 mM não apresentaram diferença do controle; já as plantas que tiveram maior disponibilidade de cobre (0,123 e 0,164 mM) apresentaram acréscimo de 15% no

valor de PI_{total} .

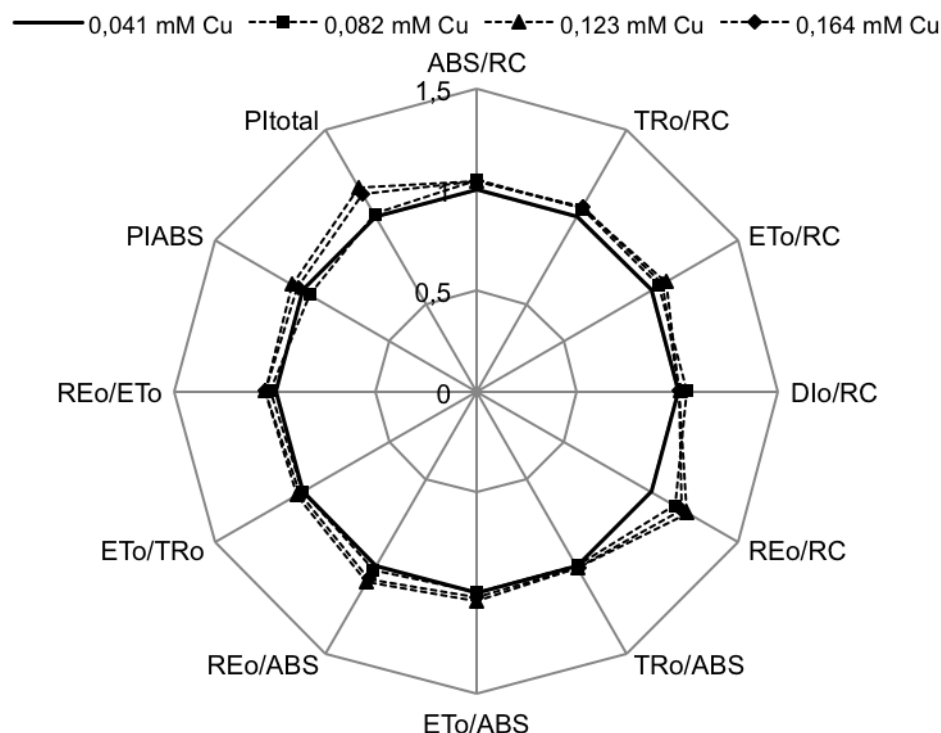


Figura 3. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* obtidos por meio do Teste JIP em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes doses de cobre: 0,041; 0,082; 0,123 e 0,164mM.

Fluorescência modulada

O rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII (ϕ_{PSII}) e o coeficiente de extinção fotoquímico (qP) (Figura 4A e 4B), diminuíram a partir de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em todos os tratamentos com cobre, sendo que para as plantas tratadas com 0,164 mM de cobre os valores de ϕ_{PSII} , a partir desta intensidade luminosa, foram menores do que as demais doses.

Os parâmetros que avaliam a extinção não-fotoquímica (NPQ) e o coeficiente de extinção não-fotoquímico (qN) (Figura 4C e 4D) foram fortemente influenciados pelo aumento da intensidade luminosa a partir de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, na qual plantas cultivadas com 0,082 e 0,123 mM de cobre apresentaram maior NPQ e qN do que plantas controle. Nos dois casos, plantas cultivadas na dose de 0,164 mM apresentaram resposta intermediária.

As doses de cobre promoveram aumento na taxa aparente de transporte de elétrons no FSII [$ETR(II)$] até $53 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, no entanto, a partir dessa intensidade foram observadas respostas diferenciadas nas doses de metal utilizadas (Figura 5). As plantas cultivadas na dose controle apresentaram

maior ETR(II), seguido pelas doses intermediárias (0,082 e 0,123 mM) e, o menor valor de ETR(II), foi observado na dose de 0,164 mM.

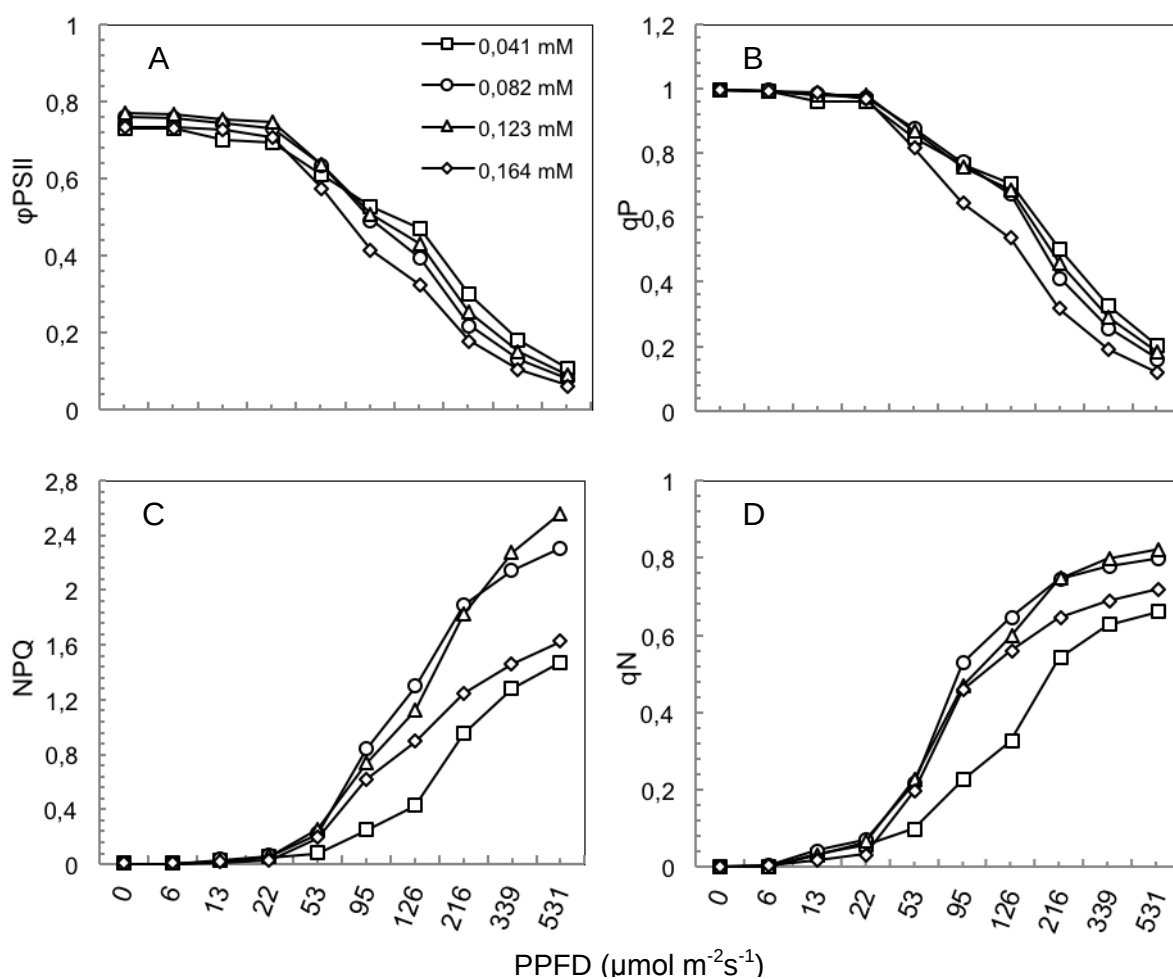


Figura 4. Curvas de respostas a intensidade luminosa em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes doses de cobre: (A) Rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII (ϕ_{PSII}); (B) Coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência variável da fotossíntese (q_P); (C) Extinção não-fotoquímica (NPQ); (D) Coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência variável da fotossíntese (q_N). PPFD = densidade de fluxo fotossinteticamente ativo ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

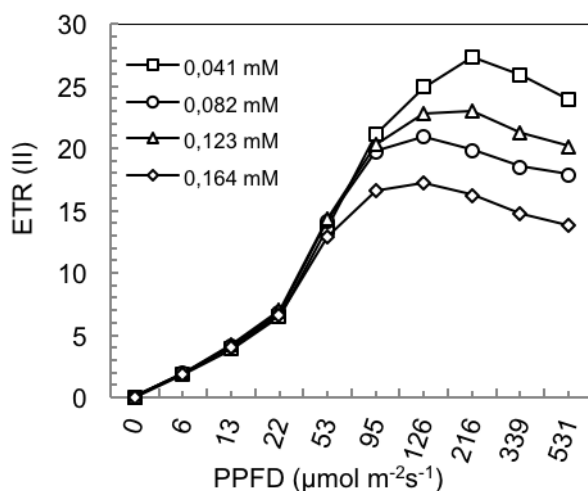


Figura 5. Variação da taxa de transferência de elétrons no FSII, ETR (II) em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes doses de cobre: 0,041; 0,082; 0,123 e 0,164 mM. PPFD = densidade de fluxo fotossinteticamente ativo ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

1.4 DISCUSSÃO

O excesso de cobre pode induzir efeitos tóxicos nas plantas, tais como inibição do crescimento, danos no aparato fotossintético e geração de estresse oxidativo (SHI-SHENG, 2007; CAMBROLLÉ et al., 2013). Muitos pesquisadores estão desenvolvendo experimentos em relação aos efeitos do cobre nos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas e muitos estudos vêm sendo realizados em torno da cadeia de transporte fotossintético das mesmas (CAMBROLLÉ et al., 2011), porém poucos têm analisado sobre as respostas fotossintéticas detalhadas frente ao aumento de cobre.

A fluorescência transiente das plantas em estudo, para todos os tratamentos com cobre, exibiram curvas polifásicas típicas OJIP, indicando que as unidades fotossintéticas estavam ativas mesmo sob altas doses de cobre. Para os tratamentos com as maiores doses (0,123 e 0,164 mM), houve diminuição da fluorescência a partir do passo J (2 ms) até F_M (1 s) (Figura 1A). A diminuição da fluorescência nesses níveis são normalmente justificados pela inibição do transporte de elétrons no lado doador do FSII, resultando na acumulação de $P680^+$ (PERALES-VELA et al., 2007; OUKARROUM et al., 2012).

A análise das curvas da cinética da fluorescência transiente (Figuras 2B e 2D) permite a identificação do aparecimento da banda-L e banda-K. Segundo Strasser et

al. (2004), o aparecimento dessas bandas positivas indicam efeitos deletérios nas plantas. As bandas-L positiva em folhas de plantas de batata-doce cultivadas com as três maiores doses indicam que as unidades do FSII estavam menos agrupadas, sugerindo baixa conectividade entre as unidades antena do FSII (STRASSER et al., 2004). A diminuição da conectividade energética é um mecanismo de proteção parcial onde há necessidade de aumentar a dissipação para melhorar a utilização da energia de excitação da clorofila em processos não fotoquímicos (REDILLAS et al., 2011). Além disso, a habilidade de resistir a diminuição da conectividade poderia representar uma medida da capacidade de suportar alterações no empilhamento ou desempilhamento das membranas dos tilacóides (OUKARROUM et al., 2007).

As bandas-K positivas indicam danos no complexo de evolução de oxigênio (OEC) ou aumento do tamanho funcional da antena do FSII (YUSUF et al., 2010) (Figura 2D). Neste estudo, a formação das bandas-K e -L em plantas cultivadas na presença de cobre (0,082; 0,123 e 0,164 mM) está, provavelmente, relacionada a danos no OEC no FSII. Essa resposta pode ser justificada pelo acúmulo de $P680^+$ (Figura 1A). Resultados semelhantes foram encontradas em deficiência por magnésio em espécies de *Citrus* (YANG et al., 2012) e excesso de ferro em batata-doce (ADAMSKI et al., 2011), no entanto, em experimentos com excesso de cobre em *Alternanthera tenella*, não houve o aparecimento de banda-L e banda-K (CUCHIARA et al., 2013).

Apesar disso, por meio dos resultados da fluorescência da clorofila *a* em estado adaptado a luz, o aumento na disponibilidade de cobre não provocou diminuição no rendimento do FSII, como observado nos resultados obtidos de ϕ_{PSII} e qP (Figura 4A e 4B). As folhas cultivadas com altas doses de cobre apresentaram redução típica na distribuição de energia no FSII (ϕ_{PSII}) e na dissipação da energia em processos fotoquímicos (qP) com o aumento da intensidade luminosa (Figura 4A e 4B), sendo a maior redução observada na dose de 0,164 mM de cobre (ROHÁČEK; BARTAK, 1999; MAXWELL; JOHNSON, 2000).

A redução nos parâmetros ϕ_{PSII} e qP refletem no aumento da extinção não fotoquímica (NPQ) e no coeficiente de extinção não-fotoquímica (qN), sendo que ambos descrevem a dissipação do excesso de energia na forma de calor nos complexos antena do FSII (ROHÁČEK; BARTÁK, 1999). Como formas de dissipação da energia absorvida estão: i) as mudanças no gradiente de ΔpH , ii) desconexão dos complexos móveis captadores de luz, iii) formação de violaxantina a

zeaxantina e iv) protonação de PsbS (subunidade integral da membrana de FSII) (ROHÁČEK; BARTÁK, 1999; BAKER, 2008) (Figura 4C e 4D). A maior capacidade de NPQ e qN em plantas cultivadas com 0,082 e 0,123 mM de cobre sugere maior capacidade de dissipação de energia na forma de calor, como estratégia de proteção a fotoinibição do FSII em relação ao controle. Enquanto que plantas cultivadas com 0,164 mM de cobre apresentaram maior transferência de energia para outros sistemas.

No entanto, as doses de cobre intensificaram a eficiência do FSI como observado nos dados da fluorescência transiente da clorofila *a*. A análise da fase IP (Figuras 2E e 2F) revelou aumento no pool de aceptores finais de elétrons no lado acceptor do FSI ($W_{OI} \geq 1$) com o aumento da disponibilidade de cobre (0,123 e 0,164 mM). As maiores doses de cobre influenciaram de forma positiva na estrutura e na funcionalidade do FSI devido ao aumento no fluxo (RE_0/RC) e no rendimento (RE_0/ABS) de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI. Além disso, também houve aumento do índice de performance fotossintético, $PI_{total} = PI_{ABS} \cdot \delta_{Ro}/(1 - \delta_{Ro})$, que incorpora o desempenho máximo para o transporte de elétrons da água para a plastoquinona (PQ) e plastocianina (PC) por clorofila (PI_{ABS}) e a performance de redução do acceptor final do FSI (STRASSER et al., 2010).

Com base na análise conjunta dos resultados da fluorescência da clorofila *a* em estado adaptado ao escuro e a luz, pode-se inferir que as doses de cobre tiveram pouco efeito na estrutura e funcionalidade do FSII visto que não houve alterações nos parâmetros do Teste JIP. Nessas condições, houve apenas redução da taxa aparente de transporte de elétrons no FSII [$ETR(II)$] com o aumento da intensidade luminosa (Figura 5). Adicional a isso, as plantas tratadas com 0,082 e 0,123 mM de cobre apresentaram capacidade de dissipar o excesso de energia luminosa no FSII e proteger as unidades do mesmo através de NPQ e qN (MUNEKAGE; SHIKANAI, 2005). A ativação de NPQ e qN é dependente da geração de um gradiente de prótons através da membrana de tilacóide (ΔpH) induzido pelos fluxos de elétrons, linear e cíclico (HUANG et al., 2012). Vias de transporte de elétrons alternativos, transporte cíclico de elétrons no FSI e ciclo água-água, podem regular a indução da dissipação térmica modificando a taxa de geração de ΔpH (MUNEKAGE; SHIKANAI, 2005). Contudo, a eficiência do FSI foi intensificada nas plantas que crescidas nas doses de 0,123 e 0,164 mM de cobre, visto pelos valores de $W_{OI} \geq 1$, RE_0/RC , RE_0/ABS e PI_{total} . Esses resultados sugerem que, nas

condições utilizadas, houve transporte cíclico de elétrons no FSI. Nesse caso, os elétrons retornaram a partir da ferredoxina a plastoquinona, com produção de ATP e sem acumulação de NADPH (MUNEKAGE; SHIKANAI, 2005). Resultados semelhantes aos presentes nesse trabalho foram verificados em estudos com déficit hídrico (HUANG et al., 2012), sugerindo que plantas cultivadas com a dose de 0,123 mM de cobre simularam situações relacionadas a seca e desenvolveram estratégias para evitar a fotoinibição do aparato fotossintético provocada pela absorção de energia luminosa.

1.5 CONCLUSÃO

As altas doses de cobre na solução nutritiva alteram a fluorescência transiente e modulada da clorofila *a*, reduzem a atividade fotoquímica e aumentam a dissipação de energia luminosa do FSII e incrementam a eficiência do FSI de plantas de batata-doce.

1.6 REFERÊNCIAS

ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2056-2062, 2011.

ADAMSKI, J. M.; DANIELOSKI, R.; DEUNER, S.; BRAGA, E. J. B.; CASTRO, L. A. S.; PETERS, J. A. Responses to excess iron in sweet potato: impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1827-1836, 2012.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89–113, 2008.

BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, v. 25, p. 173–185, 1990.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; FIGUEROA-LUQUE, E.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M.E. Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monopetalum*. **Environmental Science and Pollution Research**. 2013. DOI 10.1007/s11356-013-1833-4

CAMBROLLÉ, J.; MATEOS-NARANJO, E.; REDONDO-GÓMEZ, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy *Glaucium flavum* Crantz. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 57-64, 2011.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J.M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M.E. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 721–728, 2012.

CUCHIARA, C.C.; SILVA, I.M.C.; MARTINAZZO, E.G.; BRAGA, E.J.B.; BACARIN, M.A.; PETERS, J.A. Chlorophyll Fluorescence Transient Analysis in *Alternanthera tenella* Colla Plants Grown in Nutrient Solution with Different Concentrations of Copper. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 8, 2013.

DEMMIG-ADAMS, B. Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 1020, p. 1–24, 1990.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, p. 87–9, 1989.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California College of Agriculture, Agricultural Experimental Station, 1938. 39p.

HUANG, W.; YANG, S.; ZHANG, S.; ZHANG, J.; CAO, K. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection for the resurrection plant *Paraboea rufescens* under drought stress. **Planta**, v. 235, p. 819–828, 2012.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3 ed. Flórida: CRC Press, 2001. 315 p.

MATEOS-NARANJO, E.; REDONDO-GÓMEZ, S.; CAMBROLLÉ, J.; FIGUEROA, M.E. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 459–465, 2008.

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

MUNEKAGE, Y.; SHINAKAI, T. Cyclic electron transport through photosystem I. **Plant Biotechnology**, v. 22, p. 361–69, 2005.

LOW, J. W.; ARIMOND, M.; OSMAN, N.; CUNGUARA, B.; ZANO, F.; TSCHIRLEY, D. A food-based approach introducing orange-fleshed sweet potatoes increased vitamin A intake and serum retinol concentrations in young children in rural Mozambique. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1320–1327, 2007.

OUKARROUM, A.; MADIDI, S.E.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 60, p. 438–446, 2007.

OUKARROUM, A.; PERREAULT, F.; POPOVIC, R. Interactive effects of temperature

and copper on photosystem II photochemistry in *Chlorella vulgaris*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 110, p. 9–14, 2012.

PERALES-VELA, H.V.; GONZÁLEZ-MORENO, S.; MONTES-HORCASITAS, C.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedes musincrassatulus* (Chlorophyceae). **Chemosphere**, v. 67, p. 2274–2281, 2007.

REDILLAS, M. C. F. R.; STRASSER, R. J.; JEONG, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, J. K. The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. **Plant Biotechnology Report**, v. 5, p. 169-175, 2011.

ROHÁČEK, K.; BARTÁK, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basics concepts, useful parameters, and some applications. **Photosynthetica**, v.37, p.339- 363, 1999.

SCHREIBER, U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**. The Netherlands: Springer, 2004. P. 279–319.

SHI-SHENG, K. Effects of Copper on the Photosynthesis and Oxidative Metabolism of *Amaranthus tricolor* Seedlings. **Agricultural Sciences in China**, v.6, n.10, p.1182-1192, 2007.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 61, p. 32–42, 1995.

STRASSER, R.J.; STIRBET, A.D. Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P). **Mathematics and Computers Simulation**, v. 48, p. 3–9, 1998.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE. (Ed.). **Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series**. Dordrecht: Springer, 2004, p. 321-362.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1313–1326, 2010.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. In vivo assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of mycorrhization on host plants. In: VARMA, A. (Ed.). **Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 679–703.

YANG, G., YANG, L., JIANG, Y. L., LI, Y., WANG, P.; CHEN, L. Physiological

impacts of magnesium-deficiency in Citrus seedlings: photosynthesis, antioxidant system and carbohydrates. **Trees – Structure and Function**, v. 26, n. 4, p. 1237-1250, 2012.

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

XIA, J.; TIAN, Q. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa*—OJIP chlorophyll a fluorescence analysis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 1569–1574, 2009.

CAPÍTULO 2

Respostas fisiológicas em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) frente a exposição a diferentes concentrações de cobre

Physiological responses in sweet potato plants (*Ipomea batatas* L.) against exposure to different copper concentrations

RESUMO

O cobre (Cu), em baixas concentrações, é considerado micronutriente essencial para as plantas por ser constituinte e ativador de diversas enzimas. Porém, quando em excesso, pode afetar negativamente o crescimento e o metabolismo vegetal. Com base no exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas em plantas de batata-doce submetidas a diferentes concentrações de Cu através dos parâmetros morfológicos, metabolismo antioxidante, perfil mineral e características estomáticas. Para tanto, as mesmas foram colocadas em sistema hidropônico e cultivadas com solução nutritiva completa por seis dias. Após este período foram transferidas para solução com diferentes concentrações de Cu: 0,041 (controle); 0,082 e 0,164 mM, por nove dias, sendo então avaliadas. O principal efeito do aumento da disponibilidade de Cu foi nas raízes pelo acúmulo do mesmo nesse órgão. As plantas de batata-doce cultivadas na concentração de 0,082 mM de Cu apresentaram aumento da atividade das enzimas antioxidantes e nenhuma alteração na taxa de crescimento. Na concentração de 0,164 mM, o Cu foi transportado das raízes para tecidos aéreos. Essa concentração alterou características morfo-anatômicas e ativou o sistema antioxidante como forma de proteção ao estresse gerado pelo excesso de Cu.

Palavras-chave: Micronutriente. Metabolismo antioxidante. Perfil mineral. Sulfato de cobre. Estresse.

ABSTRACT

The copper (Cu) is considered an micronutrient at low concentrations, and it is essential for plants for being constitutive and activator of several enzymes. However, when in excess it can affect negatively the plant growth and the metabolism. Therefore, the aim of this study was to evaluate the physiological responses in sweet potato plants under different concentrations of Cu through morphological parameters, antioxidant metabolism, stomatal characteristics, and mineral profile. To this end, they were placed and grown hydroponically with nutrient solution for six days. After this period, the plants were transferred to solution with different Cu concentrations: 0.041 (control), 0.082 and 0.164 mM for nine days for evaluation. The main effect of increasing the availability of Cu in the roots was its accumulation in this organ. The sweet potato plants cultivated in 0.082 mM Cu concentration showed decreased increased activity of antioxidant enzymes, and no change in growth rate. The Cu in 0.164 mM concentration was transported from roots to aerial tissues. This concentration altered the morpho-anatomical characteristics, and activated the antioxidant system as a protection due to the stress generated by Cu excess.

Keywords: Micronutrient. Antioxidant metabolism. Mineral content. Copper sulphate. Stress.

2.1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados ocorrem naturalmente no ambiente, no entanto, suas concentrações são frequentemente elevadas como resultado de diferentes processos antropogênicos, tais como mineração, fundição, aplicação de pesticidas e fertilizantes inorgânicos e emissões atmosféricas. A contaminação ambiental por metais tem se tornado um sério problema para as plantas, animais, vida aquática e seres humanos (HARICHOVÁ et al., 2012). Dentre os diferentes metais tóxicos presentes no ambiente, o cobre (Cu) é o contaminante mais importante e estudado nos últimos anos (CAMBROLLÉ et al., 2013).

O Cu, em baixas concentrações, é considerado micronutriente essencial e indispensável para as plantas por ser constituinte e ativador de diversas enzimas (BURKHEAD et al., 2009). No entanto, quando em excesso, pode afetar negativamente o crescimento e o metabolismo vegetal (FIDALGO et al., 2013). Os limites de concentrações de Cu nos tecidos variam entre as espécies e afetam de forma diferenciada em função das necessidades metabólicas (BURKHEAD et al., 2009).

O estresse abiótico afeta diretamente a fotossíntese (SILVA et al., 2010). Plantas submetidas ao excesso de Cu podem apresentar redução do transporte de elétrons, bem como, inibição das enzimas do Ciclo de Calvin-Benson ou da taxa de assimilação de CO₂ (BURZYNSKI; ZUREK, 2007). Além dos danos no aparato fotossintético, altas concentrações de Cu tem sido relacionado a alterações no conteúdo de pigmentos e na estrutura de cloroplastos (SHI-SHENG, 2007).

Concentrações elevadas de Cu podem ser relacionadas com a geração de estresse oxidativo (SHI-SHENG, 2007), estando associado a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas reações redox do tipo Fenton, que conduzem à alterações nas vias metabólicas e danos a macromoléculas, resultando na redução do crescimento e desenvolvimento das plantas (FIDALGO et al., 2013). As EROS

são geradas, de forma controlada, como produto do metabolismo fotossintético e respiratório, atuando como moléculas sinalizadoras na via de transdução de sinal redox (SILVA et al., 2010). As plantas são capazes de evitar distúrbios homeostáticos e danos celulares, produzidos pelo aumento na geração de EROS, por meio da indução da atividade das enzimas antioxidantes, como resposta aos efeitos tóxicos causados pelos metais pesados (BOOJAR; GOODARZI, 2007).

Alterações anatômicas também podem estar associadas à características que atribuem tolerância a diferentes condições ambientais, como seca, alagamento e estresse por metais, como o Cu (PANOU-FILOTHEOU; BOSABALIDIS; KARATAGLIS, 2001; RIBEIRO et al., 2012), promovendo modificações, principalmente, nas características estomáticas. Os estômatos são estruturas sensíveis e importantes para o crescimento e desenvolvimento, pois têm papel preponderante ao regular simultaneamente o fluxo transpiratório para a atmosfera e o fluxo de CO₂ para o interior da folha (SILVA; ALQUINI; CAVALLET, 2005). Essas estruturas podem variar em forma, tamanho e quantidade em função de fatores abióticos, acarretando variações nas condições fotossintéticas (ADAMSKI et al., 2012).

Desta forma, as plantas que crescem em ambientes com altas concentrações de Cu podem desenvolver mecanismos de defesa contra a toxicidade. A tolerância e o grau de adaptação das plantas é altamente variável, onde a eficiência e a capacidade dos mecanismos de desintoxicação desempenham papel importante (BOOJAR; GOODARZI, 2007). Além disso, diferentes vias de sequestro e imobilização regulam a absorção, distribuição e a desintoxicação de íons metálicos nas plantas (JANAS et al., 2010).

A batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.)] é uma hortaliça que se destaca pela facilidade de cultivo, rusticidade, ampla adaptação a diferentes tipos de solo e clima, alta tolerância à seca, biomassa elevada e baixo custo de produção (LOW et al., 2007; ANDRADE JÚNIOR et al., 2012). Além disso, a batata-doce tem sido utilizada como planta modelo em trabalhos na área da nutrição de plantas e metabolismo vegetal devido a sua ótima propagação e sua grande capacidade de crescimento em curto período de tempo (ADAMSKI et al., 2011; 2012).

Com base no exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas em plantas de batata-doce submetidas a diferentes concentrações de Cu através dos parâmetros morfológicos, metabolismo antioxidante, perfil mineral e

características estomáticas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Para a realização do trabalho, mudas de batata-doce foram obtidas a partir de ramos apicais ($\pm$ oito cm de comprimento e quatro folhas por ramo) de plantas estabelecidas em casa-de-vegetação, as quais foram enraizadas em água por 5 dias. Posteriormente, as plantas foram transferidas para um sistema hidropônico de raiz flutuante de fluxo contínuo e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1938) por seis dias. Após esse período, as plantas foram submetidas a soluções nutritivas com diferentes concentrações de Cu: 0,041; 0,082 e 0,164 mM, na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), por mais nove dias. Os tratamentos foram definidos após ensaios preliminares que mostraram que o cultivo em concentrações menores a estas não causaram alterações nos parâmetros de crescimento, sendo então estabelecida como controle a concentração de 0,041 mM de Cu. As soluções foram renovadas a cada três dias e o pH das mesmas foram ajustados para $\pm 5,8$. Ao final do período de estresse, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto aos parâmetros morfológicos, metabolismo antioxidante, trocas gasosas, perfil mineral e características estomáticas.

Parâmetros morfológicos

Os parâmetros avaliados foram: comprimento de ramos, avaliado com auxílio de régua centimetrada (cm); número de folhas; massa fresca da parte aérea e do sistema radicular (mg); massa seca de parte aérea e do sistema radicular, obtida pela pesagem do material vegetal após secagem em estufa de ventilação forçada a 70°C até peso constante (mg) e área foliar, estimada utilizando-se de medidor de área foliar Li-Cor, modelo LI-3100 ($\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$).

Metabolismo antioxidante

Para a atividade das enzimas antioxidantes, ± 200 mg de matéria fresca (MF) de folhas e raízes foi macerado em N_2 , acrescido de 20% de PVPP (polivinilpolirridona) e homogenizado com 1,8 mL de meio de extração (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 20 mM). O homogenato foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos (4°C) e o sobrenadante

utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) no meio de reação (fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; metionina 14 mM; EDTA 0,1 μ M; NBT 75 μ M e riboflavina 2 μ M). Uma unidade da SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em U.mg proteína⁻¹.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato (ASA) a 290 nm. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM e extrato enzimático. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um minuto e meio e os resultados foram expressos em μ mol ASA min⁻¹ mg proteína⁻¹.

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998). O extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM) e a atividade da enzima foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante um minuto e meio. Os resultados foram expressos em μ mol H₂O₂ min⁻¹mg de proteína⁻¹.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica foram determinados em $\pm$ 300 mg de matéria fresca (MF) de folhas e raízes. Os tecidos foram macerados em N₂ acrescido de 20% de PVPP e 2 mL da solução de extração contendo ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 12.000 g, durante 20 minutos e o sobrenadante foi separado para análises seguintes.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malonodialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: [MDA] = (A535 – A600)/(ξ .b), em que: ξ (coeficiente de extinção = 1,56 x10⁻⁵ cm⁻¹); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em μ mol g⁻¹ MF.

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com Velikova et al. (2000). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm e a concentração de H_2O_2 foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Perfil mineral

As concentrações de macro (N, P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Cu, Zn, Fe e Mn) foram avaliadas a partir da massa seca de folhas e raízes conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Para observar o efeito das diferentes concentrações de Cu, os nutrientes foram quantificados em folhas já estabelecidas antes da aplicação dos tratamentos com Cu (denominada folhas velhas), folhas que se desenvolveram após a aplicação do Cu (denominada folhas novas) e raízes.

Análises anatômicas quantitativas

Para as avaliações estomáticas, foram coletadas folhas novas, completamente expandidas, do segundo ou terceiro nó, as quais foram fixadas em solução de Karnosky (RUZIN, 1999). Os cortes paradérmicos foram realizados manualmente no terço médio das folhas. Cada secção foi clarificada em solução de hipoclorito de sódio 5%, corada com solução de azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato 0,1 M (KRAUS; ARDUIM, 1997) e montadas em laminas com Glicerina 50%. Os cortes foram observados e capturados com câmera digital Sony, modelo Mpeg movie EX, 3.3 Megapixels acoplada ao microscópio óptico (modelo Axiostar Plus, Zeiss) e as imagens digitalizadas em aumento de 20x. Conforme Adamski et al. (2012), para o índice estomático (IE – percentual de estômatos em relação ao total de células epidérmicas) nas epidermes abaxial (Ab) e adaxial (Ad), foram observados dois campos de cinco plantas por tratamento e para o diâmetro polar (DP; comprimento das células-guarda) e equatorial (DE; largura das células-guarda) foram utilizadas cinco plantas por tratamento, sendo medidos cinco estômatos por planta. Para medir as dimensões dos estômatos foi utilizado o programa Zeiss-Axio Vision 3.1.

O cálculo do IE foi feito de acordo com a fórmula de Cutter (1986):

$$IE = \left[\frac{NE}{(CE + NE)} \right] \times 100, \text{ onde:}$$

IE = índice estomático;

NE = número de estômatos;

CE = número de células epidérmicas propriamente ditas.

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado constituído de três concentrações de cobre como níveis do fator tratamento (0,041; 0,082 e 0,164 mM) e três repetições (cinco plantas por repetição). Os resultados foram submetidos a análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

2.3 RESULTADOS

As plantas cultivadas com 0,041 e 0,082 mM de Cu não apresentaram diferença nos parâmetros de crescimento, porém, a exposição a 0,164 mM provocou drástica diminuição nos valores observados para estas variáveis ($p < 0,05$) (Figura 1). Quando comparados ao controle, houve redução de 246, 79 e 370% nos valores obtidos para o comprimento dos ramos ($p = 0,0002$), para o número de folhas ($p = 0,0005$) e para a área foliar ($p = 0,003$) das plantas cultivadas com 0,164 mM de Cu, respectivamente. Essa concentração de Cu, também proporcionou redução na massa fresca da parte aérea (MFPA; $p = 0,002$), sistema radicular (MFSR; $p = 0,01$), massa seca da parte aérea (MSPA; $p = 0,02$) e sistema radicular (MSSR; $p = 0,005$) alcançando valores de até 424, 118, 309 e 148% inferiores aos observados nas plantas cultivadas com a menor concentração de Cu.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e APX, nos tecidos foliares, não mostraram diferença significativa entre os tratamentos com concentrações variadas de Cu ($p > 0,05$) (Figura 2A e 2B). No entanto, na concentração de 0,164 mM, a atividade da enzima CAT aumentou 263% em relação as demais concentrações ($p = 0,005$) (Figura 2C).

Nos tecidos radiculares, a atividade de todas as enzimas antioxidantes avaliadas diferiram entre os tratamentos. A atividade da SOD aumentou 216% na concentração de 0,082 mM de Cu e 103% na concentração de 0,164 mM em relação a menor concentração, 0,041mM ($p = 0,0006$) (Figura 2A). A atividade da APX na concentração de 0,082 mM foi 150% maior em relação a menor concentração, enquanto que no cultivo com 0,164 mM de Cu ocorreu redução na atividade, alcançando valores iguais aos observados no tratamento com 0,041 mM ($p = 0,001$) (Figura 2B). A atividade da CAT, nas raízes cultivadas com 0,082 e 0,164 mM de

Cu, foi incrementada em 320% em relação a menor concentração utilizada ($p = 0,01$) (Figura 2C).

Quanto a quantidade de peróxido de hidrogênio e a formação de MDA (grau de peroxidação lipídica das membranas), tanto em folhas quanto em raízes, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

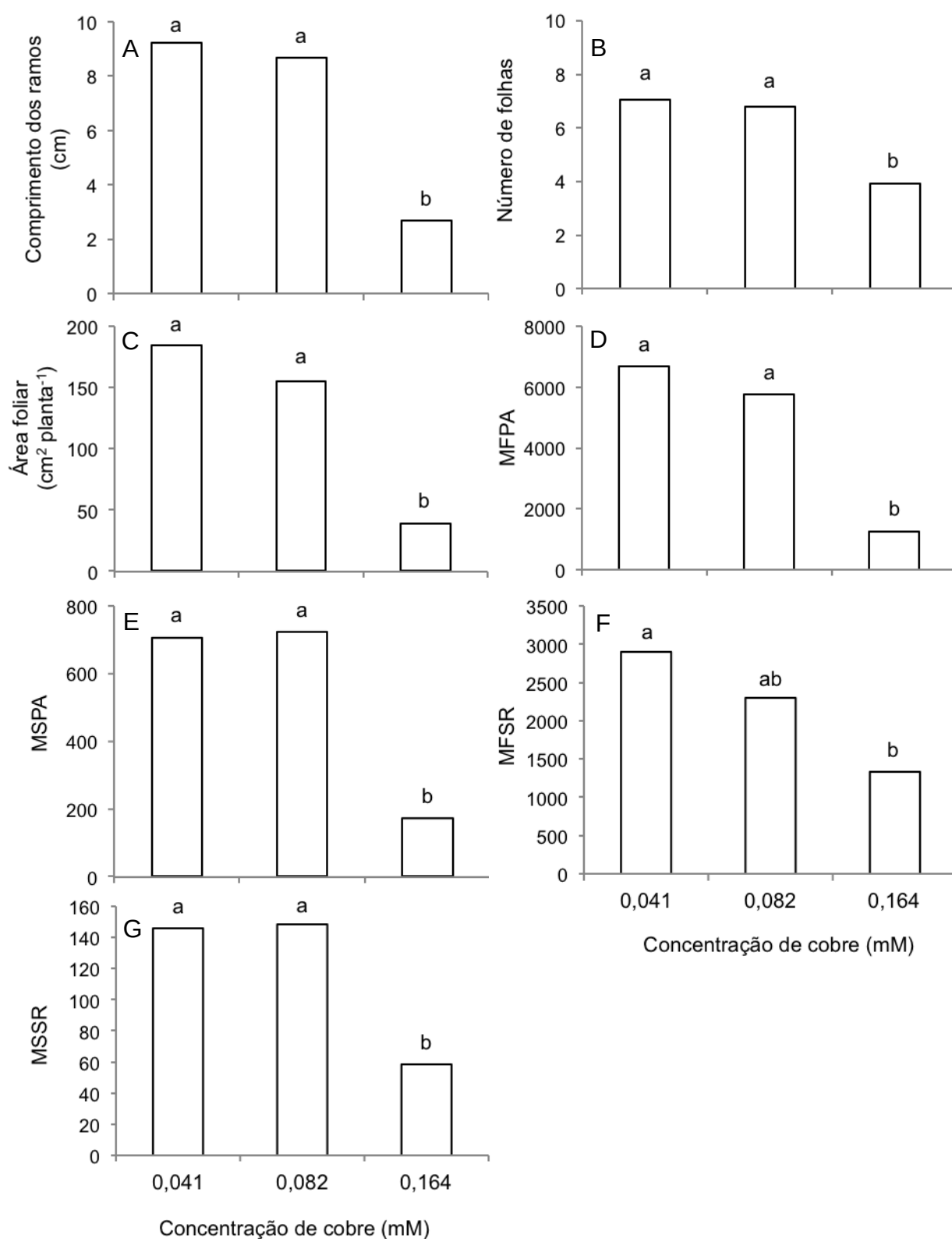


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de cobre (Cu) sobre os parâmetros morfológicos em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Comprimento dos ramos; (B) Número de folhas; (C) Área foliar; (D) Massa fresca da parte aérea (MFPA); (E) Massa seca da parte aérea (MSPA); (F) Massa fresca do sistema radicular (MFSR); (G) Massa seca do sistema radicular (MSSR). Médias seguidas da mesma letra, entre tratamentos, não diferem significativamente pelo teste F ($p < 0,05$).

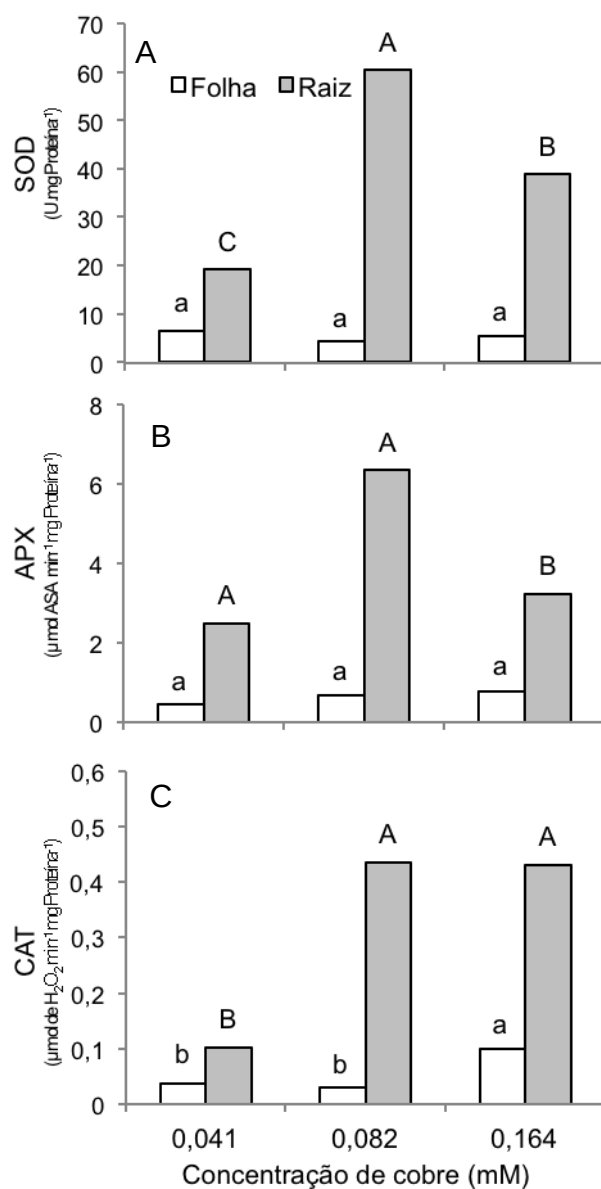


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de cobre (Cu) sobre o metabolismo antioxidante em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Superóxido dismutase (SOD); (B) Ascorbato peroxidase (APX); (C) Catalase (CAT). Médias seguidas de letras minúsculas iguais, nos tecidos foliares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nos tecidos radiculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Em relação às análises anatômicas nas folhas de batata-doce, não foram observadas alterações na epiderme adaxial ($p < 0,05$) (Tabela 1) pelas concentrações de Cu utilizadas. Entretanto, na epiderme abaxial, o índice estomático (IE) foi incrementado em 34% com o aumento da concentração de Cu ($p = 0,0003$). Em relação ao estudo do diâmetro polar e equatorial da epiderme abaxial, o aumento da concentração de Cu proporcionou diminuição do tamanho dos estômatos ($p > 0,05$), com redução em torno de 19% no diâmetro polar (DPPEAb; $p = 0,0002$) nas maiores concentrações e de 9% no diâmetro equatorial (DEEEAb; $p = 0,01$) em relação ao tratamento controle.

Tabela 1. Índice estomático e diâmetro dos estômatos (média $\pm$ erro padrão) de folhas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes concentrações de cobre (Cu).

Tratamentos (mM de Cobre)			
EPIDERME ADAXIAL			
Característica	0,041	0,082	0,164
IEAd ^{ns}	4,67 $\pm$ 0,39 a	5,56 $\pm$ 0,40 a	4,74 $\pm$ 0,38 a
DPPEAd ^{ns}	19,74 $\pm$ 0,27 a	18,59 $\pm$ 0,38 a	18,31 $\pm$ 0,46 a
DEEEAd ^{ns}	13,65 $\pm$ 0,13 a	13,45 $\pm$ 0,20 a	13,25 $\pm$ 0,35 a
Tratamentos (mM de Cobre)			
EPIDERME ABAXIAL			
Característica	0,041	0,082	0,164
IEAb ^{**}	19,73 $\pm$ 1,52 b	29,32 $\pm$ 0,71 a	26,51 $\pm$ 1,10 a
DPPEAb ^{**}	19,40 $\pm$ 0,30 a	16,95 $\pm$ 0,20 b	16,30 $\pm$ 0,42 b
DEEEAb ^{**}	13,87 $\pm$ 0,24 a	13,34 $\pm$ 0,32 ab	12,67 $\pm$ 0,39 b

IEAd = índice estomático da epiderme adaxial; DPPEAd = diâmetro polar dos estômatos da epiderme adaxial; DEEEAd = diâmetro equatorial dos estômatos da epiderme adaxial; IEAb = índice estomático da epiderme abaxial; DPPEAb = diâmetro polar dos estômatos da epiderme abaxial; DEEEAb = diâmetro equatorial dos estômatos da epiderme abaxial; **, significativo pelo teste F a 1% de probabilidade de erro. ^{ns} não significativo.

O aumento da concentração de Cu também modificou o teor de outros nutrientes nas folhas (Tabela 2). Para as folhas que se desenvolveram após a aplicação dos tratamentos (folhas novas), foi observado menor conteúdo de macronutrientes e de Zn com o aumento da concentração de Cu, entretanto, os valores de Cu, Fe e Mn foram reduzidos na concentração de 0,082 mM de Cu e elevados na concentração superior. Para as folhas já estabelecidas (folhas velhas), a aplicação das concentrações de Cu, mostrou respostas semelhantes as folhas novas em relação aos macronutrientes e ao Zn. Em contrapartida, os micronutrientes Cu e Mn aumentaram em grande amplitude com o aumento da disponibilidade de Cu e na avaliação do conteúdo de Fe foi similar ao encontrado nas folhas novas.

O maior acúmulo de micronutrientes foi observado nos tecidos radiculares (Tabela 2). O conteúdo de Fe aumentou com a disponibilidade de Cu, enquanto que o Mg, Zn, Mn e K diminuíram. O valor de P reduziu na concentração de 0,082 mM e aumentou na concentração de 0,164 mM e o Cu apresentou resposta contrária, ou seja, foi elevado na concentração intermediária e reduzido na superior. Já, as análises de N e Ca não apresentaram diferença entre os tratamentos nesse órgão.

Tabela 2. Teores de nutrientes minerais presentes na massa seca de folhas e raízes de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) cultivadas com diferentes concentrações de cobre (Cu).

Tratamentos (mM de Cobre)			
FOLHAS NOVAS			
	0,041	0,082	0,164
Macronutrientes (g kg ⁻¹ de massa seca)			
N	44,13	40,67	31,5
P	8,23	6,66	6,65
K	76,72	69,56	51,17
Ca	10,9	7,71	6,3
Mg	5,47	4,78	4,25
Micronutrientes (mg kg ⁻¹ de massa seca)			
Cu	29,55	28,53	37,19
Zn	36,41	28,12	23,34
Fe	222,28	74,38	100,64
Mn	253,68	185,62	340,31
Tratamentos (mM de Cobre)			
FOLHAS VELHAS			
	0,041	0,082	0,164
Macronutrientes (g kg ⁻¹ de massa seca)			
N	33,75	35,48	27,0
P	5,23	3,69	2,96
K	49,83	45,81	32,15
Ca	22,69	19,06	15,25
Mg	12,38	10,90	6,07
Micronutrientes (mg kg ⁻¹ de massa seca)			
Cu	17,83	17,83	97,31
Zn	37,68	27,56	29,1
Fe	206,52	196,9	452,43
Mn	1486,63	1509,73	1602,13
Tratamentos (mM de Cobre)			
RAÍZES			
	0,041	0,082	0,164
Macronutrientes (g kg ⁻¹ de massa seca)			
N	37,38	41,36	35,65
P	58,37	26,69	62,71
K	71,6	66,49	22,50
Ca	9,12	9,42	11,72
Mg	14,26	10,44	2,71
Micronutrientes (mg kg ⁻¹ de massa seca)			
Cu	56,54	1997,07	995,99
Zn	94,9	90,68	54,27
Fe	4778,05	6221,97	7258,96
Mn	223,16	113,02	82,91

2.4 DISCUSSÃO

As plantas de batata-doce tratadas com as diferentes concentrações de Cu sobreviveram ao período experimental, embora tenham apresentado algumas características visíveis típicas da toxidez por Cu. Segundo CAMBROLLÉ et al. (2012), a clorose e a inibição do crescimento são os sintomas comumente descritos para a maioria das plantas cultivadas em elevadas concentrações de Cu. Neste estudo, houve redução dos parâmetros de crescimento nas plantas cultivadas com 0,164 mM de Cu quando comparadas as demais concentrações (Figura 1). Esses resultados comprovam a estratégia das plantas que, sob estresse pela alta concentração do metal, tendem a utilizar a energia em mecanismos de tolerância, limitando outros processos, como o crescimento (POSMYK; KONTEK; JANAS, 2009).

A clorose foliar não foi visivelmente observada nas plantas de batata-doce estudadas, no entanto, possivelmente a nível intercelular, houve diminuição do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, este efeito, pode estar associado a toxidez por Cu (LIU et al., 2004; MOURATO; MARTINS; CAMPOS-ANDRADA, 2009). Os resultados observados no perfil mineral de plantas de batata-doce sugerem que maiores concentrações de Cu (0,082 e 0,164 mM) (Tabela 2): (1) reduziram consideravelmente a concentração foliar de alguns macronutrientes, como Mg e N; (2) provocaram a imobilização de Fe nas raízes e esse micronutriente provavelmente não foi translocado para a síntese de clorofila nas folhas; e (3) causaram a degradação das moléculas de clorofila (MATEOS-NARANJO et al., 2008). A biossíntese de clorofila é dependente da assimilação do N e de Fe (XIONG; LIU; GENG, 2006; ADAMSKI et al., 2011) e a substituição do anel central de Mg pelo íon Cu na molécula de clorofila causa danos na sua biossíntese (CAMBROLLÉ et al., 2013).

O índice estomático (IE) é um parâmetro que permite obter informações sobre a diferenciação celular na superfície epidérmica foliar (TICHÁ, 1982) e o diâmetro dos estômatos está diretamente relacionado com o tamanho dessas estruturas, sendo que condições ambientais podem influenciar nessas características (RIBEIRO et al., 2012). As folhas de batata-doce são caracterizadas por serem anfiestomáticas com estômatos paracíticos (GLÓRIA; GUERREIRO, 2006). Na epiderme abaxial de folhas de batata-doce, as mais altas concentração de Cu provocaram diminuição do tamanho dos estômatos e, conseqüentemente, aumento do número dos mesmos

(Tabela 1). A resposta inversa foi visualizada em folhas tratadas com 0,041 mM de Cu que apresentaram menor número de estômatos porém em maior tamanho. Estudos apontam que o número de estômatos é inversamente proporcional ao tamanho das células-guarda, refletindo no melhor controle da taxa transpiratória (PANOU-FILOTHEOU; BOSABALIDIS; KARATAGLIS, 2001). Conforme Ribeiro et al. (2012), essa resposta, frequentemente observada em condições de aumento da intensidade luminosa e de menor disponibilidade de água, pode estar associada com uma maior funcionalidade estomática, pois os estômatos se tornam mais elípticos. Desta forma, esses resultados também indicam o envolvimento de metais pesados na iniciação, desenvolvimento e função estomática (RIBEIRO et al., 2012).

O Cu, quando em excesso, é capaz de catalisar a produção de EROS como radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$), causando danos às moléculas biológicas (DNA, RNA e proteínas) e nas membranas celulares (peroxidação lipídica) (SHI-SHENG, 2007). A habilidade das enzimas antioxidantes, SOD, APX e CAT, para remover EROS, dependendo da cooperação entre elas, é um fator fundamental para determinar a resistência das plantas ao estresse ambiental (SHI-SENG, 2007). A enzima SOD, considerada a primeira linha de defesa antioxidante, tem a função de dismutar $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , conferindo proteção incompleta da célula e refletindo o funcionamento da mesma (MELONI et al., 2003). O H_2O_2 , precursor de $OH^{\bullet}$, é altamente tóxico e necessita ser degradado pela CAT e APX.

No presente estudo, a atividade do sistema antioxidante (Figura 2) foi mais pronunciada no sistema radicular das plantas de batata-doce do que na parte aérea. Essa diferença entre os órgãos da planta deve-se, principalmente, as baixas quantidades de Cu encontradas nas folhas em relação as raízes (Tabela 2). Com base nisso, é possível inferir que as raízes desenvolveram mecanismos de sequestro e compartimentalização com o incremento da disponibilidade de Cu, atuando, desta forma, para melhorar a tolerância a metais pesados (MATEOS-NARANJO et al., 2008). Segundo Cambrollé et al. (2013), na maioria das espécies, o primeiro efeito do Cu ocorre nas raízes; no entanto, em altas concentrações, pode ser translocado para a parte aérea e interferir em diversos processos fisiológicos.

Nas folhas, as diferentes concentrações de Cu não alteraram a atividade da SOD e da APX (Figura 2A e 2B), porém, provocaram aumento na CAT (Figura 2C) com o incremento da disponibilidade do nutriente. A CAT é uma enzima responsável

pela eliminação de H_2O_2 da planta, convertendo-o em água e O_2 e está localizada, principalmente, nos peroxissomos, sendo produzida por plantas sob condições de estresse oxidativo na presença de metais pesados e metalóides (MITTLER, 2002; GRATÃO et al., 2005; THOUNAOJAM et al., 2012). A atividade da CAT pode estar relacionada ao ciclo fotorrespiratório que eleva o conteúdo de H_2O_2 nos peroxissomos, fato que pode justificar o aumento na atividade dessa enzima nos tecidos foliares. A fotorrespiração é considerada um dreno alternativo para ajudar a consumir poder redutor gerado pela cadeia de transporte de elétrons cloroplastídicos (HEBER et al., 1996; WINGLER et al., 1999).

Os resultados mostram que a elevada quantidade de Cu acumulada nas raízes induziu estresse oxidativo, fato esse que pode ser evidenciado pelo aumento na atividade das enzimas antioxidantes até 0,082 mM de Cu. No entanto, na concentração superior (0,164 mM), a atividade da SOD e da APX (Figura 2A e 2B) foram reduzidos e da CAT (Figura 2C) permaneceu constante. Essas respostas sugerem que a concentração de 0,082 mM pode ser considerada tóxica nas raízes pois desencadearam a atividade conjunta das enzimas antioxidantes. Contudo, as plantas que receberam elevada quantidade de Cu (0,164 mM) foram capazes de desenvolver mecanismos de exclusão e acumulação (JANAS et al., 2010), que pode ser justificado pelo alto conteúdo de Cu encontrado nas folhas velhas (Tabela 2). Segundo Kabata-Pendias e Pendias (2001), o Cu em concentrações adequadas, tem baixa mobilidade em plantas e a maior parte deste metal permanece em tecidos de raízes e folhas velhas até a senescência; apenas pequenas quantidades pode mover-se para órgãos em desenvolvimento. No entanto, com base nesses autores, elevado fornecimento de Cu pode aumentar o transporte para folhas senescentes e remover o excesso de micronutriente. A diminuição na atividade de SOD e APX também sugere que o aumento na disponibilidade de Cu (0,164 mM) pode ter inibido, a nível molecular, a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo (SRIVASTAVA et al., 2006; MOURATO; MARTINS; CAMPOS-ANDRADA, 2009; POSMYK; KONTEK; JANAS, 2009).

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, o principal efeito do aumento da disponibilidade de Cu foi nas raízes. Os tecidos radiculares, os primeiros órgãos em contatos com o metal, apresentaram aumento da atividade das enzimas antioxidantes e, devido a grande quantidade de Cu disponível (0,164 mM), foram capazes de transportar o excesso para a parte aérea. Nas folhas velhas houve

exclusão do Cu em excesso (Tabela 2) e nas folhas novas, o nutriente provocou sintomas semelhantes aos de déficit hídrico. Como não houve comprometimento da fase fotoquímica (capítulo 1), podemos inferir que o excesso de Cu nas folhas ocasionou o acúmulo de NADPH devido a: (1) diminuição do ciclo de redução do carbono fotossintético, pois altas concentrações de Cu provocaram a diminuição do crescimento (Figura 1) e, possivelmente, inibição as enzimas ácido-3-fosfoglicérico (PGK) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) do Ciclo de Calvin-Benson (BURZYNSKI; ZUREK, 2007); (2) diminuição do tamanho de estômatos e aumento do índice estomático na epiderme abaxial e, este efeito, é geralmente atribuído a tolerância frente a diferentes condições ambientais (RIBEIRO et al., 2012); e (3) infere redução e/ou inibição da síntese da Rubisco e da atividade da nitrito redutase (NR) devido a diminuição dos níveis de N foliares (CAMBROLLÉ et al., 2012). Segundo Bussotti et al. (2011), o poder redutor (NADPH) gerado pela cadeia de transporte de elétrons não é necessariamente usado para o metabolismo de carbono, e sim, pode ser encaminhado para outras vias bioquímicas. Dessa forma, o NADPH pode ter sido consumido pela fotorrespiração, provocando aumento de H_2O_2 livre e, como consequência, aumento na atividade da CAT nos tecidos foliares (Figura 2).

2.5 CONCLUSÃO

As plantas de batata-doce são capazes de tolerar a toxidez por Cu até certa concentração (0,082 mM). A partir dessa, o Cu, em excesso, é transportado das raízes para tecidos aéreos, provocando alterações nas características morfo-anatômicas e ativando o sistema antioxidante como forma de proteção ao estresse gerado pelo excesso de Cu.

2.6 REFERÊNCIAS

ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2056-2062, 2011.

ADAMSKI, J. M.; DANIELOSKI, R.; DEUNER, S.; BRAGA, E. J. B.; CASTRO, L. A. S.; PETERS, J. A. Responses to excess iron in sweet potato: impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1827-1836, 2012.

ANDRADE JÚNIOR, V. C.; VIANA, D. J. S.; PINTO, N. A. V. D.; RIBEIRO, K. G.;

PEREIRA, R. C.; NEIVA, I. P.; AZEVEDO, A. M.; ANDRADE, P. C. R. Características produtivas e qualitativas de ramas e raízes de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 584-589, 2012.

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

BOOJAR, M. M. A.; GOODARZI, F. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. **Chemosphere**, v. 67, p. 2138–2147, 2007.

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

BURKHEAD, J. L.; GOGOLIN REYNOLDS, K. A.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C. M.; PILON, M. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v.182, p.799-816, 2009.

BURZYNSKI, M.; ZUREK, A. Effects of copper and cádmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. **Photosynthetica**, v. 45, n. 2, p. 239-244, 2007.

BUSSOTTI, F.; DESOTGIU, R.; CASCIO, C.; POLLASTRINI, M.; GRAVANO, E.; GEROSA, G.; MARZUOLI, R.; NALI, C.; LORENZINI, G.; SALVATORI, E.; MANES, F.; SCHAUBE, M.; STRASSER, R.J. Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 19-30, 2011.

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

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; OCETE, R.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**. 2013. In press: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.080](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.080)

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 721–728, 2012.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal, Parte I - Células e tecidos**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1986. p. 304.

FIDALGO, F.; AZENHA, M.; SILVA, A. F.; SOUSA, A.; SANTIAGO, A.; FERRAZ, P.; TEIXEIRA, J. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. **Food and Energy Security**, v. 2, n. 1, p. 70–80, 2013.

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

GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2006. 438p.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

HARICHOVÁ, J.; KARELOVÁ, E.; PANGALLO, D.; FERIANC, P. Structure analysis of bacterial community and their heavy-metal resistance determinants in the heavy-metal-contaminated soil sample. **Biologia**, v. 67, n. 6, p. 1038—1048, 2012.

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

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California College of Agriculture, Agricultural Experimental Station, 1938. 39 p.

JANAS, K. M.; ZIELINSKA-TOMASZEWSKA, J.; RYBACZEK, D.; MASZEWSKI, J.; POSMYK, M. M.; AMAROWICZ, R.; KOSINSKA, A. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 270–276, 2010.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3 ed. Flórida: CRC Press, 2001. 315 p.

KRAUS, J. E.; M. ARDUIN. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: EDUR, 1997. 198p.

LIU, J.; XIONG, Z. T.; LI, T.Y.; HUANG, H. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 43-51, 2004.

LOW, J. W.; ARIMOND, M.; OSMAN, N.; CUNGUARA, B.; ZANO, F.; TSCHIRLEY, D. A food-based approach introducing orange-fleshed sweet potatoes increased vitamin A intake and serum retinol concentrations in young children in rural Mozambique. **Journal of Nutricion**, v. 137, p. 1320-1327, 2007.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat – Sistema de Análise Estatística para Windows versão 1.0**. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

MATEOS-NARANJO, E.; REDONDO-GÓMEZ, S.; CAMBROLLÉ, J.; FIGUEROA, M.E. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 459–465, 2008.

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and

activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49 p. 69–76, 2003.

MOURATO, M. P.; MARTINS, L. L.; CAMPOS-ANDRADA, M. P. Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 105-111, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

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

PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effects of Copper Toxicity on Leaves of Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Annals of Botany**, v. 88, p. 207-214, 2001.

POSMYK, M. M.; KONTEK, R.; JANAS, K. M. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 596–602, 2009.

RIBEIRO, M. N. O.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E.M. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 354-361, 2012.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. Oxford: Oxford University Press. 1999. 322p.

SHI-SHENG, K. Effects of Copper on the Photosynthesis and Oxidative Metabolism of *Amaranthus tricolor* Seedlings. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 10, p. 1182-1192, 2007.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Interrelações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.1, p.183-194, 2005.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. V.; RIBEIRO, R. V.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1157–1164, 2010.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, S.; TRIPATHI, R.D.; DWIVEDI, S.; GUPTA, D.K. Copper- induced stress and responses of antioxidants and phytochelators in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 405–415, 2006.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. VOLKWEISS, S. J. **Análise do solo, plantas e outros materiais**, 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p.

TICHÁ, I. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves: stomatal

density and size. **Photosynthetica**, v. 16, n. 3, p. 375-471, 1982.

THOUNAOJAM, T. C.; PANDA, P.; MAZUMDAR, P.; KUMAR, D.; SHARMA, G. D.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 33-39, 2012.

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

WINGLER, A.; QUICK, W. P.; BUNGARD, R. A.; BAILEY, K. J.; LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 361–373, 1999.

XIONG, Z.-T.; LIU, C.; GENG, B. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 273–280, 2006.

CAPÍTULO 3

Respostas fisiológicas em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) em função de diferentes concentrações de cobre e zinco

Physiological responses in sweet potato plants (*Ipomea batatas* L.) due to different copper and zinc concentration

RESUMO

O cobre (Cu) e zinco (Zn) são micronutrientes essenciais para as plantas e pouco se sabe sobre o efeito combinado desses elementos sobre os processos fisiológicos. Com base nisso, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos das concentrações de Cu e Zn, de forma combinada, através de parâmetros morfológicos, metabolismo antioxidante e perfil mineral em plantas de batata-doce. Para tanto, as mesmas foram colocadas em sistema hidropônico e cultivadas com solução nutritiva completa por seis dias. Após, foram transferidas para a mesma solução com tratamentos contendo diferentes concentrações dos dois nutrientes: 1 (0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn - controle); 2 (0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn), durante nove dias. As plantas cultivadas nos tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram redução dos parâmetros morfológicos, aumento do conteúdo de H_2O_2 e da peroxidação lipídica quando comparadas ao controle. O aumento da concentração de micronutrientes, na forma combinada, também modificou o teor de outros nutrientes nos órgãos das plantas. Nas folhas, as atividades da SOD e CAT foram estimuladas no T2. Enquanto que nas raízes, as enzimas SOD, APX e CAT foram acionadas no mesmo tratamento. A atividade da SOD reduziu nos tratamentos 3 e 4 enquanto que as atividades das APX e a CAT permaneceram elevadas. Portanto, o aumento de Zn independente da concentração de Cu (T2 e T4) causou diminuição na absorção e transporte de macronutrientes; promoveu mecanismos de competição, sequestro e compartimentalização de micronutrientes nas raízes e provocou estresse oxidativo e danos nas membranas em plantas de batata-doce.

Palavras-chave: Nutrição mineral. Micronutriente. Metabolismo antioxidante. Perfil mineral. Parâmetros de crescimento.

ABSTRACT

The copper (Cu) and zinc (Zn) are essential micronutrients in plants, and the knowledge about the combined effect of these elements on physiological processes is restricted. Therefore, the objective of this study was to evaluate the physiological responses induced by the combination of Cu and Zn, analyzing the morphological parameters, antioxidant metabolism and mineral content in sweet potato plants. For this analysis, the plants were placed and grown hydroponically with nutrient solution for six days. After this period, the plants were transferred to the same solution with different treatments: 1 (0.041 mM Cu + 0.085 mM Zn - control), 2 (0.041 mM Cu + 0.850 mM Zn) 3 (0.123 mM Cu + 0.085 mM Zn) and 4 (0.123 mM Cu + 0.850 mM Zn) for evaluation. The plants grown with 2, 3 and 4 treatments showed reduction of all morphological parameters, increase of H₂O₂ content, and lipid peroxidation when compared to control. The increase in concentration of micronutrients in combined form also modified the content of other nutrients in plant organs. In leaves, the activities of SOD and CAT were stimulated in T2. While in roots, SOD, CAT, and APX were activated in the same treatment. The SOD activity decreased in 3 and 4 treatments, but remained high in the APX and CAT. Thus, the increase of Zn independent of Cu concentration (T2 and T4) caused decrease in nutrients absorption and transport, promoted a competition mechanisms, the capture and compartmentalization of micronutrients in the roots, and caused oxidative stress and damage membranes in sweet potato plants.

Keywords: Mineral nutrition. Micronutrient. Antioxidant metabolism. Mineral content. Growth parameters.

3.1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) e o zinco (Zn) estão presentes naturalmente no ambiente e, em baixas concentrações, são micronutrientes essenciais para as plantas (GIANPAOLI et al., 2012). No entanto, também são originados das atividades agrícolas e industriais e nesse caso, quando em altas concentrações, podem ser tóxicos as plantas (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010; GIANPAOLI et al., 2012). Algumas espécies podem tolerar o excesso de metais pesados adotando estratégias de compartimentalização, quelação com metalotioneína ou exclusão (BROADLEY et al., 2007). Todavia, o Cu e o Zn podem acumular-se nos tecidos vegetais, causando mudanças fisiológicas e bioquímicas, redução de crescimento e perda da produtividade (GIANPAOLI et al., 2012).

Os íons Cu têm sido descritos por induzir alterações no metabolismo das células vegetais através de sua ligação aos grupos sulfidril de proteínas de membrana ou de enzimas; da taxa de peroxidação lipídica; da absorção de outros elementos essenciais; da síntese da clorofila e do transporte de elétrons (efeito tóxico sobre as reações primárias de fotossíntese); e, principalmente, da formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS) através das reações de Haber-Weiss e Fenton por seu um metal de transição redox ativo (POSMYK; KONTEK; JANAS, 2009).

As plantas afetadas por altas concentrações de Zn podem apresentar sintomas semelhantes a toxidez por outros metais pesados, como cádmio ou chumbo (SAGARDOY et al., 2009). Na maioria dos casos, o excesso de Zn causa: inibição de crescimento e alterações na morfologia das raízes; redução de biomassa; geração de EROS e indução de clorose nas folhas jovens; diminuição no conteúdo de água nos tecidos e alterações na absorção, translocação e utilização de outros elementos essenciais (como fósforo, ferro ou magnésio) (SHI; CAI, 2009; YANG et al., 2011).

Os efeitos isolados do Cu e Zn sobre o metabolismo das plantas têm sido amplamente estudados; no entanto, pouco se sabe sobre o efeito combinado desses elementos sobre os processos fisiológicos (UPADHYAY; PANDA, 2010). Ambos ocorrem simultaneamente em solos contaminados e em água de irrigação e a interação entre eles pode resultar em efeitos prejudiciais aditivos ou sinérgicos (KASIM, 2005). Essa informação é de fundamental importância para programas de melhoramento visando o desenvolvimento de genótipos tolerantes, capazes de apresentar alta produtividade sob condições estressantes (SILVA et al., 2010).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos das concentrações de Cu e Zn, de forma combinada, através de parâmetros morfológicos, metabolismo antioxidante e perfil mineral em batata-doce [*Ipomea batatas* (L.)], planta modelo utilizada em estudos na área da nutrição de plantas e metabolismo vegetal (ADAMSKI et al., 2011; 2012).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições experimentais

Para a realização do trabalho, ramos apicais (± 8 cm de comprimento e 4 folhas por ramo) de batata-doce obtidos de plantas estabelecidas em casa-de-vegetação, foram enraizados em água por cinco dias. Posteriormente, os ramos, contendo sistema radicular de aproximadamente 5 cm de comprimento, foram transferidos para um sistema hidropônico de raiz flutuante de fluxo contínuo e cultivadas em solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1938) por seis dias. Após este período, as mesmas foram cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de Cu (0,041 e 0,123 mM) e Zn (0,085 e 0,850 mM), nas formas de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), por nove dias. Assim, foram realizados quatro tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn). Os tratamentos foram definidos após ensaios preliminares que avaliaram parâmetros de crescimento, sendo o tratamento com menores concentrações de micronutrientes (T1) considerado como controle. As soluções foram renovadas a cada três dias e o pH das mesmas foram ajustados para $\pm 5,8$. No final do período experimental (com as diferentes concentrações de Cu e Zn), as plantas foram coletadas e avaliadas quanto ao crescimento, perfil mineral e metabolismo antioxidante.

Parâmetros morfológicos

Os parâmetros avaliados foram: comprimento de ramos (cm); número de folhas; massa fresca da parte aérea e sistema radicular (mg); massa seca de parte aérea e sistema radicular (mg) e área foliar ($\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$). O comprimento dos ramos foi avaliado com auxílio de régua centimetrada e a área foliar foi estimada utilizando-se de medidor de área foliar Li-Cor, modelo LI-3100. A massa seca da parte aérea e do sistema radicular foi obtida pela pesagem do material vegetal, após secagem em estufa de ventilação forçada, a 70°C até peso constante.

Metabolismo antioxidante

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, ± 200 mg de matéria fresca (MF) de folhas e raízes foi macerado em N_2 , acrescido de 20% de PVPP (polivinilpolirridona) e homogenizado com 1,8 mL de meio de extração (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 20 mM). O homogenato foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos (4°C) e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) no meio de reação (fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; metionina 14 mM; EDTA 0,1 μM ; NBT 75 μM e riboflavina 2 μM). Uma unidade da SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em $\text{U.mg proteína}^{-1}$.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato (ASA) a 290 nm. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H_2O_2 0,1 mM e extrato enzimático. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um minuto e meio e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol ASA min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998). O extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM) e a atividade da enzima

foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante um minuto e meio. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg de proteína}^{-1}$.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica foram determinados em $\pm 300 \text{ mg}$ de matéria fresca (MF) de folhas e raízes. Os tecidos foram macerados em N_2 acrescido de 20% de PVPP e 2 mL da solução de extração contendo ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 12.000 g, durante 20 minutos e o sobrenadante foi separado para análises seguintes.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malonodialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (\text{A}_{535} - \text{A}_{600})/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com Velikova et al. (2000). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm e a concentração de H_2O_2 foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

Perfil Mineral

As concentrações de macro (N, P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Cu, Zn, Fe e Mn) foram avaliadas a partir da massa seca de folhas e raízes conforme metodologia descrita por Tedesco et al., (1995). Para observar o efeito das diferentes concentrações de Cu e Zn, os nutrientes foram quantificados em folhas já estabelecidas antes da aplicação dos tratamentos (denominada folhas velhas) e folhas que se desenvolveram após a aplicação dos tratamentos (denominada folhas novas) e raízes.

Análise estatística

O trabalho foi realizado em delineamento inteiramente casualizado constituído de quatro tratamentos (T1; T2; T3 e T4) e três repetições (cinco plantas por repetição). Os resultados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (MACHADO; CONCEIÇÃO,

2007).

3.3 RESULTADOS

As variáveis comprimento dos ramos ($p = 0,00008$), área foliar ($p = 0,005$), massa fresca da parte aérea (MFPA; $p = 0,0007$) e massa fresca (MFSR; $p = 0,0006$) e seca (MSSR; $p = 0,0005$) do sistema radicular avaliadas em plantas de batata-doce cultivadas nos tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram 23, 13, 13, 27 e 27% do valor encontrado para o tratamento controle (T1), respectivamente (Figura 1). Os três tratamentos (T2, T3 e T4) promoveram diminuição no número de folhas das plantas em estudo, sendo que em T3 foi observado valores aproximadamente 3% inferiores ao T2 e T4 e em torno de 26% menores que T1 ($p = 0,0004$). No entanto, quanto a massa seca da parte aérea (MSPA; $p = 0,0005$), foi observada redução significativa com o aumento da disponibilidade de micronutrientes, sendo as plantas cultivadas no T2, T3 e T4 apresentaram 30, 19 e 17% do valor encontrado para o tratamento controle (T1), respectivamente.

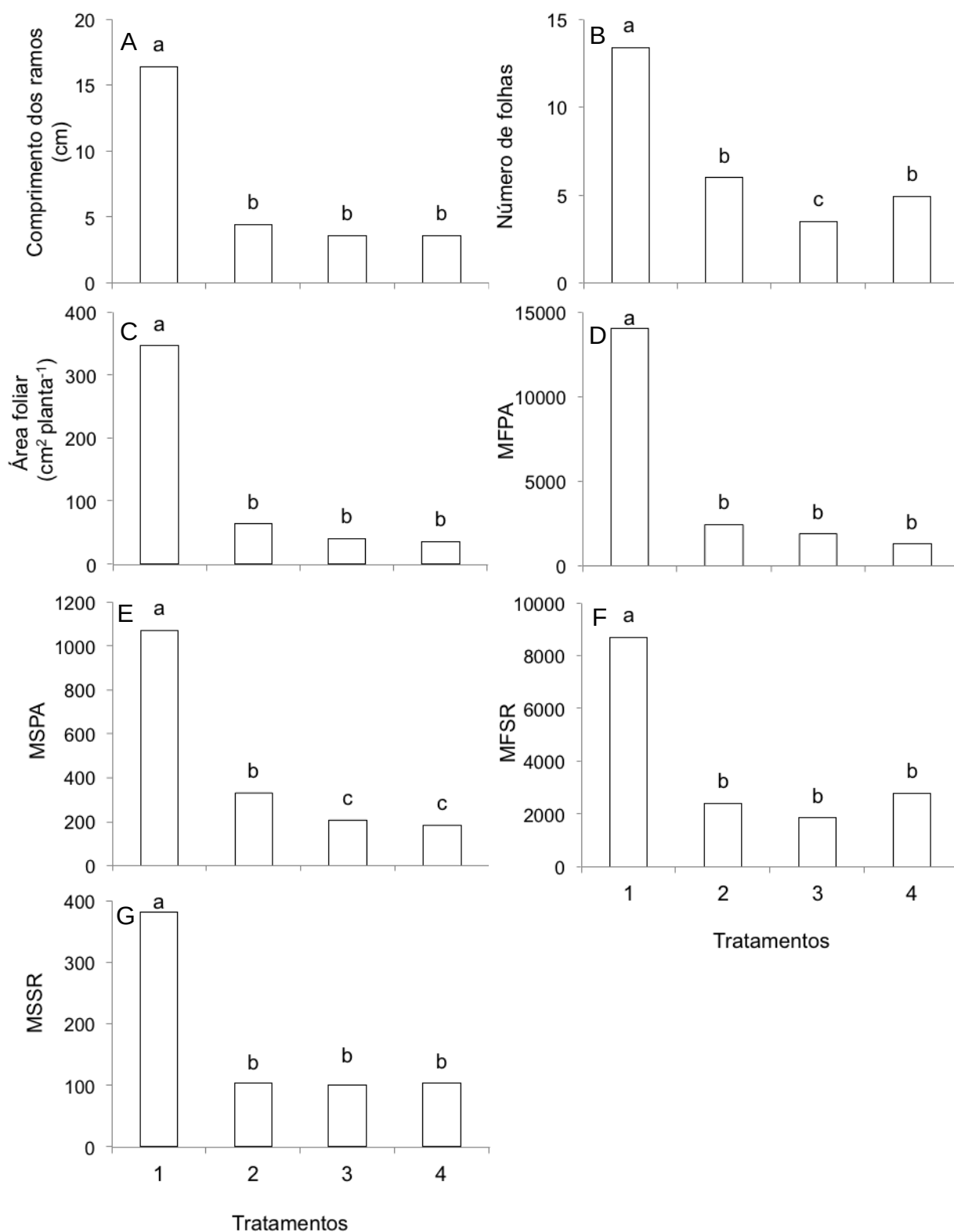


Figura 1. Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn) sobre parâmetros morfológicos em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Comprimento dos ramos; (B) Número de folhas; (C) Área foliar; (D) Massa fresca da parte aérea (MFPA); (E) Massa seca da parte aérea (MSPA); (F) Massa fresca do sistema radicular (MFSR); (G) Massa seca do sistema radicular (MSSR). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn). Médias seguidas da mesma letra, entre tratamentos, não diferem significativamente pelo teste F ($p < 0,05$).

A avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD), nos tecidos foliares, apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,0005$), sendo sua atividade incrementada pelas combinações de menor e maior concentração de Cu com maior e menor de Zn (T2 e T3), atingindo 386 e 313% de acréscimo em relação ao T1, respectivamente. O T4 apresentou valores estatisticamente iguais aos das plantas do tratamento controle (Figura 2A). Nos tecidos radiculares, a enzima SOD (Figura 2A) foi incrementada em 903% quando a concentração de Zn foi aumentada no T2 em relação as plantas controle. Já nos tratamentos 3 e 4, a atividade não diferiu de T1 ($p = 0,002$).

Para a atividade da ascorbato peroxidase (APX), nos tecidos foliares, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos estudados ($p > 0,05$) (Figura 2B). Já nas raízes, a atividade da APX nas plantas cultivadas nos tratamentos 2, 3 e 4 apresentou aumento de 745, 458 e 599% em relação ao controle ($p = 0,01$). No entanto, as plantas cultivadas com o T3 não diferiram estatisticamente do T1 (Figura 2B).

A análise da atividade da catalase (CAT), nas folhas, apresentou diferença estatística somente entre os tratamentos 2 e 3 ($p = 0,03$). A atividade da enzima CAT no tratamento utilizando 0,041 mM de Cu combinado com 0,850 mM de Zn (T2) foi 57% superior ao das plantas controle. Por outro lado, o aumento da concentração de Cu e diminuição da concentração de Zn (T3) provocou diminuição da CAT com atividade 30% menor que o T1. Já o T4 não diferiu do tratamento com menores concentrações de micronutrientes (Figura 2C). Nas raízes, a atividade da CAT (Figura 2C), aumentou com o incremento da concentração de Zn e manutenção do nível de Cu (T2) ($p = 0,04$). Os tratamentos 3 e 4 não diferiram dos demais.

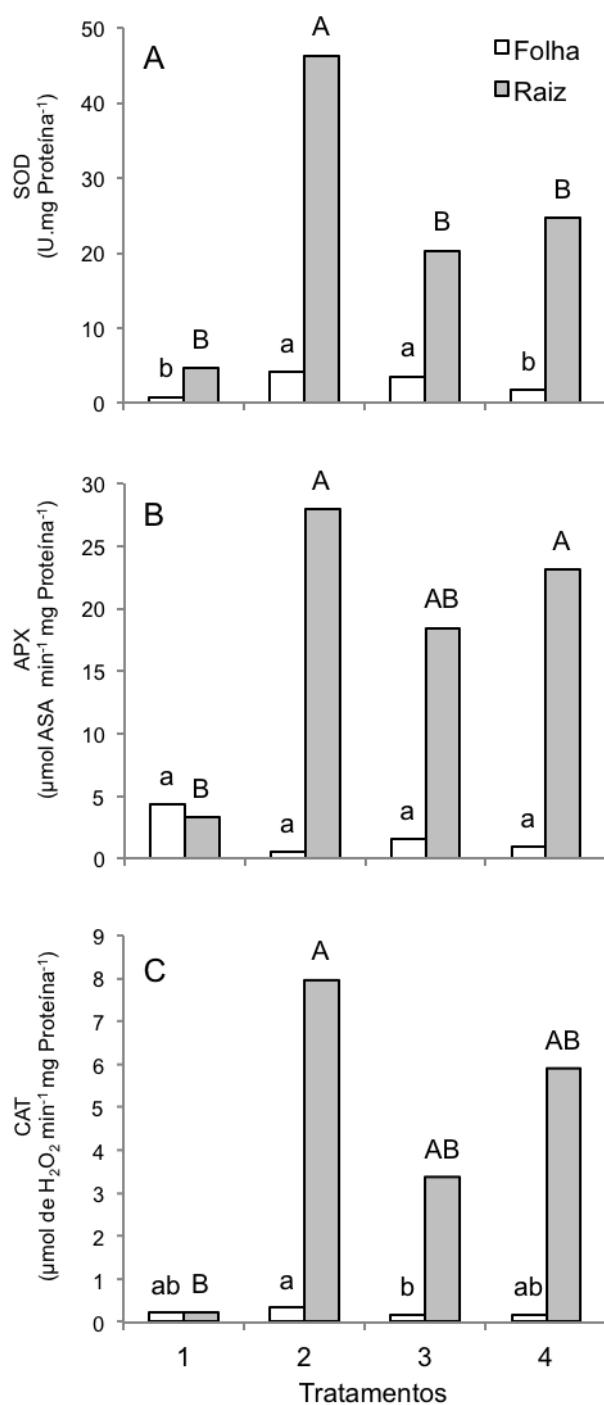


Figura 2. Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn) sobre o metabolismo antioxidante em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Superóxido dismutase (SOD); (B) Ascorbato peroxidase (APX); (C) Catalase (CAT). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn). Médias seguidas de letras minúsculas iguais, nos tecidos foliares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nos tecidos radiculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Na análise do conteúdo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas, foi observado diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,003$). Os tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram valores 51, 54 e 51% superiores aos observados para as plantas controle, respectivamente (Figura 3A). Respostas semelhantes foram observadas na determinação do grau de peroxidação lipídica (baseada na formação de MDA), onde foi evidenciado aumento de 120, 92 e 139% em relação ao tratamento controle. No entanto, as plantas submetidas ao tratamento 3 não diferiram estatisticamente dos demais (Figura 3B).

Os resultados obtidos na quantificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) livre nas células dos tecidos radiculares mostraram diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,0003$), ocorrendo incremento dos níveis de H_2O_2 com o aumento das concentrações de micronutrientes. Os níveis de H_2O_2 em plantas cultivadas nos tratamentos 2, 3 e 4 foram 8, 18 e 30% mais elevados, consecutivamente, do que as plantas controle (Figura 3A). Na análise do grau de peroxidação lipídica nas raízes (Figura 3B), houve diferença estatística somente entre os tratamentos 2 e 3 ($p = 0,02$). Os valores de MDA formado nas plantas do T2 foi 128% superior ao das plantas controle, sendo que estas diferiram do T3, que apresentaram atividade 40% menor que os resultados do T1. Já, o T4, não diferiu do tratamento com menores concentrações de micronutrientes.

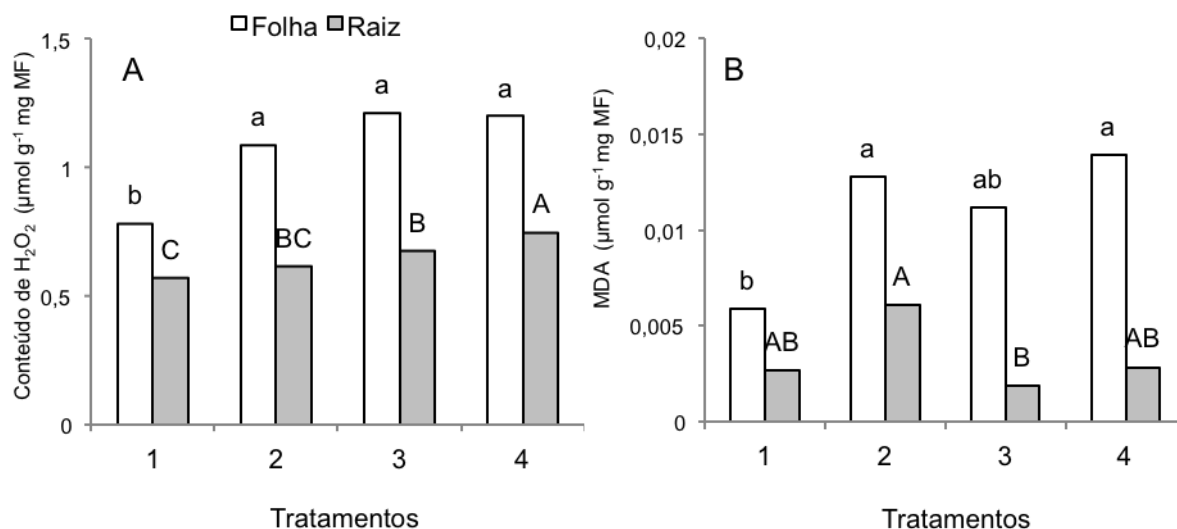


Figura 3. Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn) sobre o metabolismo antioxidante em plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* L.): (A) Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); (B) Peroxidação lipídica (MDA). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn). Médias seguidas de letras minúsculas iguais, nos tecidos foliares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, nos tecidos radiculares, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

O aumento da concentração de micronutrientes, na forma combinada, também modificou o teor de outros nutrientes nos órgãos das plantas (Tabela 1). O teor de N nos diferentes órgãos não foi alterado pelos tratamentos Cu-Zn. O mesmo ocorreu no conteúdo de P, porém, esse foi acumulado em maior quantidade nas raízes dos que os outros órgãos da planta. O tratamento com baixa concentração de Cu combinada com alta concentração de Zn (T2) diminuiu os conteúdos de K, Ca e Mg nas folhas novas e velhas em relação ao controle, sendo esses semelhantes aos encontrados no T3 e T4. Já nas raízes, esses macronutrientes foram reduzidos em todos os tratamentos quando comparados ao T1 e apresentaram valores inferiores aos encontrados nas folhas.

Entre os micronutrientes, em todas as partes da planta, o conteúdo de Mn diminuiu quando utilizado maior conteúdo de Zn e manutenção da concentração de Cu (T2) em relação a T1. E esses resultados não diferiram do T3. No entanto, o tratamento com grande quantidade de micronutrientes (T4) não diferiu do controle, exceto nas raízes. Nesse órgão, o acúmulo de Mn foi inferior aos encontrados na

parte aérea. O Fe também diminuiu no T2 nas folhas, no entanto, quando foi usado 0,123 mM de Cu (T3 e T4), houve o aumento do teor de Fe nas folhas velhas e raízes em relação ao T1. Nas folhas novas, o teor de Fe nos tratamentos 3 e 4 não diferiram do controle. Porém, ao contrário do Mn, a maior quantidade de Fe foi encontrada nos tecidos radiculares.

O conteúdo de Zn aumentou proporcional a quantidade do mesmo na solução, no entanto, o teor desse elemento foi menor nos tratamentos com alta concentração de Cu (T3 e T4) em todos os tecidos estudados. Além disso, nas raízes foram encontradas maiores quantidades deste micronutriente. O aumento da concentração de Zn no T2 afetou negativamente o acúmulo de Cu nas folhas. No entanto, nos tratamentos com 0,123 mM de Cu (T3 e T4) houve aumento do teor do mesmo nas folhas em relação aos T1 e T2. Nas raízes, local de maior acúmulo deste elemento, a utilização de 0,850 mM de Zn (T2 e T4) provocou a maior acumulação de Cu.

Tabela 1. Teores de nutrientes minerais presentes na massa seca de folhas e raízes de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) em função dos tratamentos com diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn). Tratamentos: 1 (T1; 0,041 mM Cu + 0,085 mM Zn); 2 (T2; 0,041 mM Cu + 0,850 mM Zn); 3 (T3; 0,123 mM Cu + 0,085 mM Zn) e 4 (T4; 0,123 mM Cu + 0,850 mM Zn).

FOLHAS NOVAS				
Tratamentos				
	1	2	3	4
Macronutrientes (g kg ⁻¹ de massa seca)				
N	38,08	29,94	36,17	36,69
P	6,52	4,53	4,74	6,10
K	72,07	37,84	47,15	43,42
Ca	15,30	8,15	8,08	7,36
Mg	5,17	3,16	3,39	3,41
Micronutrientes (mg kg ⁻¹ de massa seca)				
Cu	27,37	19,16	34,48	35,03
Zn	175,28	576,77	143,57	292,14
Fe	109,06	88,97	95,67	129,15
Mn	231,80	141,56	144,21	197,74
FOLHAS VELHAS				
Tratamentos				
	1	2	3	4
Macronutrientes (g kg ⁻¹ de massa seca)				
N	33,23	26,13	26,83	30,46
P	4,43	3,84	3,88	5,02
K	54,63	39,16	41,02	42,09
Ca	40,96	13,15	16,59	15,44
Mg	8,86	4,16	4,82	4,77
Micronutrientes (mg kg ⁻¹ de massa seca)				
Cu	26,82	22,99	91,41	70,06
Zn	256,25	722,84	218,69	552,96
Fe	223,86	185,60	240,13	245,87
Mn	707,80	424,68	597,21	643,66
RAÍZES				
Tratamentos				
	1	2	3	4
Macronutrientes (g kg ⁻¹ de massa seca)				
N	34,44	32,71	33,40	33,75
P	11,71	10,73	7,62	11,34
K	54,24	41,55	40,49	17,58
Ca	11,51	10,29	10,15	12,22
Mg	13,08	4,82	4,38	2,44
Micronutrientes (mg kg ⁻¹ de massa seca)				
Cu	584,80	1004,32	3419,78	6254,77
Zn	3093,60	10885,44	1749,19	9302,49
Fe	4590,73	5456,91	4850,58	12862,71
Mn	141,70	91,10	60,73	70,85

3.4 DISCUSSÃO

A redução ou inibição do crescimento é o principal efeito da toxidez por metais pesados (POSMYK; KONTEK; JANAS, 2009). As plantas cultivadas com as diferentes combinações de Cu-Zn apresentaram considerável redução de todos os parâmetros morfológicos (Figuras 1). Isso pode ser devido à inibição da divisão celular ou ao efeito aditivo dos micronutrientes sob as variáveis de crescimento estudadas (KASIM, 2005; UPADHYAY; PANDA, 2010). De acordo com Fageria (2001), quando a combinação de nutrientes resulta em uma resposta de crescimento menor do que o controle, a interação é negativa. Com base nisso, pode-se inferir que as relações Cu-Zn estudadas nesse trabalho são ditas antagonistas.

As interações antagonistas, segundo Kabata-Pendias e Pendias (2001), são competitivas, ou seja, a absorção de um elemento é inibida pelo outro, sugerindo que eles possuem os mesmos transportadores no processo de absorção celular, a fim de regular a sua homeostase em condições ambientais variadas. Consequentemente, várias famílias de transportadores de metais pesados envolvidos no equilíbrio intracelular de Cu e Zn têm sido descobertas (YRUELA, 2009). Os resultados presentes no perfil mineral dos tecidos radiculares confirmam essa afirmativa, assim como Upadhyay e Panda (2010). Nas condições do presente estudo, o Cu inibiu significativamente a captação de Zn e o Zn, por sua vez, interferiu de forma positiva com o processo de absorção de Cu (Tabela 1). Além do processo de absorção foi observado o efeito inibitório do Zn sobre a translocação de Cu em folhas velhas e novas cultivadas em baixas concentrações de Cu (T1 e T2). Contudo, o conteúdo dos elementos estudados foi maior no sistema radicular das plantas de batata-doce e, pode-se inferir, que esses órgãos desenvolveram mecanismos de sequestro e compartimentalização, principalmente de Cu, com o incremento da disponibilidade de micronutrientes, atuando, desta forma, para melhorar a tolerância a metais pesados (MATEOS-NARANJO et al., 2008).

Além desses efeitos típicos de toxicidade, as plantas de batata-doce exibiram diminuição acentuada no conteúdo de magnésio (Mg) em todas as partes da planta (Tabela 1), principalmente nos tratamentos com altas concentrações de Zn (T2 e T4). Segundo Sagardoy et al. (2009), o excesso de Zn podem induzir deficiência de Mg e ferro (Fe) pelo fato dos três metais possuírem raio iônico semelhante. O Fe, ao contrário do observado pelos autores, foi compartimentalizado e acumulado nas raízes, em maior magnitude, nos tratamentos 2 e 4. Porém, de acordo com os dados

de perfil mineral em folhas, o Fe foi translocado para os tecidos fotossintetizantes, utilizado, juntamente com o nitrogênio (N), para a síntese de clorofila (indicado pelo índice de clorofila; dados não mostrados) e fornecido para outros compartimentos celulares participando de funções metabólicas.

Os estresses ambientais, bióticos e abióticos, promovem o aumento da produção de EROS, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radicais hidroxila ($\cdot OH$), e o consequente acúmulo nas plantas (UPADHYAY; PANDA, 2010). EROS são considerados compostos tóxicos que podem levar a danos nas moléculas biológicas (DNA, RNA e proteínas) e nas membranas celulares (peroxidação lipídica) (SHI-SHENG, 2007). Para reparar o dano iniciado por essas moléculas, as plantas desenvolveram um sistema enzimático antioxidante, que inclui a atividade conjunta das enzimas SOD, CAT e APX (UPADHYAY; PANDA, 2010).

A SOD, primeira linha de defesa antioxidante, sequestra o $O_2^{\cdot-}$ gerado pela cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos e mitocôndrias, e o H_2O_2 produzido pela atividade da SOD, é então eliminado por APX em diferentes compartimentos celulares (SILVA et al., 2010). A CAT, a segunda enzima a atuar na remoção do H_2O_2 quando este está em maior quantidade na célula, também é responsável por remover o H_2O_2 gerado na via fotorrespiratória dentro dos peroxissomos (MITTLER, 2002). No presente estudo, o estresse oxidativo foi claramente estabelecido em folhas e raízes de batata-doce cultivadas com as elevadas combinações de micronutrientes, como indicado pelo aumento do conteúdo de H_2O_2 e da peroxidação lipídica (Figura 3).

Nos tecidos foliares, as atividades da SOD e CAT foram estimuladas pelo efeito aditivo de 0,850 mM de Zn (T2). Porém, a atividade não foi suficiente pelos altos níveis de MDA e H_2O_2 encontrados nesses tecidos (Figura 3). Esse estímulo pode ser devido a diminuição do conteúdo de alguns macro e micronutrientes nos tecidos, como K, Ca, Mg, Cu, Fe e Mn, impossibilitando o funcionamento adequado do metabolismo vegetal e gerando estresse oxidativo (Tabela 1). O mesmo foi visualizado em folhas cultivadas com 0,123 mM de Cu e o mesmo nível de Zn do controle (T3). Já no T4, a inibição da atividade da SOD pelo efeito aditivo do Cu pode ser consequência da baixa expressão gênica ou da degradação, desnaturação e/ou inibição/inativação dessas proteínas (CAVALCANTI et al., 2007). Outra hipótese é que a atividade dessa enzima pode ter sido reduzida pela compartimentalização e sequestro de micronutrientes (Zn, Cu e Fe) nos tecidos

radiculares, promovendo menor translocação dos mesmos para a parte aérea e, assim, diminuindo a formação de EROS (MATEOS-NARANJO et al., 2008) (Tabela 1).

A redução da atividade da SOD (Figura 2A) e, o consequente, aumento da CAT (Figura 2C) e do conteúdo de H_2O_2 (Figura 3A), no tratamento com elevadas concentrações de Cu e Zn (T4), sugere a ocorrência do processo de fotorrespiração nas folhas. A fotorrespiração é um dreno alternativo para ajudar a consumir poder redutor gerado pela cadeia de transporte de elétrons cloroplastídicos em plantas C_3 que, provavelmente, foi estimulado pelas condições estressantes (WINGLER et al., 1999).

A formação de MDA, melhor medida de danos causados pela produção de EROS, é o produto da decomposição dos ácidos graxos poliinsaturados de biomembranas e demonstra plantas sob alto nível de estresse oxidativo (HOU et al., 2007). Nas folhas, a intensidade da peroxidação lipídica foi maior nas plantas submetida aos tratamentos com maior concentração de Zn, sugerindo o desenvolvimento de grandes danos oxidativos independente da concentração de Cu utilizada (Figura 3B). Esses resultados podem estar relacionados as grandes quantidades de Zn transportadas das raízes em direção as folhas e divergem dos encontrados por Upadhyay e Panda (2010). Os autores evidenciaram o efeito positivo do Zn em diminuir os níveis de MDA e reduzir a peroxidação lipídica, indicando, assim, que o Zn existe em um estado monovalente estável em meio biológico e, portanto, a camada lipídica da membrana fica protegida pelos EROS.

Maior acúmulo de micronutrientes foi observado nas raízes (Tabela 1) e, por essa razão, as três enzimas foram estimuladas, principalmente pelo aumento da concentração de Zn (T2) (Figura 2). Segundo Silva et al. (2010), a manutenção de um equilíbrio favorável entre a SOD, APX e CAT é essencial para evitar a acumulação de EROS e proteger contra o dano oxidativo (GUO et al., 2007). No entanto, a ação dessas enzimas nas plantas cultivadas no T2 não foi eficiente, induzindo maior formação de MDA (Figura 3B). As respostas obtidas no T3 não diferiram das encontradas no controle, somente houve acumulação de H_2O_2 nesses tecidos. O acúmulo de EROS pode representar um sinal para uma maior estimulação do sistema antioxidante (GIANPAOLI et al., 2012). As altas concentrações de micronutrientes (T4), no entanto, podem ser consideradas tóxicas para as plantas de batata-doce pois desencadearam a atividade da APX e CAT além

de danos oxidativos. A diminuição na atividade de SOD nesse tratamento sugere que o aumento na disponibilidade dos micronutrientes pode ter inibido, a nível molecular, a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo (POSMYK; KONTEK; JANAS, 2009). Desta forma, outros fatores, tais como a distribuição subcelular, podem afetar o desempenho enzimático das plantas expostas a metais pesados (GIANPAOLI et al., 2012).

3.5 CONCLUSÃO

O aumento de Zn, independente da concentração de Cu (T2 e T4), é tóxico para as plantas de batata-doce. Nessas condições, as plantas apresentam diminuição na absorção e transporte de macronutrientes; promovem mecanismos de competição, sequestro e compartimentalização de micronutrientes nas raízes e provocam estresse oxidativo e danos nas membranas.

3.6 REFERÊNCIAS

ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2056-2062, 2011.

ADAMSKI, J. M.; DANIELOSKI, R.; DEUNER, S.; BRAGA, E. J. B.; CASTRO, L. A. S.; PETERS, J. A. Responses to excess iron in sweet potato: impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1827-1836, 2012.

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

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

BROADLEY, M.; WHITE, P. J.; HAMMOND, J. P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, p. 677-702, 2007.

CAVALCANTI, F. R.; LIMA, J. P. M. S.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 591–600, 2007.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*).

Physiologia Plantarum, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.

FAGERIA, V. D. Nutrient interactions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, n. 8, p. 1269-1290, 2001.

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

GIAMPAOLI, P.; TRESMONDI, F.; LIMA, G.P.P.; KANASHIRO, S.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; TAVARES, A.R. Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 1, p. 83-88, 2012.

GUO, Z.; HUANG, E.M.; LU, E.S.; YAQING, E.Z.; ZHONG, E.Q. Differential response to paraquat induced oxidative stress in two rice cultivars on antioxidants and chlorophyll a fluorescence. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, p. 39-46, 2007.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California College of Agriculture, Agricultural Experimental Station, 1938. 39p.

HOU, W.; CHEN, X.; SONG, G.; WANG, Q.; CHANG, C. C. Effect of copper and cadmium on heavy metal polluted water body restoration by duckweed (*Lemna minor*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 62-69, 2007.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3 ed. Flórida: CRC Press, 2001. 315 p.

KASIM, W. A. The correlation between physiological and structural alterations induced by copper and cadmium stress in broad beans (*Vicia faba* L.). **Egyptian Journal of Biology**, v. 7, p. 20-32, 2005.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat – Sistema de Análise Estatística para Windows versão 1.0**. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

MATEOS-NARANJO, E.; REDONDO-GÓMEZ, S.; CAMBROLLÉ, J.; FIGUEROA, M.E. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 459-465, 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, p. 199-216, 2010.

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

POSMYK, M.M.; KONTEK, R.; JANAS, K.M. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 596–602, 2009.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. VOLKWEISS, S. J. **Análise do solo, plantas e outros materiais**, 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174 p.

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

SHI, G. R.; CAI, Q. S. Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to zinc stress. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 2, p. 391-394, 2009.

SHI-SHENG, K. Effects of Copper on the Photosynthesis and Oxidative Metabolism of *Amaranthus tricolor* Seedlings. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 10, p. 1182-1192, 2007.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. V.; RIBEIRO, R. V.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1157–1164, 2010.

UPADHYAY, R.; PANDA, S. K. Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrrhiza* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 1081–1084, 2010.

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

WINGLER, A.; QUICK, W. P.; BUNGARD, R.A.; BAILEY, K. J.; LEA. P. J.; LEEGOOD, R. C. The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 361–373, 1999.

YANG, Y.; SUN, C.; YAO, Y.; ZHANG, Y.; ACHAL, V. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Combier”) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1483–1491, 2011.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As concentrações utilizadas de Cu e Zn foram altas, porém eficazes na detecção de alterações fisiológicas em plantas de batata-doce. As altas concentrações de Cu afetaram as reações luminosas da fotossíntese nas folhas, através da fluorescência transiente e modulada da clorofila *a*, com redução da atividade fotoquímica do FSII, aumento da dissipação de energia luminosa no mesmo fotossistema e incremento da eficiência do FSI. Porém, perdas na produção de biomassa e diminuição do tamanho dos estômatos, pode indicar que o excesso de Cu comprometeu a segunda fase da fotossíntese (reações de carboxilação). Adicional a isso, o excesso de Cu acionou o sistema antioxidante como forma de proteção ao estresse, principalmente nas raízes. Esse fato está correlacionado com os mecanismos de sequestro e compartimentalização desse micronutriente nos tecidos radiculares.

Os resultados da interação Cu-Zn referentes a absorção corroboram com os relatados pela literatura, onde o Cu inibiu significativamente a captação de Zn e o Zn interferiu com o processo de absorção de Cu. No entanto, a nível morfofisiológico, as combinações analisadas afetaram negativamente o metabolismo das plantas de batata-doce. O aumento de Zn independente da concentração de Cu foi tóxico para as plantas apresentando grandes distúrbios nutricionais com diminuição na absorção e transporte de macronutrientes e consequente redução de biomassa. Com isso, nos tecidos foliares e radiculares, foi desencadeado estresse oxidativo e danos nas membranas, comprovado pelo aumento na atividade das enzimas antioxidantes. As raízes, nessas condições, desenvolveram mecanismos de competição, sequestro e compartimentalização de micronutrientes.

Desta forma, os conhecimentos adquiridos podem contribuir significativamente para uma melhor compreensão da homeostase do Cu nas plantas

e de sua influência nos processos fisiológicos. Contudo, estudos relacionados as reações de carboxilação, alterações anatômicas e ultraestruturais e caracterização molecular são necessários para completar o atual conhecimento do excesso de Cu nas plantas. O mesmo pode ser aprofundado em relação as interações Cu-Zn. Os efeitos fisiológicos dessas interações ainda são desconhecidos e, com base nisso, sugere-se a importância de desenvolver mais pesquisas que envolvam estresses combinados de nutrientes, especialmente sob condições de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2056–2062, 2011

ADAMSKI, J. M.; DANIELOSKI, R.; DEUNER, S.; BRAGA, E. J. B.; CASTRO, L. A. S.; PETERS, J. A. Responses to excess iron in sweet potato: impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1827-1836, 2012.

ARRIVAUULT, S.; SENGER, T.; KRAMER, U. The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. **Plant Journal**, v. 46, p. 861-879, 2006.

BROADLEY, M.; WHITE, P. J.; HAMMOND, J. P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, p. 677-702, 2007.

BURKHEAD, J. L.; GOGOLIN REYNOLDS, K. A.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C. M.; PILON, M. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, p. 799-816, 2009.

CAMBROLLÉ, J.; MATEOS-NARANJO, E.; REDONDO-GÓMEZ, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M.E. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 57-64, 2011.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. Put metal to metal: metal uptake and transport throughout plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 322–330, 2006.

CURIE, C.; CASSIN, G.; COUCH, D.; DIVOL, F.; HIGUCHI, K.; LE JEAN, M.; MISSON, J.; SCHIKORA, A.; CZERNIC, P.; MARI, S. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany**, v. 103, p. 1–11, 2009.

EDMOND, J. B.; AMMERMAN, G. R. **Sweet potatoes: production processing marketing**. Wesport: The Air Publishing Company, 1971. 58 p.

EREN, E.; ARGÜELLO, J. *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal- transporting

P_{1B}-Type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3712-3723, 2004.

FAGERIA, V. D. Nutrient interactions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, n. 8, p. 1269-1290, 2001.

FANG, W.C.; WANG, J.W.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 75-80, 2001.

GUSTIN, J. L.; ZANIS, M. J.; SALT, D. E. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. **BMC Evolucionary Biology**, v. 11, p. 76, 2011.

HAYDON, M. J.; COBBETT, C. S. A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences Zn tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1705–1719, 2007.

HATTAB, S.; DRIDI, B.; CHOUBA, L.; KHEDER, M. B.; BOUSETTA, H. Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 1552–1556, 2009.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 259-266, 2009.

HENRIQUES, A .R.; CHALFUN-JUNIOR, A.; AARTS, M. Strategies to increase zinc deficiency tolerance and homeostasis in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n.1, p. 3-8, 2012.

HUFFMAN D. L.; O'HALLORAN, T. V. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 677–701, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Culturas temporárias e permanentes. Produção agrícola municipal, v. 38, p. 1-97, 2011 Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2011/pam2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2011/pam2011.pdf). Acesso em: 12 de junho de 2013.

KIM, Y. Y.; CHOI, H.; SEGAMI, S.; CHO, H. T.; MARTINOIA, E.; MAESHIMA, M.; LEE, Y. AtHMA1 contributes to detoxification cation of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 58, p. 737-753, 2009.

KRÄMER, U.; CLEMENS, S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: TAMÁS, M. J.; MARTINOIA, E. **Molecular biology of metal homeostasis and detoxification from microbes to man**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 214–272.

LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone

distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 673-82, 2010.

LI, T.; YANG, X.; LU, L.; ISLAM, E.; HE, Z. Effects of zinc and cadmium interactions on root morphology and metal translocation in a hyperaccumulating species under hydroponic conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 734–741, 2009.

LOU, Y.; RIMMER, D. L. Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminated soil. **Environmental pollution**, v. 88, p. 79-83, 1995.

LOW, J. W.; ARIMOND, M.; OSMAN, N.; CUNGUARA, B.; ZANO, F.; TSCHIRLEY, D. A food-based approach introducing orange-fleshed sweet potatoes increased vitamin A intake and serum retinol concentrations in young children in rural Mozambique. **Journal of Nutricao**, v. 137, p. 1320-1327, 2007.

MACINNIS-NG, C. M. O.; RALPH, P. J. Variations in sensitivity to copper and zinc among three isolated populations of the seagrass, *Zostera capricorni*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 302, p. 63–83, 2004.

MAKSYMIEC, W. Effect of copper on cellular processes in higher plants. **Photosynthetica**, v.34, p. 321-342, 1997.

MARTINOIA, E.; MEYER, S.; DE ANGELI, A.; NAGY, R. Vacuolar Transporters in Their Physiological Context. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 183–213, 2012.

MEDIOUNI, C.; BENZARTI, O.; TRAY, B.; GHORBEL, M.H.; JEMAL, F. Cadmium and copper toxicity for tomato seedlings. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 26, p.227-232, 2006.

MENDEL, R. R. Molybdenum: biological activity and metabolism. **Dalton Transactions**, v. 21, p. 3404–3409, 2005.

MIRANDA, J. E. C.; FRANÇA, F. H.; CARRIJO, O. A.; SOUZA, A. F.; PEREIRA, W.; LOPES, C. A.; SILVA, J. B. C. **A cultura da batata-doce**. Brasília: EMBRAPA-SPI, (SPI. Coleção Plantar, 30), 1995. 94p.

O'HALLORAN, T. V.; CULOTTA, V. C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 25057–25060, 2000.

PALMER, C.; GUERINOT, M. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 333-340, 2009.

PEROTTI, J. C.; RODRIGUES, I. C. S.; KLEINOWSKI, A. M.; RIBEIRO, M. V.; EINHARDT, A. M.; PETERS, J. A.; BACARIN, M. A.; BRAGA, E. J. B. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1874-1880, 2010.

PILON, M.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C. M.; GOGOLIN, K. A.; YE, H. Copper cofactor delivery in plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 256–263, 2006.

PRADO, R. M. **Nutrição de Plantas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008. 407p.

PUIG, S.; ANDRÉS-COLÁS, N.; GARCÍA-MOLINA, A.; PEÑARRUBIA, L. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, p. 271–290, 2007.

QUEIROGA, R. C. F.; SANTOS, M. A.; MENEZES, M. A.; VIEIRA, C. P. G.; SILVA, M. C. Fisiologia e produção de cultivares de batata-doce em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 371-374, 2007.

SHI-SHENG, K. Effects of Copper on the Photosynthesis and Oxidative Metabolism of *Amaranthus tricolor* Seedlings. **Agricultural Sciences in China**, v.6, n.10, p.1182-1192, 2007.

SILVA, J. B. C. da; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. Cultura da batata-doce. In: CEREDA, M. P. **Agricultura: Tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Cargill, 2002, v. 2, p. 449-503.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, v.125, n.1, p.27-58, 1993.

SONG, W.Y.; CHOI, K.S.; KIM DO, Y.; GEISLER, M.; PARK, J.; VINCENZETTI, V.; SCHELLENBERG, M.; KIM, S. H.; LIM, Y. P.; NOH, E. W.; LEE, Y.; MARTINOIA, E. *Arabidopsis* PCR2 is a zinc exporter involved in both zinc extrusion and long-distance zinc transport. **Plant Cell**, v. 22, p. 2237-2252, 2010.

SOUZA, A. B. Avaliação de cultivares de batata-doce quanto a atributos agrônômicos desejáveis. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 4, p. 841-845, 2000.

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

UPADHYAY, R.; PANDA, S. K. Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 1081–1084, 2010.

VAN DE MORTEL, J. E.; ALMAR VILLANUEVA, L.; SCHAT, H.; KWEKKEBOOM, J.; COUGHLAN, S.; MOERLAND, P.D.; VER LOREN VAN THEMAAT, E.; KOORNNEEF, M.; AARTS, M. G. Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, v. 42, p. 1127-1147, 2006.

YEN, M. R.; TSENG, Y. H.; SAIER, M. H. JR. Maize Yellow Stripe1, an ironphytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. **Microbiology**, v. 147, p. 2881–2883, 2001.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v.36, p.409-430, 2009.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal Plant of Phisiology**, v.17, n.1, p.145-156, 2005.

WOOLFE, J. A. **Sweetpotato: an untapped food resource**. New York: Cambridge University Press, 1992. 188p.